

RAFAELA DA SILVA RODRIGUES

FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Pseudomonas fluorescens* EM AÇO INOXIDÁVEL E SEU CONTROLE POR BIOSSURFACTANTES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696f
2019
Rodrigues, Rafaela da Silva, 1995-
Formação de biofilme de *Pseudomonas fluorescens* em aço
inoxidável e seu controle por biossurfactantes / Rafaela da Silva
Rodrigues. – Viçosa, MG, 2019.
xi, 42 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 34-42.

1. *Pseudomonas fluorescens*. 2. Biofilmes.
3. Biossurfactantes. 4. Aço inoxidável. 5. Alimentos -
Microbiologia. 6. Tecnologia de alimentos. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. II. Título.

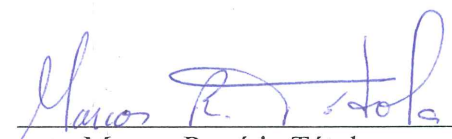
CDD 22. ed. 664.001579

RAFAELA DA SILVA RODRIGUES

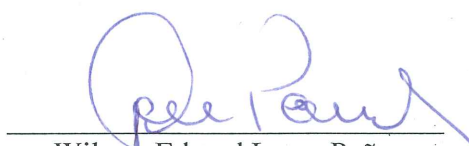
FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Pseudomonas fluorescens* EM AÇO INOXIDÁVEL E SEU CONTROLE POR BIOSURFACTANTES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2019.



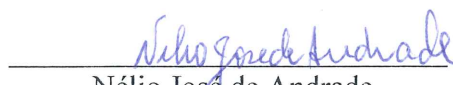
Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)



Wilmer Edgard Luera Peña
(Coorientador)



Érica Nascif Rufino Vieira



Nélio José de Andrade
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me guiar e me ajudar a seguir em frente, sem desanimar em meio as dificuldades.

Agradeço aos meus familiares, principalmente aos meu pais, que me motivaram e me mostraram o quanto é importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade.

Ao meu orientador Dr. Nélio José de Andrade por seus valiosos ensinamentos, disponibilidade e apoio ao longo desta jornada. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

Aos meus coorientadores Dr. Marcos Rogério Tótola e Dr. Wilmer Edgard Luera Peña pelas contribuições e disponibilidade no auxílio desse trabalho.

Agradeço a Dra. Érica Nascif Rufino Vieira por ter aceitado o convite de participar da minha banca de dissertação e pelas valiosas contribuições para melhoria do trabalho.

Também agradeço aos professores de disciplinas que tive durante esse mestrado, principalmente a professora Dra. Maria Cristina Dantas Vanetti e o professor Dr. José Benício Paes Chaves, os quais me passaram conhecimentos que me ajudaram a crescer durante o curso.

Agradeço ao laboratório de Pesquisa em Leite e Derivados e ao laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos, ambos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFV).

Aos meus colegas de laboratório, pelo apoio, incentivo e sugestões durante a pesquisa.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da universidade pela disponibilidade para realização deste trabalho.

E a todas as pessoas que contribuíram com essa dissertação de forma direta e indiretamente, o meu MUITO OBRIGADA.

BIOGRAFIA

RAFAELA DA SILVA RODRIGUES, filha de Angélica Moreira da Silva Rodrigues e José Nilson Araújo Rodrigues, nasceu em Guanambi, Bahia, em 07 de junho de 1995.

Em maio de 2013 iniciou o curso de Tecnologia em Agroindústria no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, *campus* Guanambi, concluindo em julho de 2016.

E em março de 2017 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo geral	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1. Biofilme	3
3.2. <i>Pseudomonas</i> na indústria de produtos lácteos	5
3.2.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	6
3.3. Surfactantes	7
3.3.1. Concentração Crítica Micelar (CMC)	8
3.3.3. Biossurfactantes.....	9
3.3.3.1. Rhamnolipídeo	11
3.3.3.2. Surfactina.....	12
3.3.4. Cloreto de benzalcônio	13
3.4. Controle de biofilmes por biossurfactantes	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Microrganismo e condições de cultivo.....	15
4.2. Preparo da suspensão bacteriana	15
4.3. Preparo e limpeza dos cupons de aço inoxidável	15
4.4. Origem dos biossurfactantes.....	16
4.5. Preparo das soluções surfactantes	16
4.6. Formação do biofilme por <i>P. fluorescens</i>	17
4.7. Quantificação de células aderidas.....	18

