

Estevão Alan Vieira

Influência do pH na atividade antimicrobiana de ramnolipídeos frente a *Staphylococcus aureus*

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química.

Área de concentração: Microbiologia e Bioquímica

Orientadora: Prof. Dr^a. Marcia Nitschke

São Carlos

2016

“Cientista não é aquele que fornece as verdadeiras respostas, mas sim o que faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para esta conquista:

À minha família pelo apoio e confiança;

Aos meus amigos de graduação e do grupo de Biotecnologia Microbiana, por fazerem desta jornada algo muito mais agradável;

A todos os professores do IQSC pela transmissão do conhecimento;

Aos funcionários por serem sempre prestativos;

À minha orientadora por ser sempre solícita e presente;

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos.

RESUMO

Contaminações alimentares podem ser consideradas as causas mais significativas de mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo as infecções bacterianas as responsáveis pela maioria dos casos. Dentre elas destacam-se as causadas por espécies de *Staphylococcus*, que são nocivas tanto pela infecção do organismo hospedeiro, quanto pela intoxicação por enterotoxinas termoestáveis presentes em alimentos contaminados e mal acondicionados. Neste contexto, nota-se a importância do desenvolvimento de novos métodos para o controle destes agentes patogênicos. Uma alternativa ao emprego de conservantes sintéticos é a utilização de biossurfatantes, como os ramnolipídeos (RL) que, além de apresentarem alta estabilidade a temperatura, pH e concentração salina, apresentam baixa toxicidade e são biodegradáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos RL sobre culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 8095, ATCC 25923 e cepa campo) em diferentes valores de pH (5, 6, 7 e 8). A atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) utilizando a técnica de microdiluição em caldo. O pH mostrou efeito significativo sobre a atividade antimicrobiana. Em pH 5, a concentração de $19,6 \text{ mg L}^{-1}$ de RL mostrou efeito bactericida, frente as linhagens ATCC 8095 e ATCC 25923 e de $78,1 \text{ mg L}^{-1}$ para a cepa campo. Em pH 6, os RL mostraram efeito bacteriostático frente a ATCC 8095 e ATCC 25923 com CIM de $39,1 \text{ mg L}^{-1}$ e bactericida em concentração igual a 2500 mg L^{-1} . Concentrações muito maiores foram necessárias para obter-se o mesmo nível de inibição em pH 7 comparado ao pH 6. Em pH 8 não obteve-se inibição dentro do intervalo de concentrações estudado. Análises espectrofotométricas de FTIR mostraram alterações em fosfolipídeos e proteínas que foram evidenciadas pelo deslocamento de bandas características destes grupos, sugerindo que os RL promovem desestabilização das interações destes na bicamada fosfolipídica.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, biossurfatantes, pH ramnolipídeos, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Food contamination can be considered one of the most significant causes of mortality in developed and developing countries, and bacterial infections are responsible for most cases. Among them are those caused by *Staphylococcus* species, which are harmful both due to infection of the host organism or intoxication by the thermostable enterotoxins present in contaminated and poorly conditioning food. In this context, it is important to develop new methods aiming to control pathogens growth. An alternative to the use of synthetic preservatives are the biosurfactants such as rhamnolipids (RL), which show high stability to temperature, pH and salt concentration, have low toxicity and are biodegradable. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of rhamnolipids against *Staphylococcus aureus* strains (ATCC 8095, ATCC 25923 and cepa campo) at different pH values (5, 6, 7 and 8). Antimicrobial activity was measured by minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) using micro broth dilution technique. The pH revealed to have significant influence at the RL antimicrobial activity. At pH 5, RL in the concentration of 19.6 mg L^{-1} or greater is bactericide against ATCC 8095 and ATCC 25923 strains and 78.1 mg L^{-1} are required for cepa campo . At pH 6, the RL present bacteriostatic for ATCC 8095 and ATCC 25923 showing MIC of 39.1 mg L^{-1} and MBC at 2500 mg L^{-1} . Highest concentrations are needed to reach the same level of inhibition in pH 7, if compared to pH 6. At pH 8 there is no observed inhibition within the concentration range studied. FTIR analysis showed modifications in phospholipids and proteins indicated by the shift of these groups characteristic bands; suggesting that RL are involved in destabilization of interactions in the phospholipid bilayer.

Keywords: antimicrobial activity, biosurfactants, pH, rhamnolipids, *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - american type culture collection (coleção de cultura americana);
CBM – concentração bactericida mínima;
CIM – concentração inibitória mínima;
DO – densidade ótica;
FTIR – Fourier transform infrared (infravermelho com transformada de Fourier);
MTT - brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio;
RL – ramnolipídeo(s) (diRL: di-ramnolipídeo e monoRL: mono-ramnolipídeo);
TSA – tryptone soya agar (ágar triptona de soja);
TSB – tryptone soya broth (caldo triptona de soja);
TSYEA – tryptone soya yeast extract agar (ágar triptona de soja e extrato de levedura);
TSYEB – tryptone soya yeast extract broth (caldo triptona de soja e extrato de levedura);
UFC – unidade formadora de colônias;
YE – yeast extract (extrato de levedura).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.2 Ramnolipídeos.....	12
2.3 Ação antimicrobiana e resistência a antimicrobianos	15
2.4 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana	18
2.4.1 Método de diluição em caldo.....	18
2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivos específicos.....	21
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 Meios de cultura	22
4.2 Tampão fosfato	22
4.3 Microrganismos.....	22
4.4 Padronização dos inóculos	23
4.5 Ramnolipídeos.....	23
4.6 Determinação da concentração inibitória mínima	23
4.7 Determinação da concentração bactericida mínima	25
4.8 Análise dos resultados.....	25
4.9 Curva de sobrevivência	28
4.10 Espectroscopia na região do infravermelho	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Atividade antimicrobiana dos ramnolipídeos	31
5.2 Curvas de sobrevivência.....	35
5.3 Espectroscopia na região do infravermelho	38
6 CONCLUSÃO	46
7 PERSPECTIVAS	47

1 INTRODUÇÃO

Intoxicações alimentares são foco de grande preocupação no âmbito da saúde pública, podendo ser consideradas uma das mais significativas causas de morbimortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento (BEHRMAN et al., 1995). Nos EUA estima-se que ocorra por ano cerca de 76 milhões de episódios de doenças relacionadas à intoxicações alimentares, 325 mil hospitalizações e 5 mil mortes (MEAD et al., 1999). No Brasil, de acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), há ocorrência de uma média de 6.320 óbitos/ano (BRASIL, 2005).

As infecções bacterianas são responsáveis pela maioria dos casos de intoxicações alimentares (KARRARAS, 2000). Dentre elas se destacam as causadas pelas espécies do gênero *Staphylococcus*. Esse gênero de bactéria apresenta a característica de produzir enterotoxinas que são termoestáveis e difíceis de serem eliminadas. Uma vez contaminado por essas toxinas, o alimento, se ingerido, pode causar uma série de complicações gastrointestinais podendo evoluir para quadros mais severos. Neste contexto, nota-se a importância de serem desenvolvidas novas tecnologias para o controle desses agentes patogênicos.

Uma alternativa promissora na indústria alimentícia para o controle de microrganismos patógenos é a utilização de biossurfatantes, em detrimento aos convencionais surfatantes sintéticos, pois os consumidores atuais estão não apenas se preocupando cada vez mais com o risco de intoxicações alimentares, como também com a segurança dos aditivos incorporados nos alimentos que irão consumir (IBRAHIM; YANG, 2008).

Uma ampla variedade de biossurfatantes vem demonstrando atividade antimicrobiana, porém, atualmente a classe mais promissora é a dos ramanolipídeos (RL) produzidos por *P. aeruginosa*. Os RL apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis e considerados seguros para consumo; e seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos foi aprovado pela U.S. *Environmental Protection Agency* (NITSCHKE; COSTA, 2007).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos RL ainda não foi elucidado completamente, porém, por se tratar de moléculas com poder tensoativo, sabe-se

que exercem ação nos componentes de membrana celulares (NITSCHKE et al., 2013).

O pH dos alimentos exerce grande influência no crescimento e viabilidade de células microbianas. Cada espécie apresenta um intervalo de pH ótimo para seu crescimento, sendo o de 6,5 a 7,5 para a grande maioria das bactérias, porém as Gram-positivas, como o *S. aureus*, podem continuar viáveis em um intervalo que varia de 4,5 a 8,5. Neste intervalo enquadram-se os alimentos classificados como de baixa acidez: carnes e derivados, peixe, leite, ovo e a maioria dos vegetais (RAY, 2000), os mais frequentemente contaminados pelo patógeno. Pouco se sabe acerca da influência de fatores intrínsecos sobre a atividade antimicrobiana dos RL; sendo o pH um dos fatores importantes visando aplicação de RL em alimentos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência do pH na ação antimicrobiana dos RL, principalmente dentro do intervalo no qual há maior índice de contaminação (5 a 8), frente a *S. aureus*.

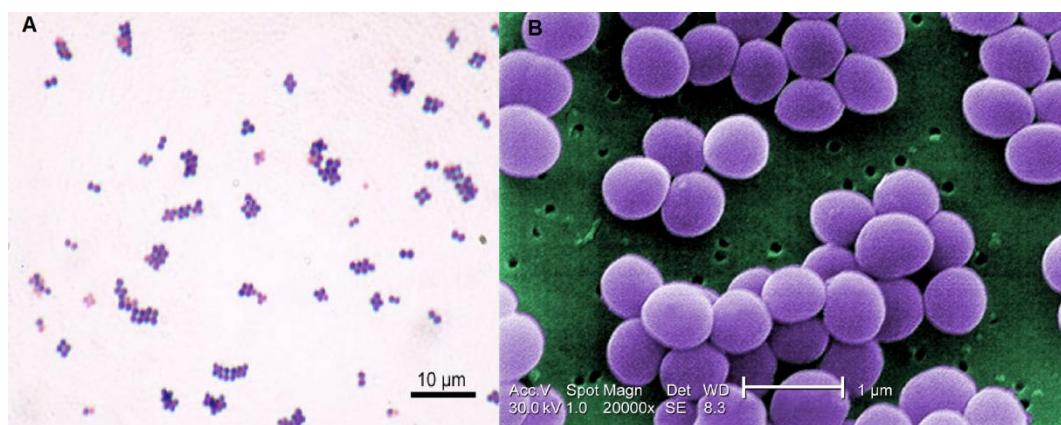
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Estafilococos foram primeiramente isolados de um ferimento purulento e descritos por Robert Koch em 1878. Posteriormente, em 1880, o médico escocês Alexander Ogston atribuiu a denominação de *staphylo* ao gênero que significa cacho de uvas em grego e evidenciou sua patogenicidade para cobaias de camundongos. Em 1884, Rosenbach admitiu duas espécies que as chamou de “*aureus*” e “*albus*”, relacionando à presença de pigmentos (GUERREIRO, 1984).

Estafilococos são células esféricas com 0,5 – 1,5 µm de diâmetro, apresentam-se em arranjos individuais, aos pares, em tétrades, em cadeias curtas (3-4 células) e em agrupamentos irregulares característicos, em formato semelhante a cachos de uva (Figura 1). São Gram-positivos, imóveis, não esporulados, constantemente não capsulados ou com uma formação limitada de cápsula. Apresentam parede celular constituída de peptideoglicano e ácido teicóico. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos com metabolismo respiratório e fermentativo. Normalmente são catalase-positivos e oxidase-negativos. As colônias são geralmente opacas, podendo variar sua coloração do branco ao laranja. Geralmente são halotolerantes, crescendo em meios com até 10% de sal (NaCl), e a temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 37°C (WHITMAN et al., 2012). Podem crescer na faixa de pH entre 4 e 9,8 com o ótimo entre 6 e 7 (FRANCO, 2008).

Figura 1- Microscopia de *S. aureus*, A) microscopia ótica (ampliação 1000x) e B) microscopia eletrônica de varredura (MEV) (ampliação 20000x).



Fonte: <<http://www.bacteriainphotos.com/staph.html>> Acessado: 12/05/2016.

Este gênero está distribuído, principalmente na pele e mucosas de vertebrados de sangue quente, mas também pode ser isolado em produtos alimentares, em partículas de poeira e na água. Algumas espécies são patógenas oportunistas de alguns animais, inclusive do ser humano, sendo a espécie *aureus* a mais típica (SANTOS, 2007).

Os mecanismos de patogenicidade atribuídos à *S. aureus* estão relacionados aos fatores de virulência como toxinas, enzimas e outras proteínas associadas à membrana celular, mediadas por genes plasmidiais ou cromossômicos que combinados conduzem à doença (PEREIRA; SIQUEIRA JUNIOR, 1995).

S. aureus pode ser prejudicial à saúde tanto por sua capacidade de multiplicação e disseminação ampla nos tecidos, como pela produção de substâncias extracelulares como as enterotoxinas, que são causas importantes de intoxicações alimentares. Estas toxinas são produzidas principalmente quando certas cepas de *S. aureus* crescem em alimentos, contendo carboidratos e proteínas (FRAZIER; WESTHOFF, 1988).

A toxina estafilocócica pertence ao segundo grupo de toxinas mais bem estudadas nas intoxicações alimentares. *S. aureus* é capaz de produzir uma variedade de toxinas, sendo as principais as do tipo A, B, C1, C3, D e E (FRANKER, 1990), sendo as toxinas do tipo A e D as mais relacionadas às intoxicações. Estas toxinas são polipeptídeos de cadeia curta (28 a 35 KDa) e única, compostas por uma quantidade elevada de lisina, tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico; contém uma ponte dissulfeto ligada próximo ao centro da molécula, isso lhes conferem a característica de serem termoestáveis e apresentarem estabilidade em pH extremos e radiação; logo, uma vez contaminado, é difícil eliminar a toxina do alimento (ACHENSON, 2000); além disso, quando ingeridas não são degradadas pelas proteases digestivas (ADAMS; MOSS, 2002)

Diferentemente das células bacterianas que são termolábeis, facilmente eliminadas por processos de cozimento, as enterotoxinas são termoestáveis e resistentes a temperaturas elevadas (FREITAS; MAGALHÃES, 1990), por isso, quando se trata de *S. aureus* as intoxicações são mais recorrentes que as infecções.

São agentes comuns da intoxicação estafilocócica carnes cozidas, saladas de batata, atum, frango, leite e seus derivados, assim como alimentos que utilizam leite em sua composição, como cremes e tortas. Por ser uma bactéria halotolerante tanto para NaCl quanto para nitratos, carnes curadas, como presuntos, também são

veículos potenciais para estas bactérias. A contaminação de queijos já causou vários surtos tanto antes como depois do advento do emprego do leite pasteurizado na sua fabricação. Neste último caso, pode ocorrer contaminação pós-processamento ou na utilização de fermentos (starters) contaminados por *S. aureus* (FRANCO, 2008).

A doença gerada pela intoxicação causada por *S. aureus* denomina-se gastroenterite estafilocócica. Seus principais sintomas são náuseas, vômitos, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaleia, que podem durar de um a dois dias, podendo evoluir para quadros mais severos, dependendo da susceptibilidade do indivíduo (BALABAM, 2000).

No caso das enterotoxinas, acredita-se serem necessárias entre 10^5 e 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* por grama do alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação. Como, normalmente, a bactéria encontra-se presente em números baixos, é preciso que ocorra a sua multiplicação (FRANCO, 2008). Ao controlar-se, portanto, fatores que afetam o crescimento do patógeno, controlar-se-á também a produção de enterotoxinas, assim como os surtos de intoxicação.

2.2 Ramnolipídeos

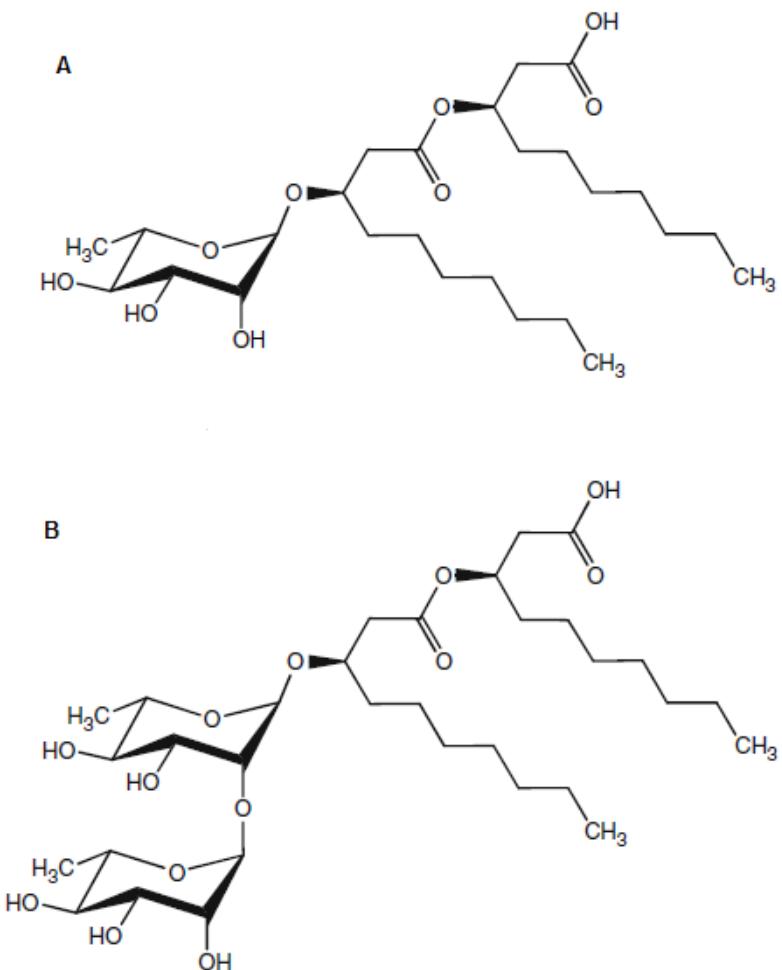
Os ramnolipídeos (RL) enquadram-se na classificação de biossurfatantes glicolipídicos. Surfatantes são compostos químicos que apresentam atividade superficial, isto é, possuem predileção por interfaces de polaridades dissimilares e são solúveis em solventes de ambas as polaridades. Esta propriedade advém de suas estruturas anfifílicas (ou anfipáticas) que apresentam ao menos uma região hidrofóbica e outra hidrofílica (DESAI; BANAT, 1997).

Biossurfatantes são surfatantes de origem biológica. Alguns microrganismos são conhecidos como produtores de biossurfatantes, como bactérias, leveduras e fungos. A porção hidrofílica dos biossurfatantes é normalmente composta por sacarídeos, aminoácidos ou grupos funcionais polares como ácidos carboxílicos. A parte hidrofóbica é tipicamente uma cadeia hidrocarbonada alifática (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os RL são principalmente produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, e apresentam-se como uma mistura de homólogos que diferem entre si pelo número de moléculas de ramnose, que constituem sua porção hidrofílica; e pelo tamanho das cadeias de ácidos graxos que formam a porção hidrofóbica do composto (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os homólogos de maior predominância nas misturas de RL são os mono (monoRL) e di-ramnolipídeos (diRL), o primeiro formado por uma ramnose ligada a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico; e o segundo constituídos por duas ramnoses ligadas a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (Figura 2) (NITSCHKE et al., 2011).

Figura 2- Estrutura química dos RL. A) mono-ramnolipídeo (α -L-ramnopiranossil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e B) di-ramnolipídeo (α -L-ramnopiranossil- α -L-ramnopiranossil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato).



Fonte: Adaptação a partir de ABDEL-MAWGOUD et al., 2010.

Os RL possuem as duas principais propriedades que um surfatante pode apresentar, que é a forte atividade superficial e a auto-interação em água, podendo formar micelas, vesículas e bicamadas dependendo do pH, concentração e presença de eletrólitos da solução. Com isso, podem encapsular tanto compostos polares em seu centro aquoso quanto compostos apolares em sua região interbicamada. Entretanto, apesar do importante efeito que os RL podem apresentar sobre as membranas celulares, muito pouco é conhecido sobre seu mecanismo de ação, principalmente no que diz respeito a interações moleculares ramnolipídeos-fosfolipídios (HABA et al., 2014).

RL são ácidos fracos devido à presença de um grupo carboxílico e apresentam concentração micelar crítica (CMC) dependente do ambiente químico em que se encontra, sendo reportado entre 50 a 200 mg L⁻¹ (SÁNCHEZ et al., 2007). Em seu estudo Aranda e cols. (2007) demonstraram por meio da determinação da tensão superficial que a CMC de diRL purificado é de 71,5 mg L⁻¹.

A forte atividade superficial, a presença de vários congêneres de RL e a dependência da morfologia de agregação de RL com o pH faz com que a determinação precisa do pKa para estes sistemas seja dificultada (HABA et al., 2014). Ishigami e cols. (1987) em seu estudo determinaram o pKa de RL como sendo de 5,6. Porém estudos mais recentes, demonstraram por meio de várias técnicas e em condições variadas de análise, que o pKa de RL é compreendido dentro de um intervalo de 4,28 a 5,50 (HABA et al., 2014).

Alguns estudos mostraram a atividade antimicrobiana dos RL sobre diversos microrganismos incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e leveduras (HABA et al., 2003; ABALOS et al., 2001). Sabe-se que a membrana citoplasmática é o primeiro alvo de dano celular causado por surfatantes (NIELSEN et al., 2005). Sotirova e cols. (2008), analisando o extravasamento de proteínas de células bacterianas tratadas com RL, atribuiu ao biosurfatante a característica de permeabilizador de membrana, ou seja, os RL provavelmente formam agregados moleculares na superfície da membrana celular, promovendo a formação de poros transmembrana que servem como canais para o periplasma. Em adição, a interação dos RL com proteínas de superfície pode causar uma remoção direta destas proteínas por solubilização (SOTIROVA et al., 2008). O mesmo autor constatou também, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que a ação dos RL altera

o formato das células, por causar cavidades de diferentes formas e tamanhos na membrana celular.

2.3 Ação antimicrobiana e resistência a antimicrobianos

O controle microbiano pode ser feito por meio de agentes físicos como calor radiação e filtração, e por agentes químicos. Um agente antimicrobiano é um composto químico natural ou sintético que elimina ou inibe o crescimento microbiano. Agentes que matam organismos são frequentemente denominados agentes *cidas* e os que inibem, *státicos*. Os agentes antimicrobianos podem ser classificados como bacteriostáticos, bactericidas e bacteriolíticos, de acordo com os efeitos observados em uma cultura bacteriana. Agentes bacteriostáticos frequentemente inibem a síntese proteica, devido a sua ligação aos ribossomos. Quando a concentração do agente é diminuída, ele é liberado do ribossomo e o crescimento é restabelecido. Muitos antibióticos atuam por esse mecanismo (MADIGAN; MARTINKO, 2006).

Agentes bactericidas ligam-se fortemente a seus alvos celulares e não são removidos pela diluição, promovendo a morte celular. As células mortas, no entanto não são destruídas e o número total de células mantém-se constantes. Alguns bactericidas são também bacteriolíticos, matando as células devido à lise e liberação do conteúdo citoplasmático (MADIGAN; MARTINKO, 2006).

A membrana plasmática de um microrganismo, localizada no interior da parede celular, é o alvo de muitos agentes de controle microbiano. Essa membrana regulaativamente a passagem de nutrientes para o interior da célula e a eliminação celular de dejetos. Danos aos lipídeos ou proteínas da membrana plasmática por agentes antimicrobianos causam extravasamento do conteúdo celular no meio circundante e interferem no crescimento da célula (TORTORA et al., 2005).

Para serem eficazes os antimicrobianos devem apresentar uma série de propriedades para sobrepujar as estratégias que as bactérias utilizam para evitar a ação destes: 1-devem alcançar os alvos moleculares, que são primariamente intracelulares. Para isso, o antimicrobiano, em quantidades suficientes, precisa ultrapassar a membrana celular bacteriana; 2-devem interagir com uma molécula alvo de modo a desencadear a morte da bactéria; 3-devem evitar a ação das

bombas de efluxo que jogam os antimicrobianos para fora da célula bacteriana; 4- devem evitar a inativação por enzimas capazes de modificar o antimicrobiano no ambiente extracelular ou no interior da célula (JACOBY, 2005).

Com frequência bactérias utilizam mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos; assim, a ação conjunta de múltiplos mecanismos pode produzir um acentuado aumento da resistência aos antimicrobianos. A resistência a determinado antimicrobiano pode constituir uma propriedade intrínseca de uma espécie bacteriana ou uma capacidade adquirida. Para adquirir resistência, a bactéria deve alterar seu material genético, que ocorre de duas formas: indução de mutação no DNA nativo e introdução de um DNA estranho (genes de resistência) que podem ser transferidos entre gêneros ou espécies diferentes de bactérias (LIVERMORE et al., 2001).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos são descrito por Livermore e cols. (2001) como sendo 4 (ilustrados na Figura 3):

1- Alteração de permeabilidade

A permeabilidade limitada constitui uma propriedade da membrana celular externa de lipopolissacarídeo das bactérias Gram-negativas. A permeabilidade dessa membrana reside na presença de proteínas especiais, as porinas, que estabelecem canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula.

2- Alteração do sítio de ação do antimicrobiano

A alteração do local-alvo onde atua determinado antimicrobiano, de modo a impedir a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência. As bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo produto resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original. *S. aureus* resistente à oxacilina e estafilococos coagulase-negativos adquiriram o gene cromossômico Mec A e produzem uma proteína de ligação da penicilina (PBP ou PLP) resistente aos β -lactâmicos, denominada 2a ou 2', que é suficiente para manter a integridade da parede celular durante o crescimento, quando outras PBPs essenciais são inativadas por antibíomicrobianos β -lactâmicos. Alternativamente, um gene recém-adquirido pode atuar para modificar um alvo, tomando-o menos vulnerável a determinado antimicrobiano. Assim, um gene transportado por

plasmídeo ou por transposon codifica uma enzima que inativa os alvos ou altera a ligação dos antimicrobianos como ocorre com eritromicina e clindamicina.

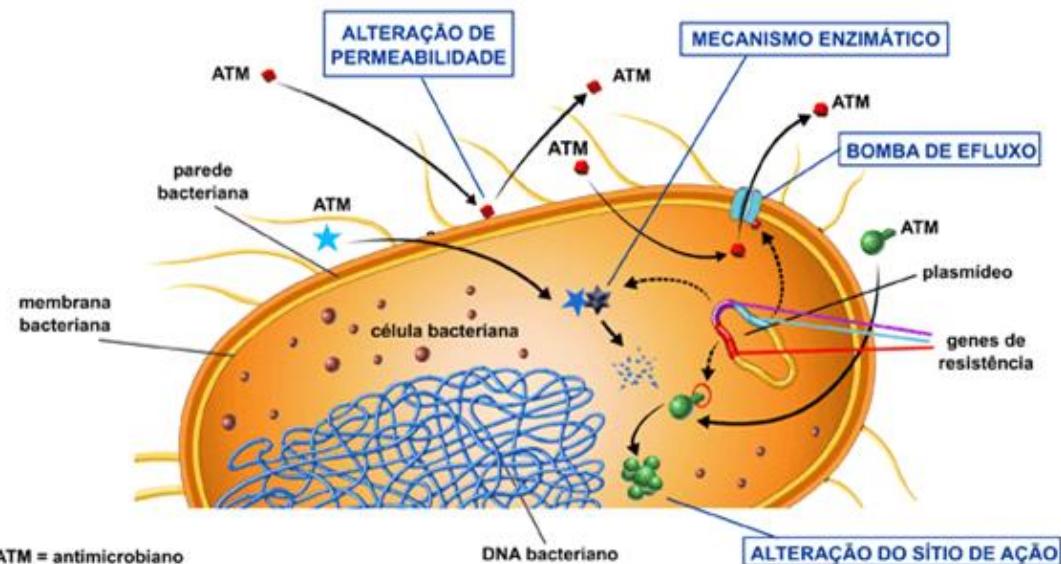
3- Bomba de efluxo

O bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, isto é, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos.