4.8. Ação das soluções surfactantes sobre os biofilmes de <i>P. fluorescens</i>	19
4.9. Microscopia Confocal de Varredura a Laser	20
4.10. Delineamento experimental	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Formação de biofilmes por <i>P. fluorescens</i> em aço inoxidável.....	21
5.2. Efeito das soluções surfactantes sobre o biofilme de <i>P. fluorescens</i>	23
5.2.1. Surfactina.....	23
5.2.2. Rhamnolipídeo	25
5.2.3. Cloreto de benzalcônio	28
5.3. Biofilmes de <i>P. fluorescens</i> observados por microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL).....	30
6. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da formação de biofilme bacteriano. 1: adesão reversível; 2: adesão irreversível; 3: desenvolvimento; 4: maturação; 5: dispersão (STOODLEY et al., 2002).....	4
Figura 2: Relação entre concentração do surfactante e tensão superficial. Adaptado de Pacwa-Płociniczak et al. (2011).	8
Figura 3: Representação da estrutura de monoramnolípido e diramnolípido (KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA et al., 2017).	11
Figura 4: Representação da estrutura química da surfactina (BANAT et al., 2010).....	12
Figura 5: Representação do cloreto de benzalcônio (DALVIN, 2011).	13
Figura 6: Redução decimal de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 07A, expressa em UFC cm ⁻² aderidos em cupons de aço inoxidável, após o tratamento com surfactina por diferentes tempos de contato.	24
Figura 7: Redução decimal de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 07A, expressa em UFC cm ⁻² aderidos em cupons de aço inoxidável, após o tratamento com diferentes concentrações de ramnolípido.	26
Figura 8: Redução decimal de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 07A, expressa em UFC cm ⁻² aderidos em cupons de aço inoxidável, após o tratamento com ramnolípido por diferentes tempos de contato.	26
Figura 9: Gráfico de contorno da redução decimal de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 07A, expressa em UFC cm ⁻² aderido em cupons de aço inoxidável, após o tratamento com diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio por diferentes tempos de contato.	29
Figura 10: Imagens de Microscopia Confocal de Varredura a Laser de biofilmes de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 07A, formados sobre aço inoxidável por 120 h a 7 °C, em leite integral UHT, sem tratamento (A) e após aplicação de surfactina (31,2 mg L ⁻¹ por 70 min) (B), ramnolípido (65 mg L ⁻¹ por 70 min) (C) e de cloreto de benzalcônio (1800 mg L ⁻¹ por 10 min) (D).....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Surfactantes e concentrações utilizadas para avaliação da remoção de <i>Pseudomonas fluorescens</i> aderidas em cupons de aço inoxidável.	17
Tabela 2: Compostos presentes no leite integral UHT utilizado (valores obtidos da embalagem do produto adquirido comercialmente).....	18
Tabela 3: Média do número de células aderidas (Log UFC cm ⁻²) de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em aço inoxidável AISI 304 # 4, incubado a 7 °C em leite integral UHT.	21
Tabela 4: Resumo da análise de variância da redução decimal (expressa em Log UFC cm ⁻²), de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 07A aderida em aço inoxidável, após a aplicação de surfactina em diferentes concentrações e tempos de contato.	23
Tabela 5: Resumo da análise de variância da redução decimal (expressa em Log UFC cm ⁻²), de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 07A aderida em aço inoxidável, após a aplicação de ramnolipídeo em diferentes concentrações e tempos de contato.	25
Tabela 6: Resumo da análise de variância da redução decimal (expressa em Log UFC cm ⁻²), de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 07A aderida em aço inoxidável, após a aplicação de cloreto de benzalcônio em diferentes concentrações e tempos de contato.....	28
Tabela 7: Valores de RD estimados ⁽¹⁾ em função da interação entre tempos de contato (TC), considerando intervalos de 10 min, e concentrações de cloreto de benzalcônio (CB), com intervalos de variação de 200 mg L ⁻¹	29

RESUMO

RODRIGUES, Rafaela da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Formação de biofilme de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável e seu controle por biossurfactantes.** Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Marcos Rogério Tótola e Wilmer Edgard Luera Peña.

Biofilme é uma comunidade microbiana contida em uma matriz polimérica e aderida a uma superfície. Essa estrutura é responsável por garantir maior resistência de células bacterianas imersas nessa matriz a agentes antimicrobianos. Uma alternativa para controlar a ocorrência de biofilmes em ambientes de processamento de alimentos é o uso de agentes surfactantes. Os biossurfactantes têm atraído a atenção como substitutos dos surfactantes sintéticos, exibindo entre diversas qualidades, maior biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixa concentração crítica micelar (CMC). O objetivo desse trabalho foi avaliar a formação de biofilme de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável, em contato com leite integral UHT, por 120 h, em temperatura de 7 °C. E avaliar o efeito dos biossurfactantes ramnolipídeo e surfactina e do surfactante sintético cloreto de benzalcônio (CB) em concentrações abaixo, próxima ou igual e acima da CMC, além de avaliar o tempo de contato, na redução do biofilme pré-formado. Cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4, foram incubados em poços de placas de poliestireno, com inóculo inicial de 10^4 UFC mL⁻¹ de *P. fluorescens* 07A em leite integral UHT, e incubados a 7 °C. Foi realizada quantificação de células aderidas a cada 24 h. A aplicação dos agentes surfactantes foi realizada sobre os biofilmes pré-formados por 120 h. Além disso, antes e após os tratamentos, os cupons de aço inoxidável foram observados por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Constatou-se que a cepa de *P. fluorescens* estudada foi capaz de formar biofilme em temperatura de refrigeração em contato com leite integral UHT, após 72 h de incubação. Os biossurfactantes não foram tão eficazes quanto o surfactante sintético estudado. O aumento da concentração de surfactina não aumentou a redução de células do biofilme, no entanto o aumento do tempo de contato demonstrou efeito positivo sobre a redução. Ramnolipídeo foi capaz de reduzir aproximadamente 1 ciclo log de UFC cm⁻² de células viáveis, na CMC; aumento do tempo de contato também demonstrou efeito. Para ambos os biossurfactantes a interação entre concentração e tempo de contato foi não significativa ($P > 0,01$); enquanto para o surfactante sintético CB a interação foi significativa ($P < 0,01$), mostrando que o aumento do tempo de contato e da concentração desse agente garantem maior redução do número

de células viáveis no biofilme. A partir dos resultados obtidos verificou-se que *P. fluorescens* pode formar biofilmes em superfície utilizada no processamento de alimentos em temperatura de refrigeração com a presença de resíduos de leite. No entanto, surfactantes sintéticos ainda demonstram melhor efeito do que os biossurfactantes sobre biofilme.