4- Mecanismo enzimático

O mecanismo de resistência bacteriana mais importante e freqüente é a degradação do antimicrobiano por enzimas. As β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo, assim, o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se às PBPs bacterianas e através do qual exercem seu efeito antibacteriano. Foram descritas numerosas β -lactamases diferentes. Essas enzimas são codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos através de plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou ser induzido. A resistência quase universal de *S. aureus* à penicilina é mediada por uma β -lactamase induzível, codificada por plasmídeo.

Figura 3- Ilustração esquemática dos mecanismos de resistência bacteriana.



Fonte:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaudre/controlerede_rm/cursos/rm_controle/oopa_web/modulo3/mec_animacao.htm> Acessado: 13/05/2016.

2.4 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana

2.4.1 Método de diluição em caldo

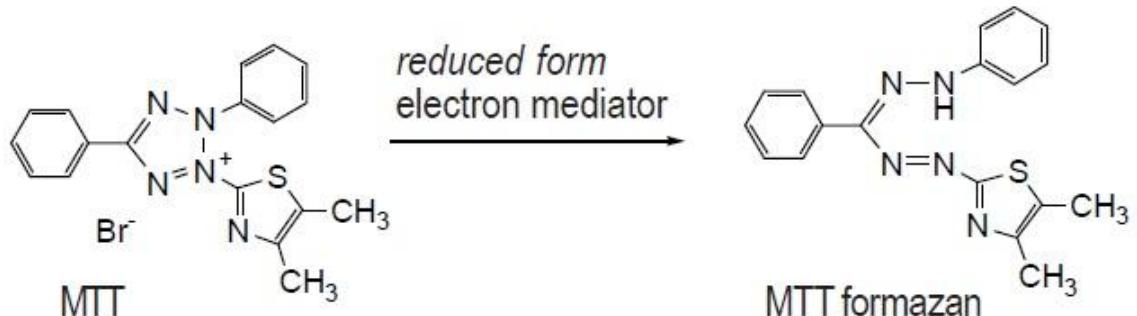
A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada de “micro” porque os testes são realizados em volumes reduzidos em pequenos poços de uma placa que contém 96 deles.

O método de diluição em caldo é empregado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a concentração inibitória mínima (CIM) (MURRAY, 1999). As CIMs são consideradas excelentes ferramentas para determinar a suscetibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos e, portanto usadas para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade (ANDREWS, 2001).

Os fatores primários que influenciam nos valores de CIM no método de diluição em caldo são os mesmos tanto para a técnica de macrodiluição como para a microdiluição, ou seja, a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento bacteriano (CHIRISTOFILOGIANNIS, 2000).

A leitura dos resultados pode ser feita tanto por meio de uma leitora de microplacas como visualmente com o auxílio de um indicador de viabilidade celular. Este indicador pode ser o sal brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) que muda de coloração do amarelo para o violeta (MTT-formazana) quando é reduzido por enzimas metabólicas presentes apenas em células viáveis (Figura 4) (MOSMANN, 1983).

Figura 4- Reação de redução do MTT (amarelo) para MTT-formazana (violeta).



O material celular presente nos poços em que não houve crescimento microbiano pode ser cultivado em meio sólido livre da droga para determinar a concentração bactericida mínima (CBM). A menor concentração testada em que não houve crescimento microbiano é denominada CBM (TORTORA et al., 2005).

2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A região do infravermelho no espectro estende-se desde a região do visível até a região das microondas. A característica básica desta região é que sua radiação é originada de emissões térmicas de uma fonte aquecida. Convencionalmente é medida em números de onda (cm^{-1}) que vai de 10 até 10000 cm^{-1} , porém, a região de maior interesse fica entre 400 a 4000 cm^{-1} (NAUMANN, 2000).

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de bactérias são padrões semelhantes a impressões digitais que são altamente reprodutíveis e característicos de cada bactéria. Eles mostram contornos gerais e complexos ao invés de picos distintos (NAUMANN et al., 1988a). Isto significa que a maioria da informação está oculta por trás das bandas do espectro. Desde que células intactas são analisadas, o espectro de FTIR de bactérias são imagens que dão informações sobre a composição química total da célula (proteínas, membranas, parede celular, ácidos nucléicos, etc) (HELM et al., 1990).

O espectro de infravermelho de células microbianas intactas fornece informações altamente específicas, as quais são usadas para diferenciar, classificar e identificar diversas espécies e linhagens microbianas. A análise no infravermelho de microrganismos também é útil na detecção *in situ* de componentes intracelular ou estruturas como corpos de inclusão, compostos de armazenamento, e endósporos;

no monitoramento e quantificação do gás carbônico metabólico liberado em resposta a vários substratos diferentes; e na caracterização da interação célula-droga (NAUMANN, 2000).

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido recentemente usada para identificar e diferenciar microrganismos quanto a espécies e até mesmo quanto a linhagens com base nos dados espectrais. Alguns estudos demonstram o emprego do FTIR no estudo de danos causados em bactérias por vários fatores como aquecimento ou resfriamento, aplicação de ultrassom e tratamento químico (AL-QADIRI et al., 2008 a/b; LIN et al., 2004).

3 OBJETIVOS

Avaliar a influência do pH no potencial antimicrobiano de ramnolipídeos sobre linhagens de *Staphylococcus aureus*.

3.1 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações inibitórias mínimas e as concentrações bactericidas mínimas de ramnolipídeos sobre as linhagens de *S. aureus* em diferentes valores de pH.
- Observar a ação dos ramnolipídeos sobre o crescimento microbiano por meio da construção de curvas de sobrevivência.
- Avaliar a ação do biossurfatante sobre as linhagens de *S. aureus* por meio de espectroscopia na região do infravermelho.

4 METODOLOGIA

4.1 Meios de cultura

O meio de cultura líquido utilizado foi o TSYEB preparado na proporção de 3 g : 0,6 g : 100 mL (TSB: YE: água destilada). Os meios com pH de (6,0; 7,0 e 8,0) \pm 0,2 foram ajustados com tampão fosfato. O meio de pH 5,0 \pm 0,2 foi ajustado com soluções de HCl e NaOH 0,2 mol L⁻¹.

O meio sólido utilizado foi o TSYEA preparado na proporção de 40 g : 6 g : 1000 mL (TSA : YE : água destilada) e pH ajustado com soluções de HCl e NaOH 0,2 mol L⁻¹ para 7,3 \pm 0,2.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min.

4.2 Tampão fosfato

Para o ajuste do pH desejado utilizou-se uma mistura das soluções de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) 0,1 mol L⁻¹ (A) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 0,1 mol L⁻¹ (B) nas proporções da Tabela 1. Completou-se o volume para 200 mL com água destilada e ajustou-se para o pH desejado com soluções de HCl e NaOH 0,2 mol L⁻¹.

Tabela 1. Proporções das soluções de fosfato para tamponamento dos meios.

pH	6,0	7,0	8,0
A (mL)	86,8	39,0	5,3
B (mL)	13,2	61,0	94,7

4.3 Microrganismos

Foram utilizadas 3 linhagens de *S. aureus*: ATCC 8095, ATCC 25923 e cepa campo.

Todos os testes foram realizados a partir de culturas armazenadas em freezer a -20°C em caldo TSYEB preparado com 20% de glicerol.

4.4 Padronização dos inóculos

Os inóculos para os testes de microdiluição partiram de dois cultivos subsequentes de 24 horas incubados em estufa a 37°C. Primeiramente, a partir do estoque a -20°C, inoculou-se as culturas em placas de TSYEA. Após 24 h transferiu-se algumas colônias do primeiro cultivo para novas placas de TSYEA e cultivou-as por mais 24 h. Posteriormente, foram coletadas, com alça esterilizada, alíquotas das colônias que foram diluídas em solução salina (NaCl 0,86%) até que se obtivesse uma densidade ótica (DO) entre 0,09 e 0,11, o que corresponde a aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹. Para serem utilizadas nos experimentos, procedeu-se uma diluição no fator de 10, ou seja, o inóculo inicial partiu de uma concentração de 10^6 UFC mL⁻¹.

4.5 Ramnolipídeos

Utilizou-se o biossurfatante RL comercial (Rhamnolipid Inc.) em solução de 25%. Para os testes de microdiluição os RL foram preparados inicialmente na concentração de 5000 mg L⁻¹ em meios TSYEB ajustados com seus respectivos valores de pH de análise. Esta solução foi filtrada em microfiltro com poros de 0,22 µm.

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima

Para a determinação da CIM foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo segundo metodologia estabelecida pela Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI M7-A6 de 2003 (WOODS e WASHINGTON, 1995).

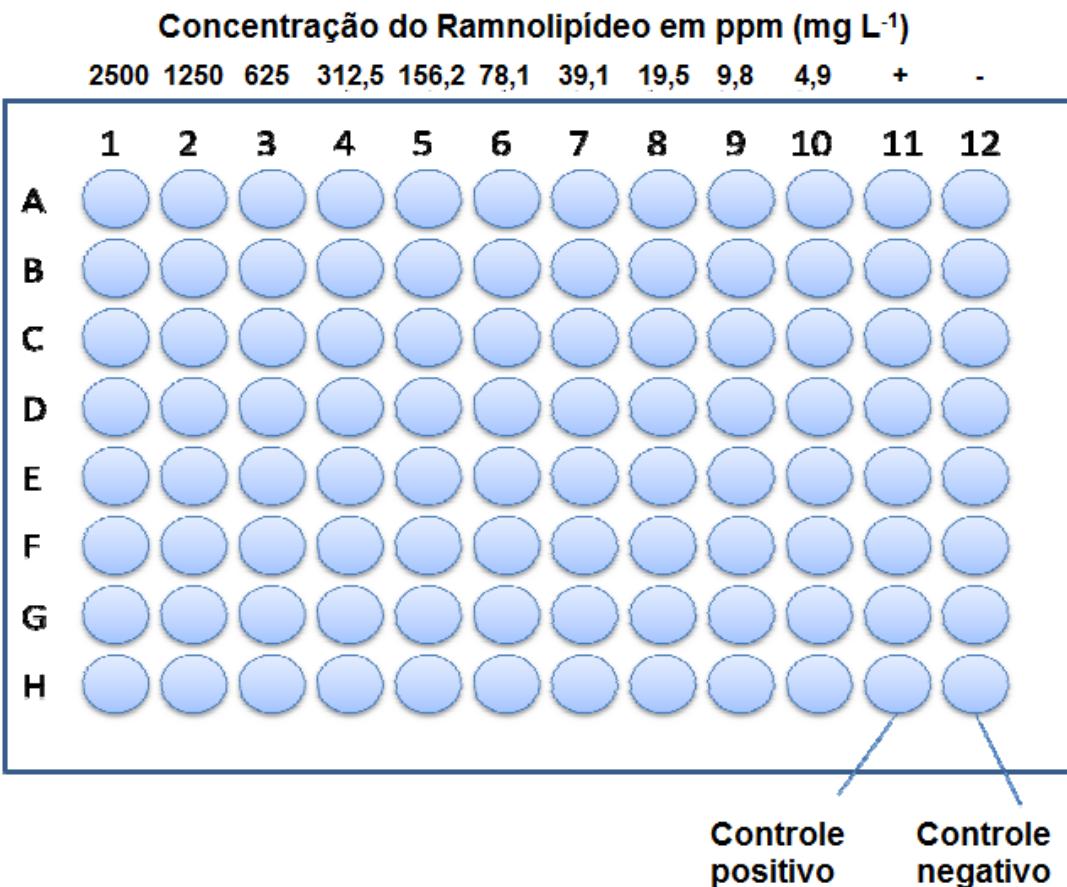
Primeiramente todos os 96 poços da microplaca foram preenchidos com 100 µL do meio líquido TSYEB. Em seguida, coletou-se 100 µL da solução contendo o RL (5000 mg L⁻¹) com micropipeta multicanal e misturou-se essa solução na primeira coluna da placa. Desta primeira coluna coletou-se 100 µL de seu conteúdo e transferiu-o para a próxima coluna, misturando-se o meio novamente. Estes passos foram seguidos sucessivamente até a coluna 10 da placa, conservando as duas últimas colunas sem RL com exceção dos quatro primeiros poços da 12^a coluna,

onde foi adicionado RL na mesma proporção da 1^a coluna. Deste modo obteve-se uma placa cuja primeira coluna apresentava uma concentração de RL de 2500 mg L⁻¹ e as seguintes até a coluna 10 apresentando sempre a metade da concentração anterior. As colunas de 1 a 11 foram adicionadas de 20 µL do inóculo padronizado. A coluna 11 foi o controle positivo, onde somente continha inóculo, sem RL. A coluna 12 foi o controle negativo, ou seja, ausência de inóculo (Figura 5).

Após o período de incubação a 37°C por 24h fez-se uma análise visual de cada poço a fim de constatar se houve inibição de crescimento em algumas das colunas. Nas colunas que houve inibição foi aplicada posteriormente a técnica de determinação da CBM.

Para favorecer a análise visual adicionou-se 20 µL de solução de MTT 1g L⁻¹, que indicou a atividade metabólica celular nos poços em que surgiu a coloração violeta.

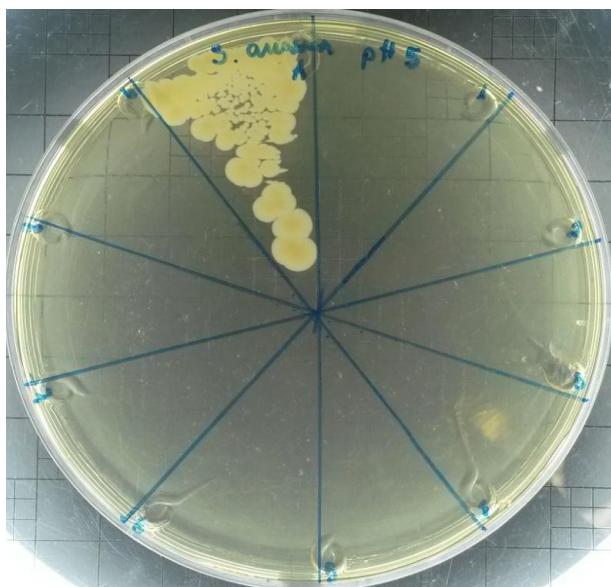
Figura 5- Ilustração de microplaca de 96 poços utilizada nas determinações de CIM.



4.7 Determinação da concentração bactericida mínima

Para as concentrações de RL que não apresentaram crescimento no teste de CIM foram realizadas análises de CBM. Parte do material destes poços foi coletada com o auxílio de uma alça esterilizada e transferida por meio de esfregaço a regiões delimitadas de placas de TSYEA pH $7,3 \pm 0,2$, incubando-as a 37°C por 24 h. A CBM foi designada pela visualização da região de maior concentração em que não houve crescimento microbiano, conforme representado pela Figura 6.

Figura 6- Imagem de uma placa de determinação de CBM. Cada seção da placa corresponde a um poço do ensaio de CIM, partindo do poço 1 até o 10 no sentido horário.



4.8 Análise dos resultados

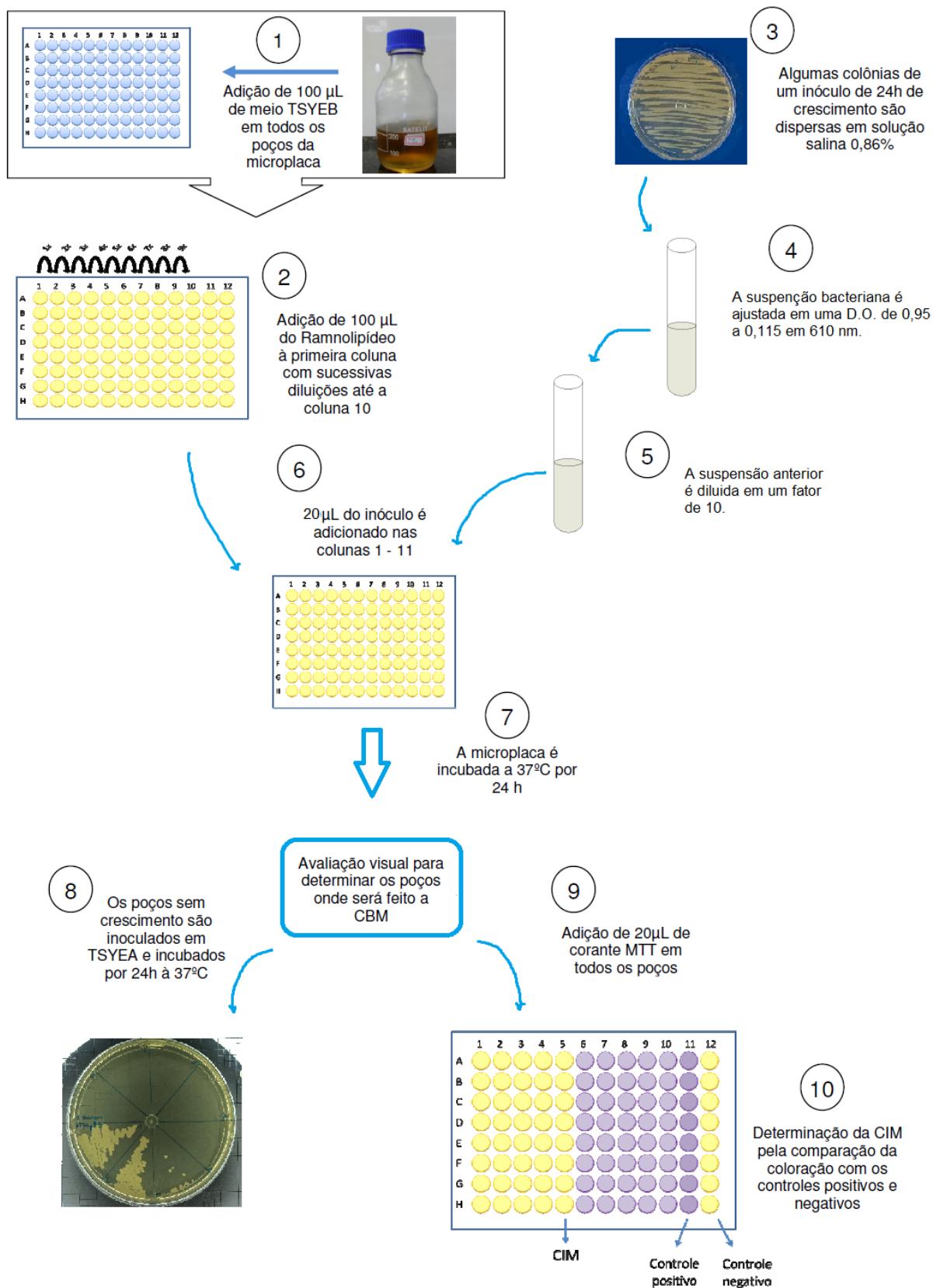
Nas determinações de CIM todos os resultados foram confrontados com controles positivos (presença de cultura bacteriana sem tratamento) e controles negativos (ausência de inóculo). A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano em relação ao controle positivo. A técnica de microdiluição em caldo foi suplementada pela determinação da CBM. Representação esquemática ilustrada pela Figura 7.

A CBM foi atribuída à menor concentração que não propiciou a formação de colônias na placa. Nos casos em que foram constatadas CIM, porém, após

transferência para o meio sólido, houve crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas, atribuiu-se ao antimicrobiano naquelas condições a denominação de bacteriostático.

Os ensaios foram realizados em duplicata com no mínimo quatro repetições independentes. Os resultados foram expressos como a moda das repetições.

Figura 7- Representação esquemática dos procedimentos utilizados para a determinação de CIM e CBM.



4.9 Curva de sobrevivência

Para realização das curvas de sobrevivência foram reproduzidas em macro-escala as condições dos poços nos quais foram determinadas as CIMs em micro-escala, ou seja, o preparo das culturas seguiu os mesmos procedimentos descritos na seção 4.7.

Primeiramente padronizou-se os inóculos com DO entre 0,09 e 0,11 e realizou-se uma diluição desta suspensão de 1:10 (v/v). Em um tubo de ensaio, 1 mL desta suspensão diluída foi inoculada em 5 mL de TSYEB tamponado no pH de interesse para a curva controle (sem tratamento) e em outro tubo, o mesmo volume desta mesma suspensão foi inoculada em 5 mL de TSYEB contendo RL na CIM (com tratamento). As culturas foram mantidas em estufas na temperatura de 37°C até o final do experimento.

Em intervalos determinados de tempo (0, 2, 4, 7 e 24 h), uma alíquota de 0,5 mL foi coletada de ambas as culturas (com e sem tratamento) e transferidas para outros tubos contendo 4,5 mL de solução salina 0,86%. A partir desta diluição (10^{-1}) foram realizadas diluições progressivas (10^{-2} , 10^{-3} , ...) de forma análoga a primeira, sempre agitando-se a cultura vigorosamente (vortex) antes de cada coleta para diluição.

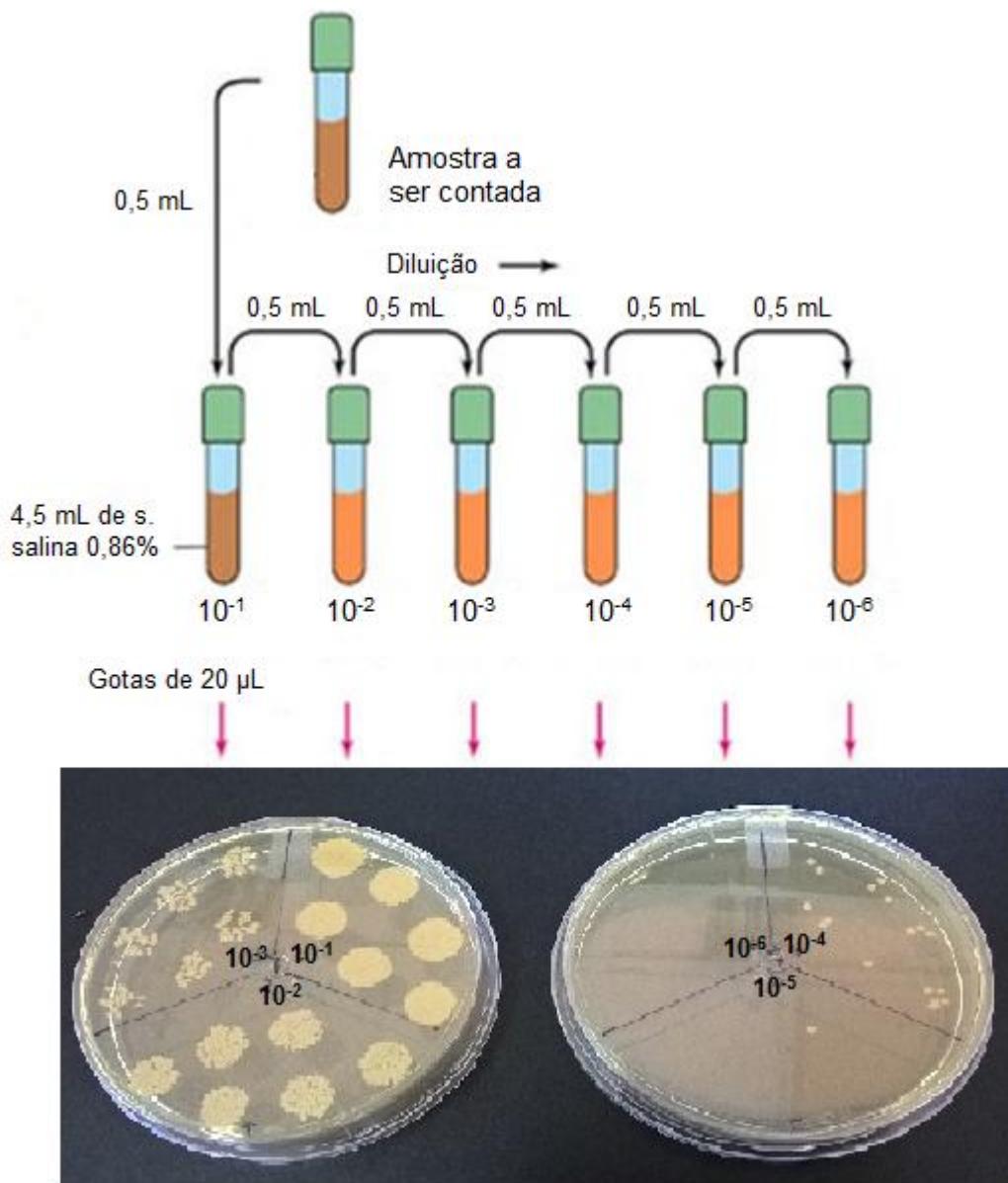
De cada diluição foram coletadas gotas de 20 μ L que foram então transferidas para placas TSYEA, para posterior contagem das UFC em cada gota (Figura 8), conforme método da gota, sugerido por Miles e Mirras (1938). As placas de TSYEA foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h para crescimento das colônias.

Este procedimento foi realizado simultaneamente para as culturas com e sem tratamento para cada intervalo de tempo citado acima.

As curvas de crescimento foram realizadas apenas para as linhagens ATCC 8095 e ATCC 25923 de *S. aureus* e nos valores de pH de 5, 6 e 7. Na curva com tratamento para o pH 5 foi utilizado o dobro da concentração do valor da CBM (39,1 mg L⁻¹). Para o pH 6, foi utilizada a CIM (39,1 mg L⁻¹) e a concentração inicial de análise (2500 mg L⁻¹). Para o pH 7, como não houve CIM, foi utilizado o dobro da maior concentração analisada, 5000 mg L⁻¹.

As contagens de UFC por gota foram realizadas nas seções em que havia entre 5 e 50 UFC por gota. Este número, por meio de cálculos, foi transformado para UFC por mL para construção da curva.

Figura 8- Representação esquemática dos procedimentos para realização das curvas de sobrevivência.



4.10 Espectroscopia na região do infravermelho

As análises de FTIR foram realizadas para as linhagens ATCC 8095 e ATCC 25923 em pH 6 e 7.

Foram realizadas duas culturas subsequentes de 24 h, incubadas em estufa a 37°C, em meio sólido TSYEA tamponado com tampão fosfato nos respectivos valores de pH de interesse.

O material celular da segunda cultura foi suspenso com tampão fosfato. Esta suspensão foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm. Descartou-se o sobrenadante.

A massa celular (*pellet*) foi adicionada de tampão fosfato e submetida a agitação (vortex). Padronizou-se a concentração celular desta solução ajustando-se sua DO para $2,0 \pm 0,1$. Este conteúdo foi dividido entre dois tubos, dos quais um recebeu tratamento com RL e o outro foi usado como controle. Em pH 6 as amostras foram tratadas com RL na concentração de $39,1 \text{ mg L}^{-1}$. Em pH 7 a concentração de RL foi de 5000 mg L^{-1} . Os tubos foram incubados em banho termostático por 24 h a 37°C .

Realizou-se duas lavagens com água milli-Q, e posteriormente o material foi levado a estufa por 18 h a 65°C para secagem.