ABSTRACT

RODRIGUES, Rafaela da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. ***Pseudomonas fluorescens* biofilm formation in stainless steel and its control by biosurfactants.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-advisers: Marcos Rogério Tótola and Wilmer Edgard Luera Peña.

Biofilm is a microbial community contained in a polymer matrix and adhered to a surface. This structure is responsible for ensuring greater resistance of bacterial cells immersed in this matrix to antimicrobial agents. An alternative to control the occurrence of biofilms in food processing environments is the use of surfactants. Biosurfactants have garnered attention as substitutes for synthetic surfactants, exhibiting among several qualities, greater biodegradability, low toxicity and low critical micelle concentration (CMC). The objective of this study is to evaluate the formation of *Pseudomonas fluorescens* biofilm in stainless steel, in contact with UHT whole milk, for 120 h at a temperature of 7 ° C. And to evaluate the effect of the biosurfactants rhamnolipid and surfactin and the synthetic surfactant benzalkonium chloride (BC) in concentrations below, near or equal to and above the CMC, besides evaluating the contact time, in reducing the preformed biofilm. Stainless steel coupons AISI 304 # 4 were incubated in polystyrene plate wells with initial inoculum of 10^4 CFU mL⁻¹ of *P. fluorescens* 07A in UHT whole milk and incubated at 7 ° C. Quantification of adhered cells were performed every 24 h. The application of the surfactants was performed after the biofilm had been preformed for 120 h. In addition, before and after the treatments, the stainless steel coupons were observed by Confocal Laser Scanning Microscopy. It was verified that the strain of *P. fluorescens* studied was able to form biofilm at refrigeration temperature in contact with UHT whole milk, after 72 h of incubation. The biosurfactants were not as effective as the synthetic surfactant studied. The increased surfactin concentration did not increase the reduction of biofilm cells, however, the increase in contact time showed a positive effect on the reduction. Rhamnolipid was able to reduce approximately 1 log cycle of CFU cm⁻² of viable cells in CMC; the increased contact time was also effective. For both biosurfactants the interaction between concentration and contact time was not significant ($P > 0,01$); while for the synthetic surfactant BC the interaction was significant ($P < 0,01$), showing that increased contact time and concentration of this agent provides a greater reduction in the number of viable cells in the biofilm. From the results obtained it was verified that *P. fluorescens* can form biofilms on surfaces used in food processing at refrigeration

temperature with the presence of milk residues. However, synthetic surfactants still have a better effect than biosurfactants on biofilm.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade dos produtos alimentícios é uma preocupação da indústria de alimentos em toda a cadeia de processamento. No entanto, essa qualidade pode ser afetada por modificações indesejadas causadas por diversos fatores, como reações químicas, enzimáticas e modificações mediadas pela multiplicação microbiana. Eventos de deterioração de alimentos causada por multiplicação microbiana são associados com contaminações cruzadas, práticas inadequadas de higiene, equipamentos de processamento contaminados e armazenamento inadequado (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCIA-GIMENO, 2012). Uma estratégia de sobrevivência de diversos microrganismos é a formação de biofilme, que é definido como uma comunidade de células bacterianas contidas em uma matriz polimérica, aderida a uma superfície (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Portanto, tais comunidades são fontes de contaminação cruzada de bactérias e enzimas em ambientes de processamento de alimentos (MAIFRENI et al., 2015; SREY; JAHID; HA, 2013; TEH et al., 2014).

O biofilme pode afetar o rendimento de um processo, mas também a saúde do consumidor. Mesmo com procedimentos de limpeza e sanitização e boas práticas de fabricação, os microrganismos podem permanecer nas superfícies dos equipamentos e sobreviver por longos períodos (CLOETE et al., 2009). Além disso, a presença de resíduos alimentares, combinada com condições ambientais adequadas, favorecem a fixação e a multiplicação de bactérias às superfícies (ABDALLAH et al., 2014; SREY; JAHID; HA, 2013). Bactérias do gênero *Pseudomonas* têm sido relatadas como formadoras de biofilmes e geralmente contribuem para a deterioração de alimentos, particularmente as cepas de *P. fluorescens*, que são frequentemente responsáveis pela deterioração de alimentos como produtos lácteos e alguns produtos cárneos (GE et al., 2017; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2018; TEH et al., 2012).