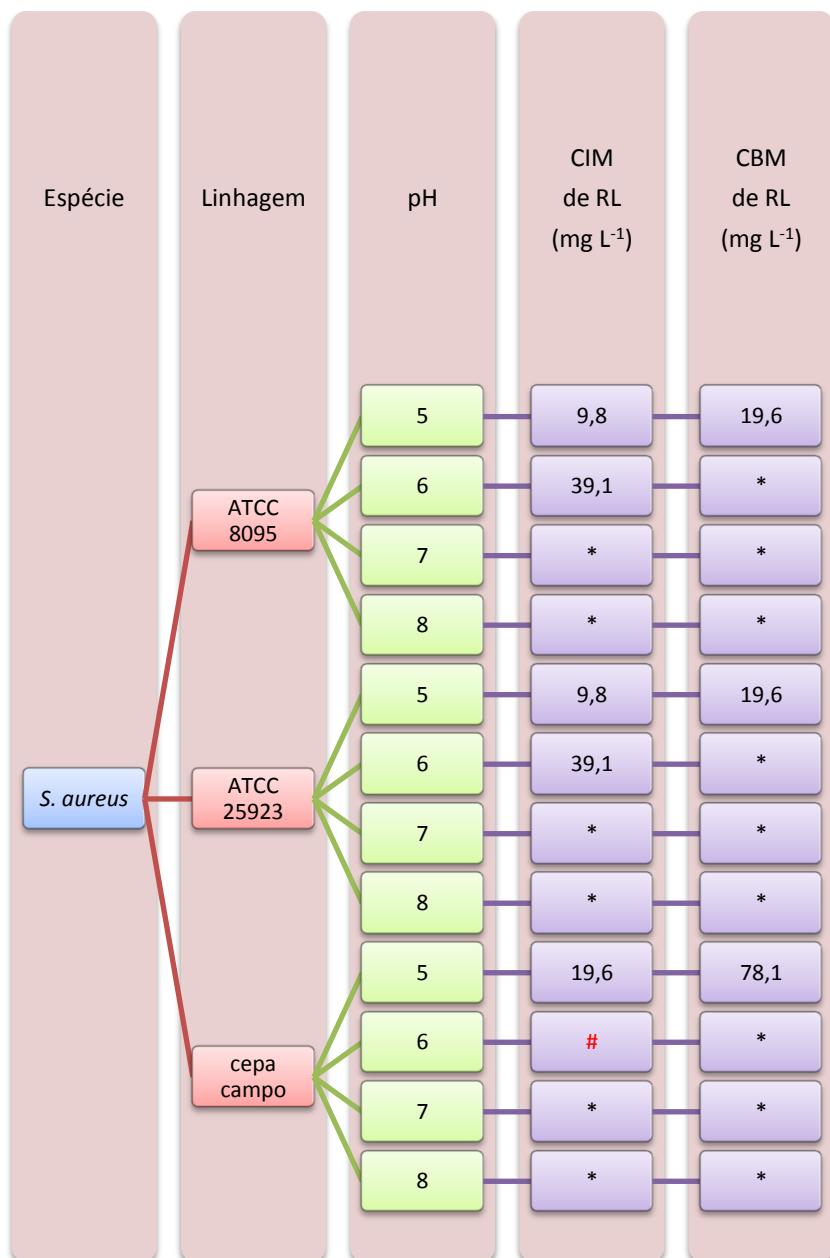
Os *pellets* depois de secos foram macerados com brometo de potássio (KBr) anidro e prensados para formação de uma pastilha para análise em espectrômetro FTIR. As análises foram feitas em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Shimadzu), no intervalo de abrangência espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , em modo de transmitância, com resolução de 4,0 e 32 scans por amostra. As análises foram realizadas no aparelho disponibilizado pelo Prof. Victor Deflon, presente no laboratório de Química Inorgânica Estrutural e Biológica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade antimicrobiana dos ramnolipídeos

Os valores de CIM e CBM de RL sobre as três linhagens de *S. aureus* analisadas (ATCC 8095, ATCC 25923 e cepa campo) em diferentes valores de pH (5, 6, 7 e 8) estão presentes no organograma representado pela Figura 9.

Figura 9- Valores de CIM de RL sobre *S. aureus* em diferentes valores de pH. *Não foi observada CIM e CBM dentro do intervalo de concentrações analisado. # Inibição somente na concentração 156,2 mg L⁻¹.



Pelas análises de CIM e CBM foi constatado que em pH menores o efeito antimicrobiano dos RL é mais pronunciado do que em pH neutro ou alcalinos. Em pH 5, uma concentração de $9,8 \text{ mg L}^{-1}$ de RL é suficiente para inibir o crescimento bacteriano das cepas ATCC 8095 e ATCC 25923. Neste mesmo pH, para as mesmas cepas, o dobro desta concentração, ou seja, $19,6 \text{ mg L}^{-1}$ de RL já passa a atuar como bactericida.

O crescimento destas linhagens em pH 6 foi inibido pelos RL em uma concentração de $39,1 \text{ mg L}^{-1}$, porém neste pH, dentro das concentrações analisadas, os RL não demonstraram possuir poder bactericida.

A cepa campo mostrou-se mais resistentes que as outras linhagens frente aos RL. Dentro do intervalo de concentrações analisadas, somente em pH 5 os RL mostraram poder bacteriostático em uma concentração de $19,6 \text{ mg L}^{-1}$ e bactericida em $78,1 \text{ mg L}^{-1}$. Porém, em pH 6 esta cepa não apresentou comportamento convencional. Neste pH houve uma inibição somente na concentração de $156,2 \text{ mg L}^{-1}$, em concentrações menores houve crescimento, assim como em concentrações maiores (Figura 10).

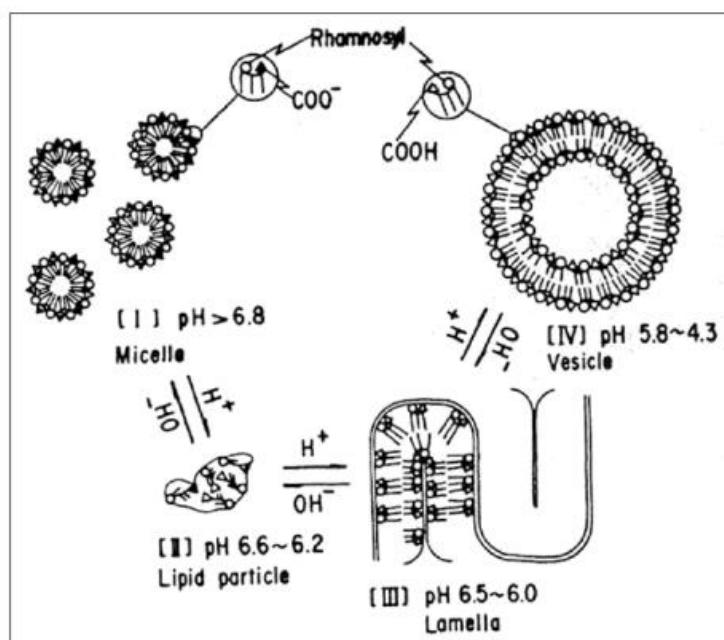
Figura 10- Microdiluição de cepa campo em pH 6. Em destaque coluna de concentração de $156,2 \text{ mg L}^{-1}$.



Pelas comparações dos valores de CIM e CBM da cepa campo com os das outras linhagens observou-se sua maior resistência aos RL, a partir disso, pode-se

inferir que um maior número de moléculas de RL é necessário para causar injúria à cepa campo. Na concentração de 156,2 mg L⁻¹, como aponta estudo (SÁNCHEZ et al., 2007), os RL encontra-se próximo de sua CMC (50 a 200 mg L⁻¹). Acima desta concentração, os monômeros de RL passam a se agregar e formar micelas, diminuindo o número de moléculas livres para atuar nas células bacterianas. Evidenciando que a forma de agregação das moléculas de RL, que podem formar tanto, vesículas como lamelas ou micelas (Figura 11), como aponta estudo de Ishigami e cols. (1987); pode exercer influência na atividade antibacteriana de RL.

Figura 11- Ilustração esquemática de conversões sensíveis a pH de agregados moleculares de RL.

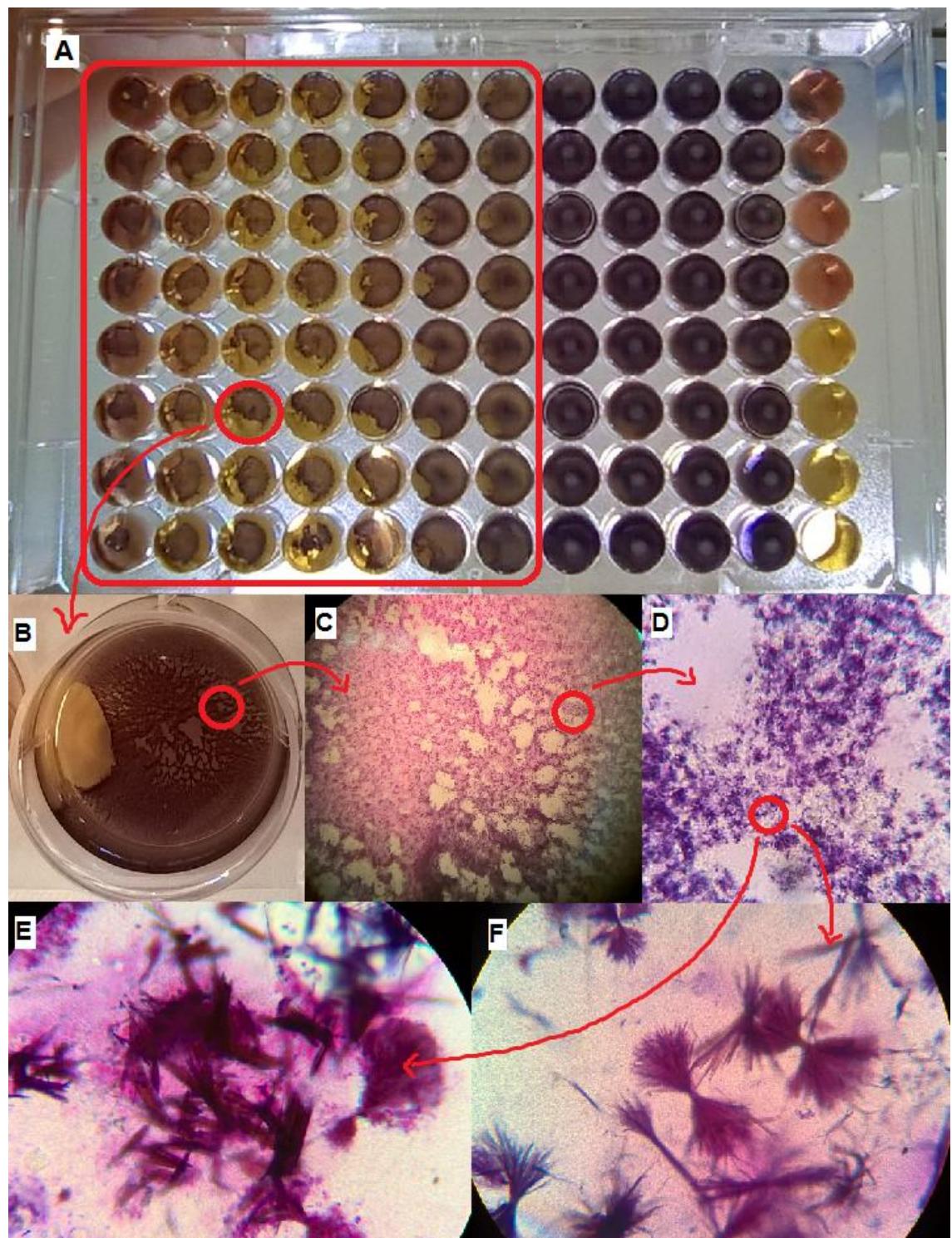


Fonte: Ishigami et al., 1987.

Nos outros valores de pH, de forma análoga ás outras linhagens, o agente não apresentou poder inibitório nem bactericida.

Em pH 7 e 8, não foi evidenciada CIM e CBM, entretanto um comportamento anômalo foi notado no crescimento celular bacteriano, principalmente em concentrações mais elevadas de RL. Nestes casos, o material celular, ao invés de formar um depósito de células soltas no fundo côncavo dos poços, como esperado, formou uma estrutura espalhada e agregada nas paredes dos poços. Por meio de microscopia ótica verificou-se que essa estrutura era devida a formações de cristais (Figura 12), os quais não foram observados em outras condições.

Figura 12- Imagem da estrutura formada nos ensaios de CIM. A) microplaca de 96 poços com ensaio de cepa campo em pH 7. B) Ensaio reproduzido em poços maiores. C) Visualização em lupa (10x). D) Visualização em microscópio ótico (20x) E) e F) ampliações de 1000x.



Uma hipótese para explicação deste fenômeno pode ser embasada no proposto por Sotirova e cols. (2008), que sugeriu que os RL apresentam poder de solubilizar proteínas de membrana celular. Compostos anfifílicos podem ser capazes, por meio de interações hidrofóbicas, de interagir com partes apolares de proteínas. Se essa interação for mais forte que a estabelecida com os fosfolipídios de membrana, essa proteína pode ser removida pelo surfatante, formando um complexo surfactante-proteína, estabilizado pela solvatação das regiões polares do surfactante por moléculas de água (ALBERTS et al., 2010). Esta estabilização proporcionada com as condições específicas necessárias descrita por von Hippel & Schleich (1969) como temperatura, pH, presença de sais, competidores de ligações de hidrogênio, aditivos hidrofóbicos (surfatantes) e solventes orgânicos; tornou possível a cristalização destes complexos RL-proteína.

Como será evidenciado pela técnica da curva de sobrevivência, a formações destes cristais interferiram na ação antimicrobiana dos RL.

As determinações de CIM e CBM evidenciaram que em pH menores o efeito antibacteriano dos RL é favorecido. Como aponta o estudo de Ishigami e cols. (1987) o pKa dos RL é em torno de 5,6 e como menciona Sen (2010) em pH 4,0 uma porcentagem de 97,5 das moléculas de diRL, estão protonadas, na forma neutra. E em pH 7,4 98,4% estão na forma aniónica (desprotonada). Com base nesta informação pode-se inferir que a forma mais ativa dos RL é a forma neutra, pois esta não promove repulsão à carga negativa promovida pelos grupos fosfato da bicamada lipídica, a qual pode ser permeada mais facilmente pelos RL. Sendo assim, o tratamento em pH 5 se mostrou mais eficaz, seguido do 6.

Isso torna a aplicação dos RL em alimentos muito promissora, pois como mencionado por (RAY, 2000), a maioria dos alimentos é levemente ácida, e é justamente esta classe de alimentos que é foco de contaminação por *S. aureus*, como carnes e derivados, peixe, leite, ovo e a maioria dos vegetais.

5.2 Curvas de sobrevivência

As curvas de sobrevivência foram realizadas para as duas linhagens nas quais a ação antimicrobiana dos RL foi mais pronunciada, ou seja, as cepas ATCC 8095 e

ATCC 25923, no pH 6 e 7, a fim de elucidar a diferença no comportamento inibitório dos RL nestes valores de pH (Figuras 13 e 14).

Figura 13- Curva de sobrevivência de *S. aureus* ATCC 8095 em pH 6 e 7.

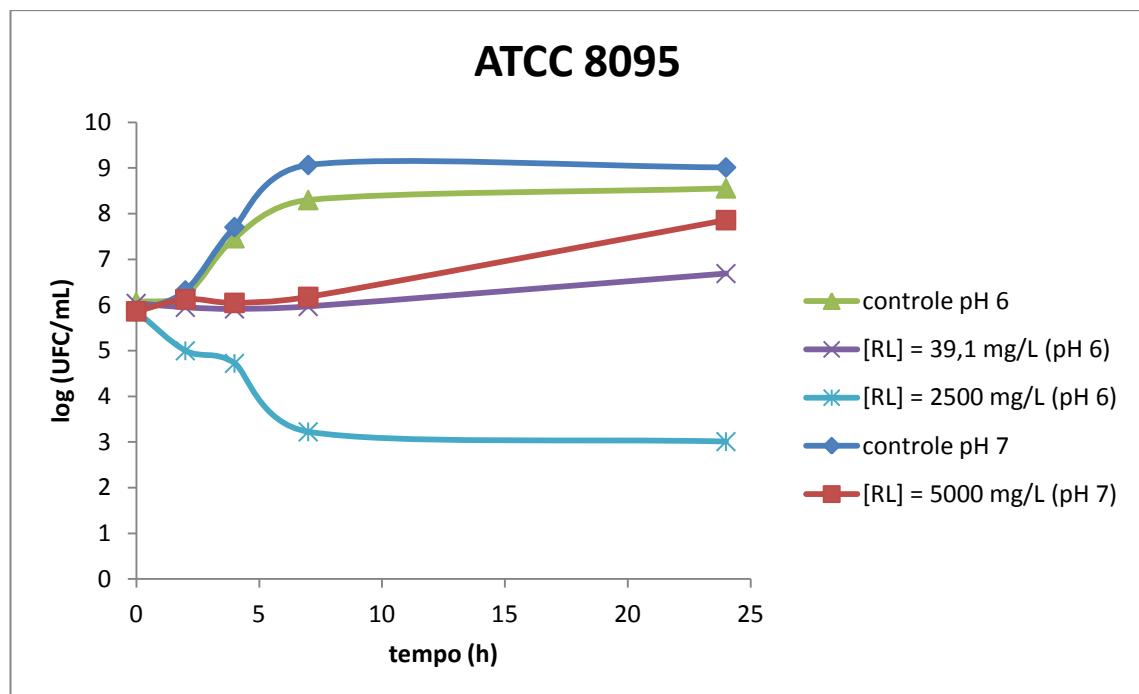
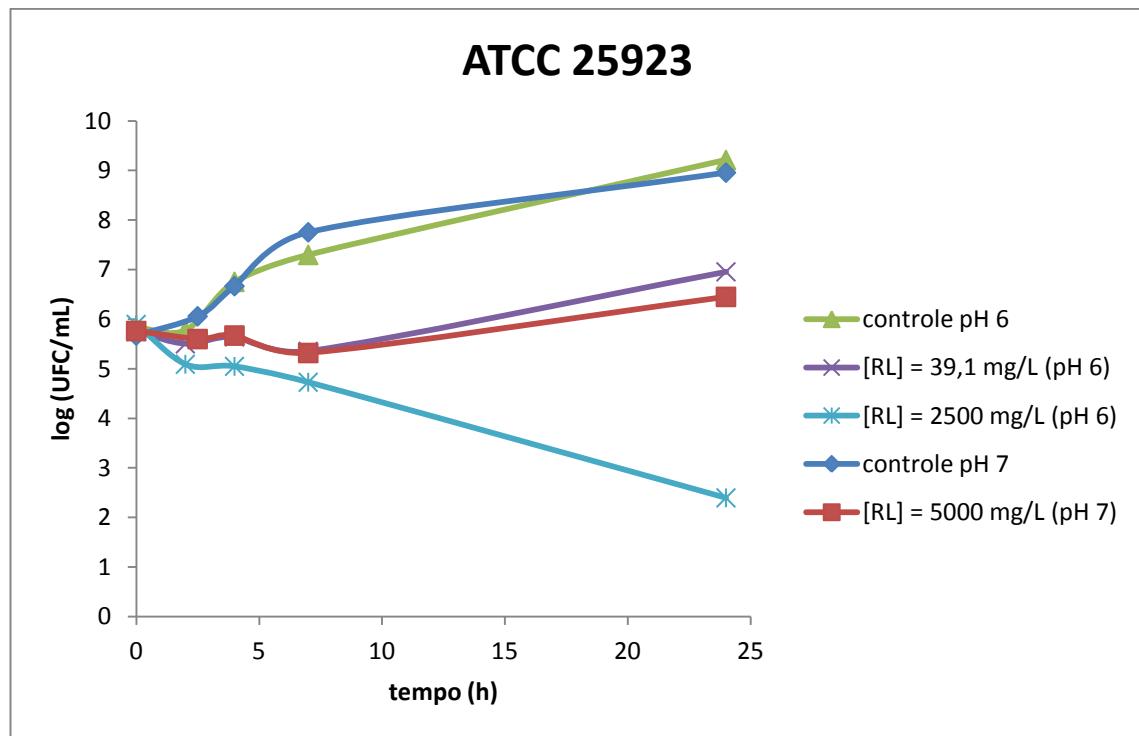


Figura 14- Curva de sobrevivência de *S. aureus* ATCC 25923 em pH 6 e 7.



Nas curvas controle nota-se o comportamento típico de crescimento bacteriano. Nas primeiras duas horas não há crescimento acentuado (fase lag); das 2 as 7 horas há um crescimento exponencial (fase log) e das 7 as 24 horas tem-se a fase estacionária, quando o número de novas células se equilibra com o de morte celular. Porém quando submetido a tratamento com RL há uma mudança no perfil das curvas.

Pela análise das curvas fica evidente a influência do pH na ação dos RL. Nota-se que em pH 7 é necessária uma concentração 128 vezes maior de RL para obter-se nível de inibição semelhante ao de pH 6 (comparação das curvas roxa e vermelha).

Nota-se também a influência da concentração na ação antibacteriana dos RL. Em pH 6 foram realizados ensaios em duas concentrações, $39,1\text{mg L}^{-1}$ (CIM) e 2500 mg L^{-1} (comparação das curvas roxa e azul). Confrontando as duas curvas, nota-se que na maior concentração houve acentuado morte da população, evidenciado pelo declínio das curvas nestas condições.

A construção das curvas de sobrevivência em pH 6 na concentração de 2500 mg L^{-1} revelou que RL apresentam poder bactericida, pois diferiu em mais de 3 unidades logarítmicas decimais da curva controle, o que reverte em um número de morte celular superior a 99,9% (SCHAWLBE et al., 2007).

Principalmente em pH 7 nota-se nas curvas que após 7 horas de incubação, *S. aureus* adquiriu uma certa resistência a ação dos RL. A partir deste momento passa a ser notada a formação do agregado de estrutura cristalina. Por conseguinte, pode-se inferir que há uma associação entre a formação desta estrutura e a resistência adquirida.

O'Halloran e cols. (2015) demonstraram que *S. aureus* utiliza como estratégia de evasão de agentes imunológicos a liberação de fragmento da Proteína A (SpA), proteína de superfície presente apenas em *S.aureus*, que é um dos fatores de virulência da espécie. A redução de sua liberação se dá quando o sinal de triagem nativo da SpA é substituído pela região correspondente de outra proteína homóloga a SdrE. Isto explica a grande quantidade de cristais de proteína formada no meio de cultura contendo RL. Como estratégia de defesa bacteriana, os fragmentos de SpA vão sendo liberados e consequentemente complexados pela interação com as moléculas de RL, bem como sua homóloga responsável pela redução de sua liberação. A formação deste agregado, favorecida pelas condições específicas

complexas do meio, torna-se possível a cristalização destas estruturas, como pode ser visualizado por microscopia (Figura 12, E e F). A formação destes cristais faz com que a concentração de RL disponível no meio vá se reduzindo, até um ponto em que as células bacterianas não sejam mais afetadas por sua ação e continuem crescendo.

Isso é muito bem evidenciado pelas curvas de sobrevivência onde até às 7 horas de incubação demonstram inibição, refletindo, neste intervalo, o esforço bacteriano em se defender da ação dos RL, enquanto o biossurfactante ainda está presente solúvel em concentrações elevadas. Porém a partir das 7 horas de incubação nota-se o crescimento bacteriano, sugerindo que a partir daí as moléculas de RL livres para atuarem nas células vão se reduzindo por formarem complexos com proteínas.

5.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelhos de material celular fornecem informações referentes à fosfolipídeos e proteínas de membrana, polissacarídeos de parede celular, proteínas e lipídeos citoplasmáticos e ácidos nucléicos (AL-QADIRI *et al.*, 2006b). Cada material celular apresenta um padrão de bandas peculiar que permite seu estudo. O material celular de *S. aureus*, apresentam dez bandas principais, quatro agrupadas entre 3500 e 2800 cm^{-1} , e mais seis entre 1700 e 1000 cm^{-1} . A região entre 900 e 400 cm^{-1} é denominada “*fingerprint*”, a qual contém uma série de bandas aglomeradas. Esse grande número de bandas nessa região se deve a todas as possibilidades de deformações angulares das ligações das moléculas presentes nas amostras, e por se concentrarem em um curto intervalo de número de onda, se sobrepõem umas as outras, imprimindo um aspecto de uma única banda alargada, principalmente quando se trata de uma amostra multicomponente, como o material celular.

A classificação das bandas foi baseada no proposto por Naumann (2000).

Na primeira porção do espectro há uma banda alargada característica centrada em torno de 3300 cm^{-1} e é um conjunto de sobreposições de bandas referentes a deformações axiais de grupamentos N-H de proteínas, O-H polissacarídeos e água.

As bandas em números de onda entre 3000 e 2800 cm⁻¹ representam a região dos lipídeos, nela há três bandas, uma em ~2960 cm⁻¹ referente a deformações axiais assimétricas de C-H de grupos alquils; outra em ~2925 cm⁻¹ atribuída a deformações axiais assimétricas de C-H de carbonos secundários; e a última em ~2854 cm⁻¹ referentes a deformações axiais simétricas dos grupos mencionados anteriormente.

As quatro bandas seguintes entre 1650 e 1390 cm⁻¹ correspondem a funções presentes em proteínas. A banda em ~1655 cm⁻¹ é atribuída a amidas primárias de proteínas α -hélice e folha- β , proteínas de estrutura secundária, sendo esta frequentemente a banda mais proeminente em espectros de infravermelho de bactérias. Em ~1540 cm⁻¹ há a banda característica de amidas secundárias, atribuídas as vibrações das ligações N-H de proteínas. As duas próximas bandas são referentes a deformações angulares de ligações C-H de carbonos secundários em proteínas e deformações axiais de C=O de grupos carboxilas de proteínas, respectivamente em ~1454 e ~1395 cm⁻¹.

A banda em ~1232 cm⁻¹ é atribuída a deformações axiais assimétricas de P=O que podem ser provenientes de grupos fosfodiésteres, fosfato livre e também de grupos funcionais monoéster de fosfato. Tais grupos estão presentes nos fosfolipídeos de membrana e carboidratos contendo fósforo como os ácidos teicóicos e lipoteicóicos das paredes celulares de bactérias Gram-positivas.

A região espectral entre 1200 e 900 cm⁻¹ é geralmente dominada por deformações axiais simétricas de grupos fosfato de ácidos nucléicos e uma sequência complexa de picos principalmente devida a deformações axiais de C-O-C e C-O-P de vários oligo e polissacarídeos.

A região entre 900 e 600 cm⁻¹, a região “*fingerprint*”, exibe uma variedade de bandas fracas sobrepostas devido a vibrações de anéis aromáticos de aminoácidos como fenilalanina, tirosina e triptofano e de vários nucleotídeos.

As Firuras 15, 16, 17 e 18 são referentes aos espectros das amostras de material celular de *S. aureus* com e sem tratamento de RL. Pela análise dos espectros nota-se que há um encurtamento de todas as bandas nas amostras que receberam o tratamento em ambas as cepas e valores de pH. O encurtamento destas bandas, como relatado por Lu e cols. (2011), evidencia injúria ao material celular bacteriano. Como na maioria das bandas há contribuições de deformações

de ligações de grupos químicos presentes em proteínas, lipídeos ou constituintes de parede celular, pode-se inferir que os RL apresentam ação na superfície celular.

Figura 15- Espectro de FTIR de *S. aureus* ATCC 8095 em pH 6. Em verde amostra controle e em azul amostra com tratamento de RL na concentração de 39,1 mg L⁻¹.