Portanto, há a necessidade de se adotar medidas para o controle de biofilmes. Os agentes surfactantes são geralmente empregados para remoção de biofilmes, uma vez que os removem de superfícies com base na redução de interações entre as células e a superfície sólida (WANG et al., 2016). No entanto, novas buscas por agentes com as propriedades semelhantes aos agentes surfactantes sintéticos têm aumentado o interesse por biossurfactantes, que são compostos anfífilicos produzidos por microrganismos (GUDIÑA et al., 2015; MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006). Em comparação com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes exibem vantagens, como baixa toxicidade, baixa CMC, maior biodegradabilidade, eficácia em

diferentes faixas de condições físicas (temperatura, pH e salinidade) e capacidade de serem sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (CORONEL-LEÓN et al., 2016; KIM et al., 2015; SHARMA et al., 2014; YEH; WEI; CHANG, 2005).

Nesse contexto, torna-se relevante o desenvolvimento de mais pesquisas acerca da eficácia de biossurfactantes para remoção de biofilmes bacterianos responsáveis pela alteração da qualidade de produtos alimentícios.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de biossurfactantes sobre biofilmes formados por *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar:

- A formação de biofilme por *P. fluorescens* 07A em aço inoxidável a 7 °C;
- O efeito de soluções de dois biossurfactantes (ramnolipídeo e surfactina) e de um surfactante sintético (cloreto de benzalcônio) na redução de células de *P. fluorescens* 07A em biofilme pré-formado em aço inoxidável em concentrações abaixo, próximas ou iguais e acima da concentração crítica micelar, em diferentes tempos de contato;
- A estrutura do biofilme por microscopia, antes e após aplicação dos tratamentos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biofilme

Biofilme é uma comunidade sésil de microrganismos cujas células estão envoltas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e aderidas irreversivelmente em um substrato ou entre si, apresentando fenótipo alterado em relação à transcrição de genes e taxa de multiplicação, com crescimento mais lento ou sem crescimento (DONLAN; COSTERTON, 2002). A formação do biofilme pode garantir diversas vantagens para o microrganismo, como fornecer maior resistência das células a agentes antimicrobianos, bem como maior dificuldade de penetração destes na matriz (LAZAR, 2011). Além disso, algumas alterações podem conferir benefícios às células, como algumas alterações genéticas por mutações ou transferência genética e algumas mudanças fisiológicas (DONLAN; COSTERTON, 2002; FLEMMING; WINGENDER, 2010; LAZAR, 2011).

Quanto ao processo de formação dessa estrutura, ele é geralmente dividido em três ou cinco etapas. Para Dunne (2002), a formação do biofilme ocorre em três estágios: adesão primária, adesão secundária e maturação. Uma adesão primária ocorre devido ao encontro da célula bacteriana com uma superfície, que pode ser mediada por uma corrente de um fluido sobre uma superfície, quimiotaxia ou motilidade. Os fatores responsáveis por essa adesão são forças de van der Waals, eletrostáticas e hidrofóbicas, temperatura, forças hidrodinâmicas e impedimento estérico. Já a adesão secundária é o estágio na qual os microrganismos produzem EPS, que interagem com a superfície e/ou com as células bacterianas. Nesse segundo estágio, a adesão torna-se irreversível. Após a adesão irreversível, começa a maturação, terceiro estágio, com aumento da população de células e de componentes extracelulares, que depende de fatores como disponibilidade de nutrientes. Contudo, quando o biofilme atinge uma alta densidade celular, células são liberadas.

Todavia, para Van Houdt e Michiels (2005), o processo de formação do biofilme é dividido em cinco estágios: (1) adesão reversível: células livres se aproximam de uma superfície, que pode estar modificada pela adsorção de solutos; (2) adesão irreversível: produção de polímeros extracelulares, que interagem com a superfície; (3) desenvolvimento da arquitetura do biofilme; (4) Maturação: contínua produção de EPS, formação de uma arquitetura complexa com canais de água e poros e desenvolvimento de microcolônias; (5) dispersão de células. Os cinco estágios podem ser visualizados na Figura 1.

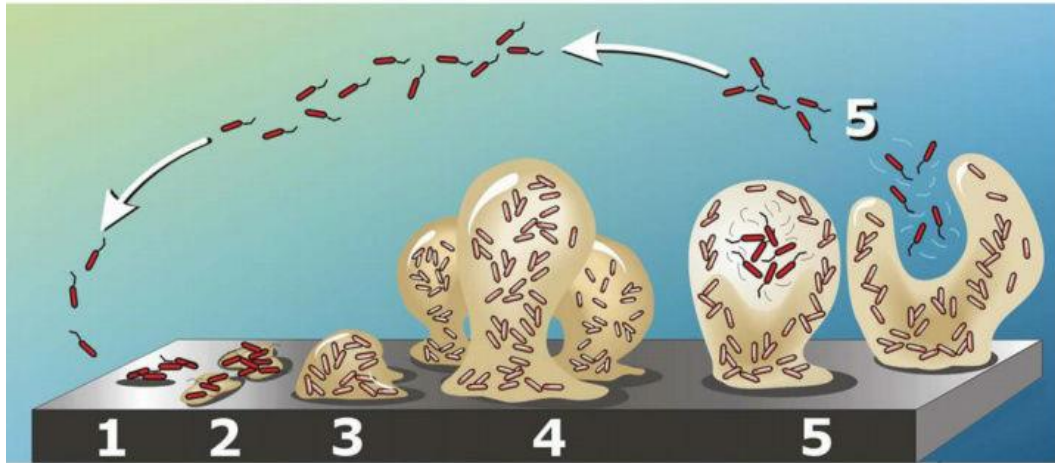


Figura 1: Etapas da formação de biofilme bacteriano. 1: adesão reversível; 2: adesão irreversível; 3: desenvolvimento; 4: maturação; 5: dispersão (STOODLEY et al., 2002).