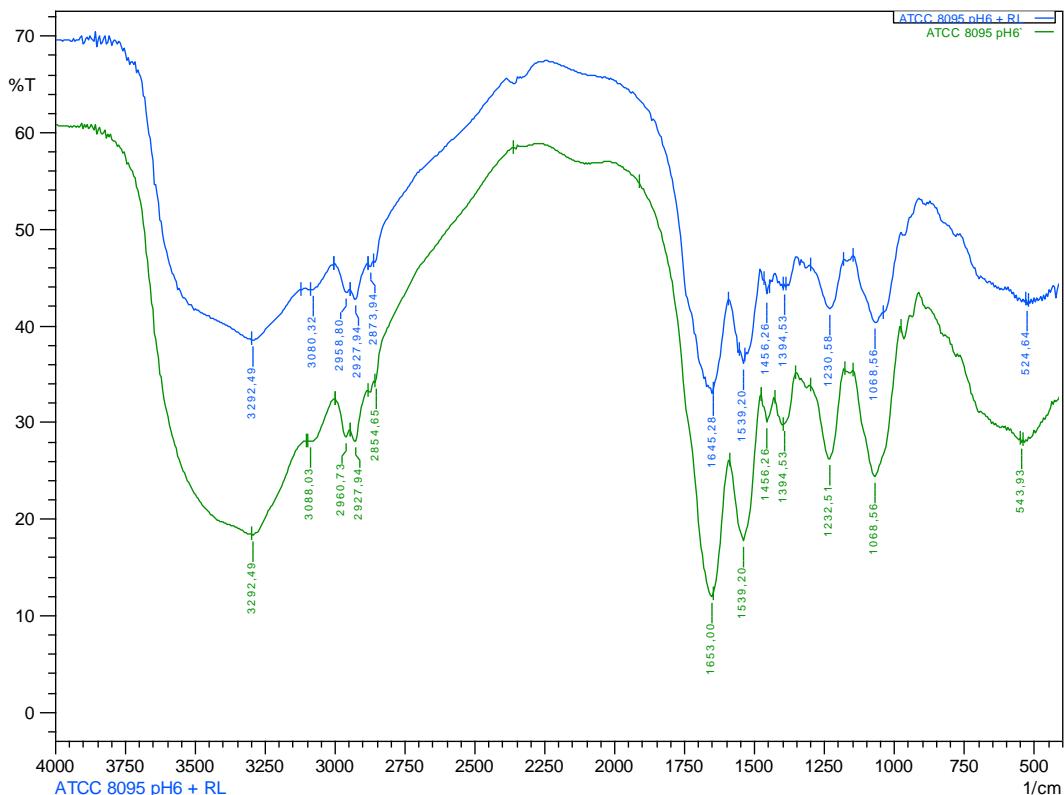


Figura 16- Espectro de FTIR de *S. aureus* ATCC 25923 em pH 6. Em vermelho amostra controle e em verde amostra com tratamento de RL na concentração de 39,1 mg L⁻¹.

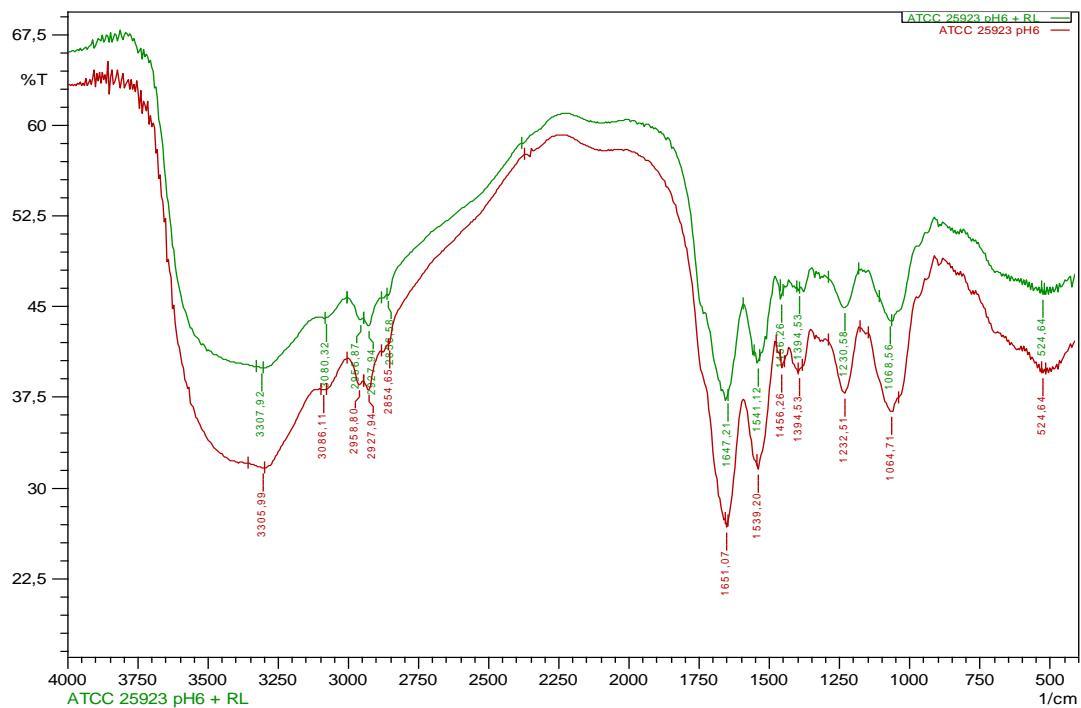


Figura 17- Espectro de FTIR de *S. aureus* ATCC 8095 em pH 7. Em roxo amostra controle e em marrom amostra com tratamento de RL na concentração de 5000 mg L⁻¹.

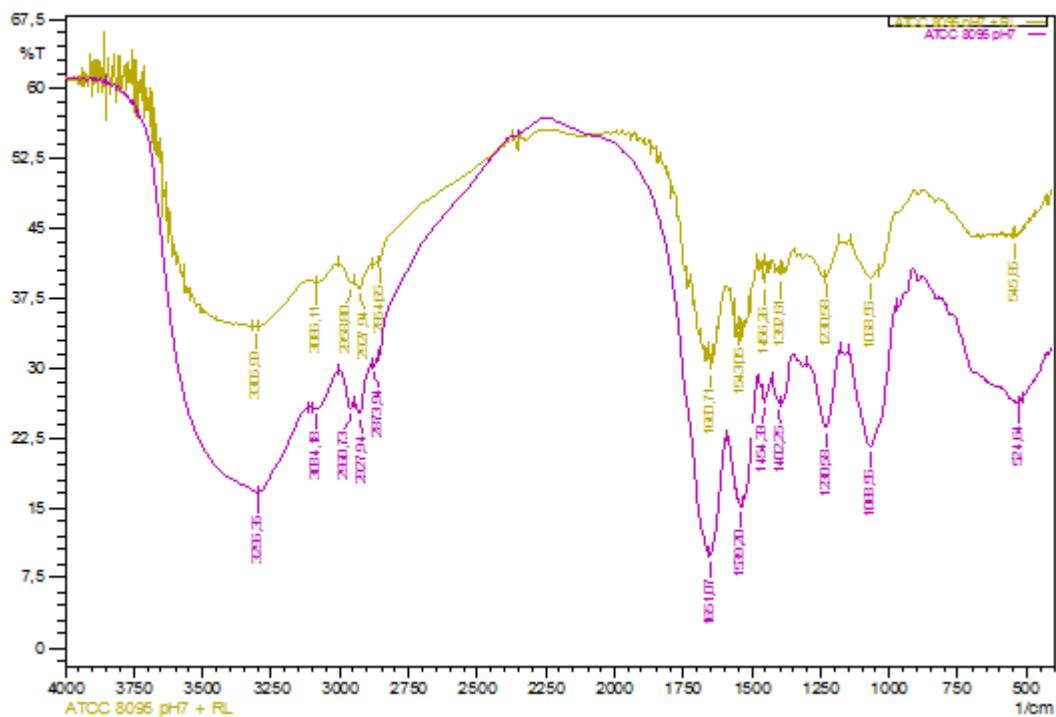
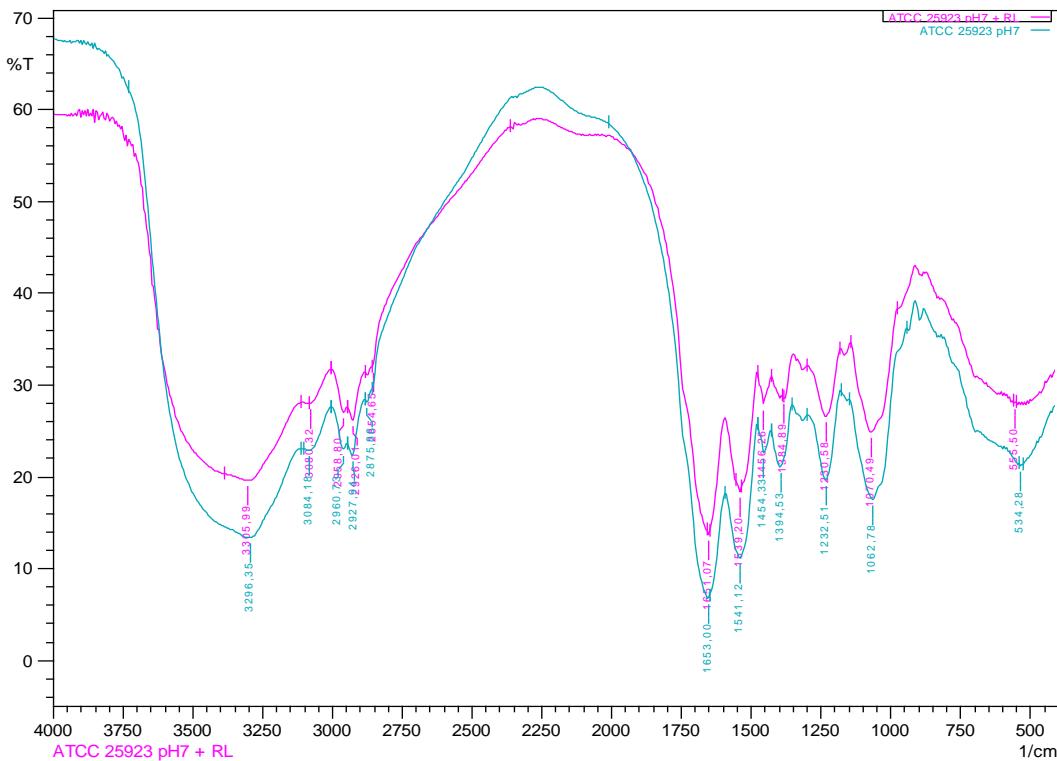


Figura 18- Espectro de FTIR de *S. aureus* ATCC 25923 em pH 7. Em azul amostra controle e em lilás amostra com tratamento de RL na concentração de 5000 mg L⁻¹.

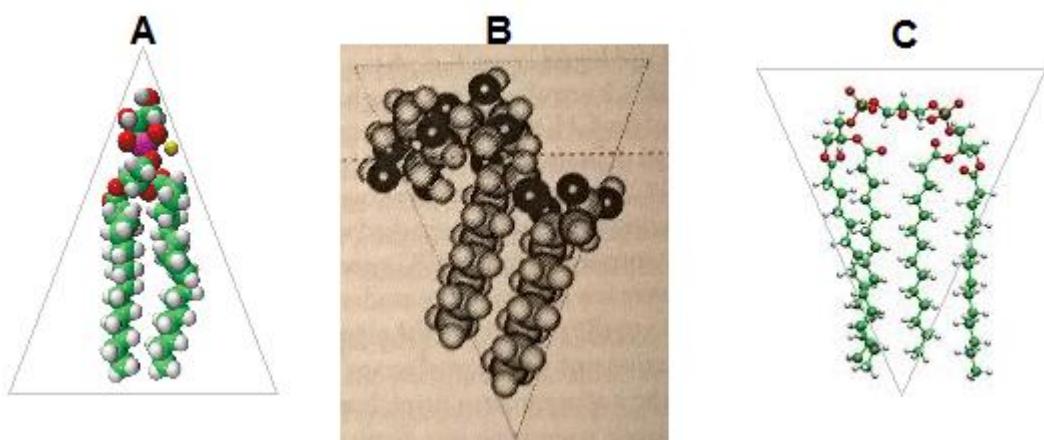


Pela análise das imagens, nota-se que os espectros das amostras que receberam tratamento com RL apresentaram um deslocamento de duas unidades de número de onda a menos na banda proveniente de deformações axiais assimétricas de C-H de grupos alquilas (~2960 cm⁻¹). Isso, segundo Casal e Mansch (1984), fornece evidência de que houve desordem nas cadeias acila de fosfolipídeos da membrana. Sabe-se que nas membranas plasmáticas, as cadeias acila de ácidos graxos de fosfolipídeos estão bastante orientadas, mantidas estáveis por interações hidrofóbicas. Uma desordem nesta estrutura faz com que menor energia seja requerida para a vibração das ligações, devido a menor interação com grupos de cadeias vizinhas, isto reflete em um deslocamento no espectro para a direita. Outro deslocamento evidente ocorreu na banda referente a grupos P=O (~1232 cm⁻¹), sugerindo desestabilização também na porção polar de moléculas fosfolipídicas.

Pela análise das moléculas de RL, principalmente as de diRL, constata-se que elas possuem um grande grupo polar e uma pequena porção apolar (Figura 19), o que lhes confere um formato de cone invertido. A composição majoritária de fosfolipídeos da membrana celular de *S. aureus* é 58% de fosfatidilglicerol e 42% de cardiolipina (EPAND et al., 2007). Fosfatidiglicerois apresentam o formato cônico de

suas moléculas, formato complementar ao dos RL, em contrapartida cardiolipina, assim como os RL apresentam grande porção polar, o que pode ser a causa da desestabilização da membrana evidenciada na espectroscopia. A inserção de moléculas de RL na bicamada, possivelmente confere uma curvatura em seu arranjo, podendo promover a formação de poros transientes e até mesmo levar a ruptura celular (HENZLER-WILDMAN et al., 2003).

Figura 19- Representação das estruturas químicas de A) fosfatidilglicerol; B) diRL e C) cardiolipina.



Fonte: adaptação a partir de Sen, R. 2010, p.52.