Certamente, há outros diversos fatores que influenciam a adesão de células bacterianas e a formação de biofilmes. Um fator importante para a adesão é que a superfície da maioria das bactérias é carregada negativamente, carga adversa à adesão devido à força repulsiva eletrostática e isso mantém a célula a uma curta distância da superfície. No entanto, fímbrias, flagelos e lipopolissacarídeos conferem hidrofobicidade à superfície celular e reduzem a força repulsiva entre as superfícies (SHI; ZHU, 2009). As fímbrias, por possuírem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, contribuem para a hidrofobicidade da superfície celular. Provavelmente, sua função na fixação de células é devido a superação da barreira de repulsão eletrostática inicial que existe entre a célula e uma superfície (DONLAN, 2002; SHI; ZHU, 2009).

Outro fator importante para a formação do biofilme, e também para sua manutenção, é o mecanismo de *Quorum Sensing* (QS), que permite com que as células bacterianas ativem genes em resposta ao reconhecimento da densidade populacional por acúmulo extracelular de moléculas sinalizadoras específicas. Assim, grande quantidade de moléculas acumuladas indicam densidade populacional alta (SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014). Então, por esse mecanismo, bactérias podem ativar a transcrição de genes que culminarão na formação de um biofilme como resposta e iniciar uma adesão, garantindo capacidade de suportar condições desfavoráveis (DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013). O QS geralmente é responsável pela estrutura densa e complexa do biofilme, pois com ele as células podem regular a expressão de uma série de genes (LAZAR, 2011). A dispersão do biofilme também pode ser coordenada por QS, o que permite que as bactérias da comunidade escapem e colonizem novos nichos quando recursos estão limitados e resíduos são acumulados (SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014).

Dessa forma, a formação do biofilme gera uma arquitetura tridimensional da matriz, com poros, canais e macrocolônias em forma de cogumelo. A estrutura dessa matriz é influenciada por concentração de nutrientes, motilidade bacteriana, comunicação intercelular, exopolissacarídeos e proteínas. Ela é composta por materiais extracelulares produzidos geralmente pelos próprios microrganismos do biofilme e possui a capacidade de reter enzimas extracelulares, nutrientes dissolvidos e componentes de células lisadas. Além disso, a matriz é uma estrutura que protege as células, apresenta propriedade viscoelástica e representa 90% da massa seca na maioria dos biofilmes (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

À vista disso, os responsáveis pela arquitetura tridimensional do biofilme são as substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que mantém a adesão à superfície e a coesão, garantindo proximidade entre as células e permitindo interações e comunicação entre elas. Os principais componentes do EPS são polissacarídeos, proteínas, fosfolipídeos, ácidos teicóicos e ácidos nucléicos. O exopolissacarídeo é considerado o principal componente estrutural da matriz do biofilme, fornecendo o esqueleto onde as células microbianas e seus produtos ficam inseridos (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

3.2. *Pseudomonas* na indústria de produtos lácteos

O gênero *Pseudomonas* é composto por microrganismos gram-negativos, aeróbios, proteolíticos e lipolíticos (GONÇALVES et al., 2017). Esse gênero apresenta diversas espécies que podem encontrar-se em diferentes tipos de matérias alimentícias, como vegetais, produtos cárneos, leite e derivados (CALDERA et al., 2016). Em leite cru, *Pseudomonas* spp. tem sido identificado como um dos gêneros mais abundantes (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2018). Von Neubeck et al. (2015) identificaram 2906 isolados de leite cru, entre bactérias e leveduras, que foram classificados em 169 espécies e 61 gêneros, dos quais *Pseudomonas*, *Lactococcus* e *Acinetobacter* foram os gêneros mais abundantes.

Estudos visando identificar bactérias psicrotróficas em leite cru refrigerado relataram que o gênero *Pseudomonas* têm sido dominantes neste tipo de alimento (XIN et al., 2017; YUAN et al., 2017). As condições de refrigeração ao longo do processamento de leite buscam manter um produto seguro, no entanto, criam um ambiente no qual a microbiota psicrotrófica responsável pela deterioração do alimento pode se desenvolver. Dessa forma, grande parte das espécies do gênero *Pseudomonas* podem se multiplicar em leite (DE JONGHE et al., 2011). Ainda, bactérias desse gênero merecem atenção especial, uma vez que a maioria das espécies

apresenta amplas faixas de temperatura de crescimento (4 - 45 °C) e produção de pigmentos e/ou enzimas que afetam os produtos alimentícios (CALDERA et al., 2016).

Microrganismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são lipolíticos e proteolíticos, ou apenas proteolíticos (VON NEUBECK et al., 2015). A atividade proteolítica deste gênero tem sido relacionada a uma protease termorresistente, a AprX. Essa proteína pode causar desestabilização de leite UHT durante o armazenamento devido a hidrólise de caseínas (MATÉOS et al., 2015). As enzimas proteolíticas estão associadas ao amargor no leite por causa da hidrólise de peptídeos e proteínas, enquanto as enzimas lipolíticas hidrolisam as gorduras do leite e estão associadas à rancidez (TEH et al., 2011).

Um grande número de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* é capaz de formar biofilmes. Yuan et al. (2018) caracterizaram a capacidade de formar biofilme, a 7 °C em aço inoxidável, de várias bactérias psicrotróficas, isoladas de leite cru. Eles mostraram que boa parte das bactérias psicrotróficas foram capazes de formar biofilme na condição estudada, especialmente as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

3.2.1. *Pseudomonas fluorescens*

A espécie *P. fluorescens* é a dominante desse gênero em leite cru e pode se multiplicar em leites armazenados em tanques refrigerados, até mesmo em temperatura de 6 °C (YUAN et al., 2017; ZHANG et al., 2015). Ela hidrolisa a caseína, quando o leite é mantido sob temperaturas de refrigeração e condições adequadas de armazenamento (PINTO et al., 2014). Além disso, essa espécie é geralmente formadora de biofilmes e, quando nesse estado, é capaz de produzir mais enzimas proteolíticas (TEH et al., 2012).

Diversos estudos têm demonstrado que *P. fluorescens* é a espécie mais comumente isolada de plantas de processamento de produtos lácteos e leite cru (CARRASCOSA et al., 2015; ROSSI et al., 2018; YUAN et al., 2017). Cepas de *P. fluorescens* causam diversos prejuízos para a indústria de alimentos, como formação anormal de pigmento azul no queijo Mozzarella (CAPUTO et al., 2015; ROSSI et al., 2018) e em queijo fresco (CARRASCOSA et al., 2015) e geleificação de leite UHT, principalmente pela hidrólise da κ -caseína pela protease AprX (ZHANG; BIJL; HETTINGA, 2018).

P. fluorescens apresenta alto potencial de deterioração. Além disso, pode ser formadora de biofilmes em superfícies de contato de alimento, como mostrado no trabalho realizado por

Wang et al. (2018). Eles estudaram biofilmes em superfície de aço inoxidável de *P. fluorescens* H5, isolada de carcaça de frango. O contato a longo prazo da bactéria com a superfície (em torno de 7 dias) formou biofilme mais espesso e com grande quantidade de EPS, assegurando uma maior resistência das células a sanitizantes.

Um fator determinante para a formação de biofilmes é a temperatura. Aswathanarayan e Vittal (2014) estudaram a capacidade de *P. fluorescens* PSD4, isolada de uma planta de processamento de produtos lácteos, formar biofilme em diferentes temperaturas. Baixas temperaturas favoreceram a formação de biofilme de *P. fluorescens* PSD4, sendo que o número de células metabolicamente ativas durante o crescimento a 4 °C foi maior do que a 30 °C.

3.3. Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfifílicas, nas quais uma porção da estrutura é hidrofóbica e outra porção é hidrofílica. A porção hidrofóbica é uma cadeia alquila. Já a porção hidrofílica geralmente possui um grupo iônico altamente polar (NAKAMA, 2017; OTZEN, 2017; ROSEN; KUNJAPPU, 2012). Essa estrutura confere à molécula a capacidade de, em baixas concentrações, adsorver em superfícies ou interfaces de um sistema (limite entre duas fases imiscíveis) e modificar a energia livre interfacial ou superficial. Por causa dessa capacidade é que surgiu a palavra surfactante, derivada da contração do termo em inglês *surface-active agent* (agente ativo de superfície) (ROSEN; KUNJAPPU, 2012).

Em consequência da estrutura da molécula, os surfactantes são divididos em classes e podem ser classificados em iônicos e não iônicos. Os surfactantes não iônicos não apresentam capacidade de se dissociarem em íons em solução aquosa. Os iônicos são subdivididos em aniônicos, catiônicos e anfóteros (NAKAMA, 2017). Surfactantes aniônicos são aqueles que apresentam no grupo principal um ânion (como sulfato, fosfato, carboxilato); surfactantes catiônicos contêm um cátion (como amônio quaternário e piridínio); não iônicos não apresentam carga na porção da estrutura hidrofílica; e os anfóteros são neutros, contendo grupos carregados negativa e positivamente (EASTOE; TABOR, 2014).

3.3.1. Concentração Crítica Micelar (CMC)

Os surfactantes, quando em baixas concentrações, posicionam-se na interface entre ar e solução na forma de monômeros. No entanto, quando a concentração ultrapassa um valor específico, é mais favorável às moléculas se agruparem, formando uma estrutura chamada de micela (SUMMERTON et al., 2017). Nesse nível crítico, conhecido como concentração crítica micelar (CMC), há uma redução de contatos da cauda hidrofóbica das moléculas de surfactante com moléculas de água (EASTOE; TABOR, 2014). Dessa forma, em concentrações maiores que a CMC, micelas e monômeros estão presentes na solução aquosa (NAKAMA, 2017).

No entanto, para compreensão da CMC é necessário conhecer um fenômeno chamado de tensão superficial. Este ocorre em consequência de um desequilíbrio de interações intermoleculares em superfícies líquidas. As moléculas dentro de um líquido são cercadas pelas semelhantes por todos os lados, apresentando assim interações favoráveis. Quando estão na superfície, perdem algumas dessas interações estabilizadoras. Como resultado, apresentam um estado de energia mais elevado que aquelas no interior do líquido. Essa energia “excessiva” por unidade de área corresponde à tensão superficial (EASTOE; TABOR, 2014).

Dessa forma, em valores abaixo da CMC, ocorre uma diminuição da tensão superficial da água com o aumento da concentração e adsorção de moléculas de surfactante na superfície. Após a CMC, moléculas adicionais formarão micelas, pois é energeticamente favorável. Então, após atingir a CMC, a tensão superficial da fase líquida é constante (Figura 2) (EASTOE; TABOR, 2014).

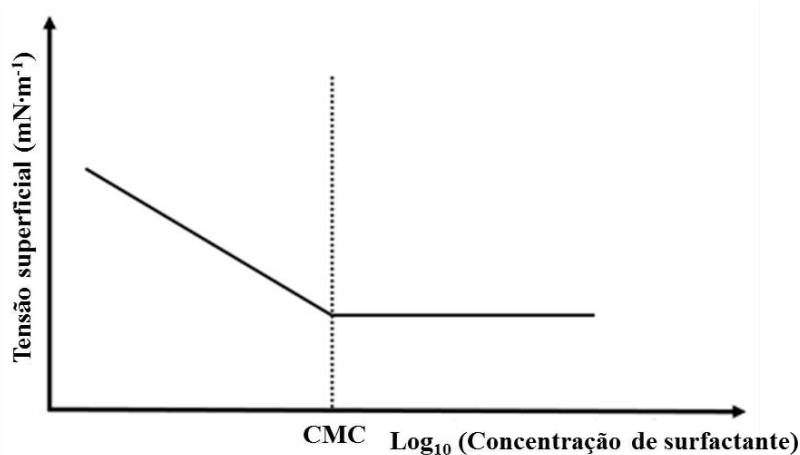


Figura 2: Relação entre concentração do surfactante e tensão superficial. Adaptado de Pacwa-Płociniczak et al. (2011).

Assim, a diminuição da tensão superficial da água por surfactantes ocorre porque moléculas de surfactante são expelidas para as interfaces do sistema com seus grupos hidrofóbicos orientados para o ar, a fim de minimizar o contato entre estes e as moléculas de água. A cauda de uma molécula de surfactante interfere na rede de ligação de hidrogênio da água circundante, por ser hidrofóbica. Quando um surfactante se localiza na interface ar-água, a cauda permanece estendida para o ar. Ao adsorver na interface ar-água, a molécula de surfactante rompe ligações de hidrogênio entre as moléculas de água da superfície, diminuindo a tensão superficial (EASTOE; TABOR, 2014; ROSEN; KUNJAPPU, 2012).

3.3.3. Biosurfactantes

As plantas, microrganismos e animais têm a capacidade de sintetizarem produtos químicos com propriedades tensoativas para atividades extracelulares e intracelulares, como emulsificação, transporte de substratos insolúveis através das membranas celulares e reconhecimento de células (BOGNOLO, 1999). Esses compostos, quando sintetizados por microrganismos, são chamados de biosurfactantes e são produzidos por fungos filamentosos, leveduras ou bactérias em meio aquoso a partir de uma fonte de carbono (BANAT et al., 2010; OTZEN, 2017). Dentre os microrganismos produtores de biosurfactantes, as bactérias são predominantes, mas algumas leveduras também são reconhecidas como produtoras de moléculas com atividade de superfície (NITSCHKE; COSTA, 2007).

Os biosurfactantes são moléculas anfifílicas com uma porção polar (hidrofílica) e outra não polar (hidrofóbica) e, em decorrência à essa característica, os biosurfactantes aumentam a área superficial de substâncias hidrofóbicas e também alteram as propriedades da superfície bacteriana (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). Seu caráter anfifílico lhe confere a capacidade de reduzir a tensão superficial entre duas fases imiscíveis (OTZEN, 2017).

A região hidrofóbica de um biosurfactante é composta geralmente por cadeias de hidrocarbonetos insaturados, saturados ou ácidos graxos, e a região hidrofílica apresenta um mono-, di- ou polissacarídeo, aminoácido, fostato ou peptídeo cíclico. São essas características que garantem a capacidade de um biosurfactantes reduzir a tensão superficial e interfacial e de formar micelas e emulsões entre duas fases diferentes (BANAT et al., 2010; NITSCHKE; COSTA, 2007). Uma emulsão consiste de um líquido imiscível disperso em outro líquido na

forma de gotículas, com diâmetro que excede 0,1 mm e os biossurfactantes podem estabilizar ou desestabilizar uma emulsão e os de maior massa, os poliméricos, podem revestir gotícula de óleo (NITSCHKE; COSTA, 2007).