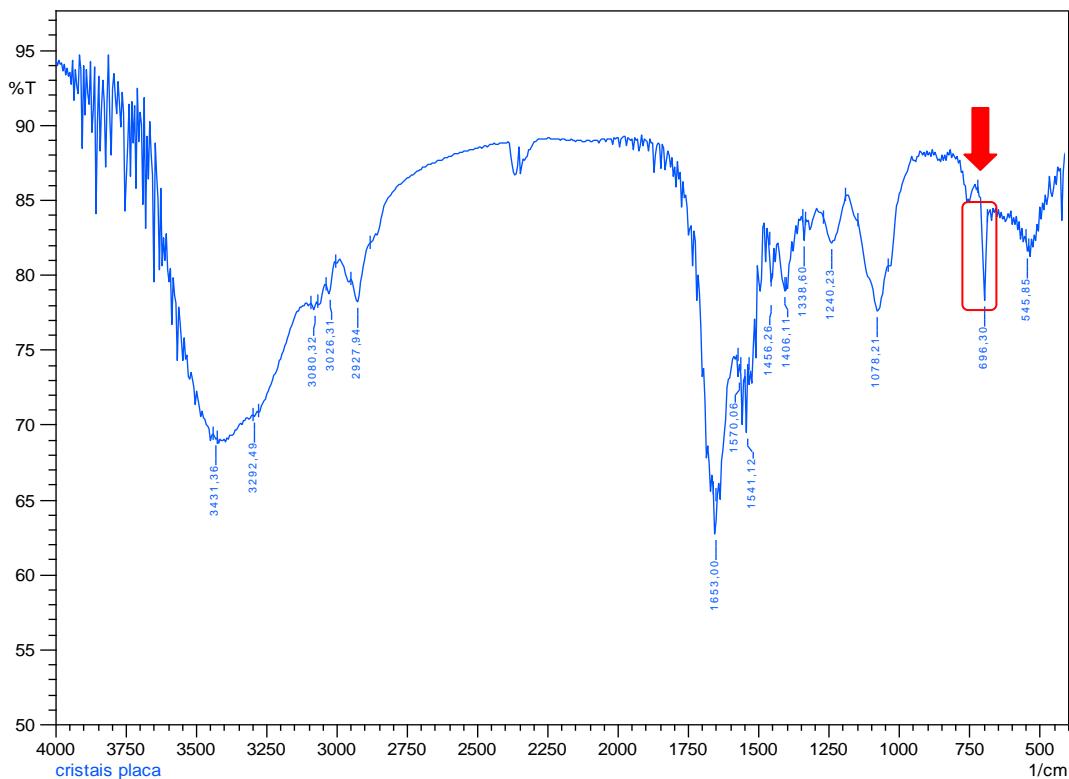
Outro deslocamento que fornece evidencia da ação dos RL é o deslocamento da banda referente a deformações de ligações de amidas primárias de proteínas α -hélice e folha- β ($\sim 1655\text{ cm}^{-1}$), tais componentes estão presentes em grande quantidade nas membranas celulares, e assim como o ocorrido com as cadeias acila, um deslocamento para a direita demonstra uma desestabilização destas estruturas na membrana.

Tanto em pH 7 quanto em pH 6 há a constatação destas evidências, porém nas concentrações testadas ($39,1\text{ mg L}^{-1}$ em pH 6 e 5000 mg L^{-1} em pH 7) não houve diferença significativa entre eles neste método, em concordância com o obtido no ensaio das curvas de sobrevivência (comparação das curvas roxa e vermelha das Figuras 13 e 14).

A espectroscopia do material formado nas paredes dos poços (cristais) do ensaio de CIM em pH 7 da linhagem ATCC 8095, revelou-se semelhante aos espectros de células de *S. aureus*. Isso era esperado, pois se sabia que nesse

material havia células aderidas. Como se pode observar na Figura 20, todas as bandas são semelhantes as das Figuras 15-18, com exceção de uma banda proeminente em torno de 700 cm^{-1} . Banda nesta região indica a presença de anéis aromáticos pela deformação angular de $-\text{CH}$ fora do plano ou a presença de compostos orgânicos sulfurados pelo estiramento da ligação C-S. Isto sugere a presença de proteínas com resíduos aromáticos como fenilalanina, triptofano e tirosina e sulfurados como a cisteína e metionina, confirmando que esse material que é formado nestas condições é constituído por proteínas, provavelmente de forma majoritaria por SpA, que se agrupa pela ação dos RL e precipitam formando cristais.

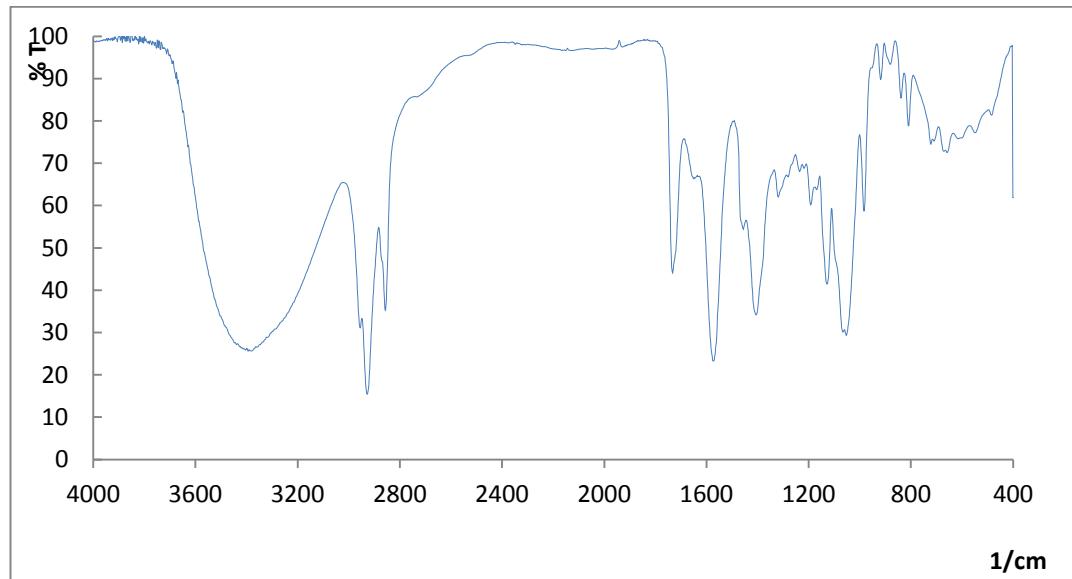
Figura 20- Espectro de FTIR do material (cristal) formado em pH 7.



O espectro dos RL também foi realizado para verificar sua presença nesses cristais (Figura 21), porém não foi possível constatar sua presença devido a ausência de suas bandas características no espectro obtido (Figura 20). Isso pode ser devido à baixa concentração de RL presentes nestes cristais, sendo suas bandas, encobertas pelas bandas do material celular bacteriano que se encontra em maior

concentração na amostra. O mesmo raciocínio pode ser levado em consideração para explicação da ausência das demais bandas características de proteínas.

Figura 21- Espectro de FTIR dos RL.



6 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que dois fatores são importantes na ação de RL frente a *S. aureus*: o pH e a concentração de RL. O primeiro está relacionado com a forma em que as moléculas de RL se apresentam em solução (aniônica ou neutra). E a segunda, com a quantidade de moléculas livres capazes de permear a membrana celular. Esta última demonstrou-se afetada pela habilidade de *S. aureus* em liberar proteínas de superfície, as quais possivelmente formam agregados com os RL e precipitam, principalmente em pH 7, não sendo possível a determinação de CIM neste pH. Porém em pH 5 os RL demonstraram poder bactericida e em pH 6 bacteriostático. A curva de sobrevivência demonstrou que os RL podem ser bactericidas em concentrações mais elevadas.

As análises de FTIR sugeriram que os RL modificam o ambiente químico de fosfolipídeos e proteínas de membrana, por causar uma desestabilização de suas interações na bicamada fosfolipídica. Sendo assim seu poder antibacteriano pode ser atribuído a sua habilidade de promover tais modificações.

Portanto, pode-se considerar promissora a aplicação de RL em alimentos, principalmente os de baixa acidez, pois são justamente estes os mais acometidos por contaminações de *S. aureus*.

7 PERSPECTIVAS

Para obter-se maior subsídio na discussão da atuação dos RL na membrana celular bacteriana, poder-se-ia realizar a determinação do pKa dos RL utilizados (Rhamnolipid Inc.), assim como as CMCs nos valores de pH de análise. Tais parâmetros forneceriam informações mais precisas sobre a forma mais ativa dos RL.

Análises complementares como evidência de ruptura celular, permeabilização da membrana celular e microscopia eletrônica de varredura, poderiam ser realizadas para melhor elucidar o mecanismo de ação dos RL.

Poder-se-ia estabelecer uma rota de separação dos cristais formados para verificação de sua composição, investigando a presença de RL nestas estruturas e caracterizando as proteínas presentes por meio de eletroforese ou por difração de raios-X.

REFERÊNCIAS

- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCIA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT 10 from soybean oil refinery waste. **Langmuir**. v. 17, n. 5, p. 1367-1371, 2001.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 86, p. 1323–1336, 2010.
- ACHESON, D. W. K. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. 3 ed., p. 485- 501, 2000.
- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2 ed., Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.
- ALBERTS, B. JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed., Porto Alegre: ArtMed, 1054p., 2010.
- AL-QADIRI, H. M., LIN, M., AL-HOLY, M. A., CAVINATO, A. G., RASCO, B. A. Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy (4000 to 600 cm⁻¹). **J Food Sci**. v. 73, p. 54-61, 2008b.
- AL-QADIRI, H.M., LIN, M., CAVINATO, A.G., RASCO, B.A. Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice. **Int J Food Microbiol**. v. 111, p. 73-80, 2006a.
- ANDREWS, J. M.; Determination of minimum inhibitory concentrations **J Antimicrob Chemother**. v. 48, n. 5, p. 5-16, 2001

ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J., MARQUÉS A. Thermodinamics of interaction of dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phosfolipid membranes. **Langmuir**. v. 23, p. 2700-2705, 2007.

BALABAN, N, RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **Int y Food Microbiol.** v. 6, p. 1-10, 2000.

BEHRMAN, R. E.; KLEIGMAN R.; NELSON, W. I. **Textbook of Pediatrics**, 15 ed., 1995.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. Ano 5; n. 06; 28/12/2005. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf>>. [Acessado em 20 de abril de 2006].

CHIRISTOFILOGIANNIS, P. Current inoculation methods in MIC determination. **Aquaculture**. v. 196, p. 297-302, 2000.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bactéria that grow aerobically. **Approved Standard**. 8 ed. Wayne, CLSI document M07-A8, 2009b.

DESAI, J. D., BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol Mol Biol**. v. 61, p. 47–64, 1997

EPAND, R. F.; SAVAGE, P. B.; EPAND, R. M. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1768, p. 2500-2509, 2007.

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

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

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Food microbiology**. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 494p, 1988.

FREITAS, M. A. Q. , MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **R microbiol.** v. 21, n. 4, p.315-319, 1990.

GUERREIRO, M.G. **Bacteriologia Especial** com interesse em saúde animal e saúde pública, Editora sulina, Porto Alegre, 1 ed., 1984.

HABA, E.; PINAZO, A.; PONS, R.; PÉREZ, R.; MANRESA, A. Complex rhamnolipid mixture characterization and its influence on DPPC bilayer organization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. v. 1838, n 3, p. 776–783, 2014.

HABA, E.; PINAZO, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M. J.; INFANTE, M. R.; MANRESA, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 8, n. 3, p. 316-322, 2003.

HELM, D.; LABISCHINSKI, H; SCHALLEHN, G.; NAUMANN, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of General Microbiology**. v.137, p. 69-79, 1991.

HENZLER-WILDMAN, K. A.; LEE, D. K.; RAMAMOORTHY, A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. **Biochemistry**. v. 42, p. 6545-6558, 2003.

IBRAHIM, S. A., YANG, H. SEO, C. W. Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* 157: H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Chemistry**. v. 109(1), p. 137-143, 2008.

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

JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin Infect Dis.** v. 15, n. 41, p. 120-126, 2005.

KARRAS, D .J. Incidence of foodborne illnesses: Preliminary data from the foodborne disease active surveillance network (foodnet). **Annals of Emergency medicine**, v. 35 (1),p. 93-95, 2000.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 51, p. 22–32,1999.

LIN, M.; AL-HOLY, M.; AL-QADIRI, H.; KANG, D.H.; CAVINATO, A.G.; HUANG, Y.; RASCO, B.A.; Discrimination of intact and injured *Listeria monocytogenes* by Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. **J Agric Food Chem.** v. 52, p. 5769-5772, 2004.

LIVERMORE, D. M.; WINSTANLEY, T. G.; SHANNON, K. P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **J Antimicrob Chemother.** v. 48, n. 1, p. 87-102. 2001.

LU, X.; LIU, Q.; WUA, D.; AL-QADIRI, H. M.; AL-ALAMI, N. I.; KANG, D. H.; SHIN, J. H.; TANG, J.; JABAL , J. M. F.; ASTON, E. D.; RASCO, B. A. Using of infrared spectroscopy to study the survival and injury of *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* and *Pseudomonas aeruginosa* under cold stress in low nutrient media. **Food Microbiology.** v. 28, p. 537-546 2011

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock.** 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 1160 p. 2010.

MEAD, P. S. ; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V.. Food-related illness and death in the United States. **Emerg Infect Dis.** v. 5, n. 5, p. 607–625, 1999.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal Hygiene**. v. 38, p. 732-749, 1938.

MURRAY, P. R. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed., ASM Press: Washington, 1999.

NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. R.A. Meyers (Ed.).John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 102–131, 2000.

NAUMANN.,D., FIJALA, V, LABISCHINSK, I ,& GIESBRECH P. T. The differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR and multivariate statistical analysis. **Mikrochimica Acta**. v. 1, p. 373-377, 1988a.

NIELSEN, L.; KADAVY, D.; RAJAGOPAL, S.; DRIJBER, R.; KENNETH, W. Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: Membrane fatty acid changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene. **Appl Environ Microbiol**. v. 71, p. 5171–5176, 2005.

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

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

O'HALLORAN, D. P.; WYNNE, K.; GEOGHEGAN, J. A. Protein A is released into the *Staphylococcus aureus* culture supernatant with an unprocessed sorting signal. **Infection and Immunity**. v. 83, n. 4, 2015.

PEREIRA MSV, SIQUEIRA JÚNIOR JP. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. v. 20, p. 391-395, 1995.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. 3 ed. CRC Press LLC. Florida 2000.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **J colloid interface Sci.** v. 3007, p. 246-253, 2007.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; I. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab.** v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A. C. **Antimicrobial susceptibility testing protocols**. Boca Raton : CRC Press, 414 p. 2007, pag. 286.

SEN, R. **Biosurfactants**. Nova York : Springer Verlag, 331, p. 2012, pag. 45.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

VON HIPPEL, P. H.; SCHLEICH, T. Ion effects on the solution structure of biological macromolecules. **Accounts of Chemical Research**. v. 2, n. 9, p. 257-265. 1969.

WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K.I. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed., v. 5, part B, Springer-Verlag, New York, NY, 2012.

WOODS, G. L.; WASHINGTON, J. A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: ASM Press, p.1327-1341, 1995.