A classificação dos biossurfactantes pode seguir vários critérios. Podem ser classificados quanto à sua estrutura química, peso molecular, modo de ação e origem microbiana (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). Com relação à estrutura, esses compostos podem ser classificados em três grupos principais (OTZEN, 2017; RAHMAN; GAKPE, 2008):

- Glicolipídeos: apresentam diferentes açúcares ligados a grupos alquilas lineares ou ramificados; Eles consistem de mono-, di-, tri- e tetrassacarídeos que incluem glicose, manose, galactose, ácido glucurônico, ramnose e sulfato de galactose. Pertencem a esse grupo ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e soforolipídios produzidos por espécies de fungos pertencentes ao gênero *Candida*;
- Lipopeptídeos: apresentam um ácido graxo ligando as duas extremidades de um peptídeo, formando uma estrutura cíclica. A surfactina produzida por *Bacillus subtilis* está incluída nesse grupo;
- Biossurfactantes poliméricos: normalmente possuem alta massa molecular e são solúveis em água. O emulsan, um emulsionante extracelular produzido a partir de hidrocarbonetos pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, faz parte desse grupo.

Contudo, com base na sua estrutura química e origem microbiana, são classificados em: glicolipídeos; fosfolipídeos e ácidos graxos; lipopeptídeos ou lipoproteína; surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (CHEN; JUANG; WEI, 2015). Essas mesmas denominações podem ser categorizadas em dois grupos quanto ao peso molecular: baixo peso molecular (glicolipídeos, fosfolipídeos, lipopeptídeos) e alto peso molecular (surfactantes poliméricos e particulados) (NITSCHKE; COSTA, 2007; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Embora todas estas classes sejam conhecidas, os glicolipídeos são os biossurfactantes mais estudados e entre eles estão os ramnolipídeos, trealolipídeos, soforolipídeos e lipídeos de manosileritritol (BANAT et al., 2010). Os glicolipídeos apresentam um carboidrato na cabeça da estrutura e na cauda um lipídeo, têm baixo peso molecular e consistem em mono- ou oligossacarídeos (glicose, manose, galactose, ramnose) e um ou mais ácidos graxos (saturados ou insaturados), hidroxí-ácidos graxos ou álcoois alifáticos (HENKEL et al., 2012; VAN BOGAERT et al., 2007).

3.3.3.1. Ramnolipídeo

Os ramnolipídeos são biossurfactantes sintetizados geralmente por *Pseudomonas aeruginosa* (HENKEL et al., 2012). Esses compostos pertencem ao grupo de glicolipídeos e contêm em sua estrutura uma cabeça hidrofílica formada por uma ou duas moléculas de ramnose (monoramnolipídeo e diramnolipídeo, respectivamente) e uma cauda hidrofóbica que contém ácidos graxos (Figura 3) (SÁNCHEZ et al., 2007). A cauda é composta por uma, duas ou até três cadeias de ácidos graxos β -hidroxi (saturadas, mono- ou poliinsaturadas), de diferentes comprimentos (variando de 8 a 24 carbonos), ligadas umas às outras (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, et al., 2010; GUDIÑA et al., 2015). *P. aeruginosa* pode produzir esses compostos para manutenção de canais no biofilme, mantendo-os abertos, como um mecanismo para manutenção ativa da arquitetura (DAVEY; CAIAZZA; O'TOOLE, 2003).

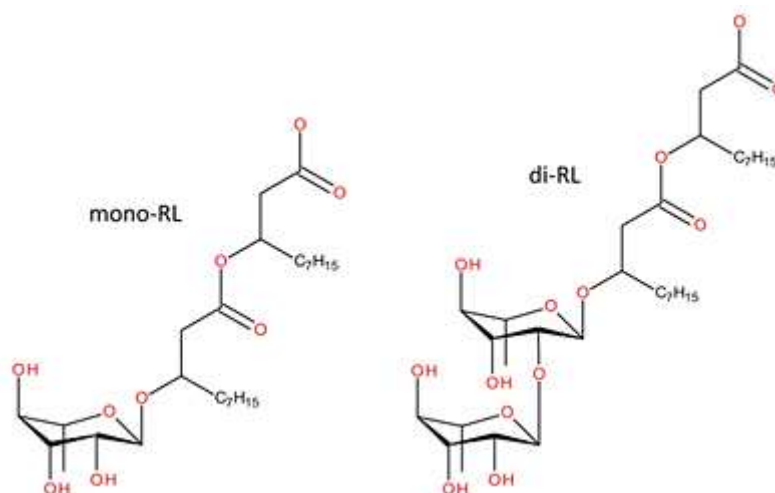


Figura 3: Representação da estrutura de monoramnolipídeo e diramnolipídeo (KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA et al., 2017).

Em consequência da sua estrutura molecular, esse biossurfactante está entre os mais eficazes, uma vez que apresenta baixos valores de tensão superficial mínima ($28-30 \text{ mN m}^{-1}$), alta atividade emulsificante (índices emulsionantes de até 60-70%) e baixa CMC (de até 200 mg L^{-1}) (GUDIÑA et al., 2015), características que têm aumentado o interesse por pesquisas com ramnolipídeos.

3.3.3.2. Surfactina

A surfactina é um biossurfactante sintetizado por várias estirpes de *Bacillus subtilis* (CHEN; JUANG; WEI, 2015; SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Possivelmente, *B. subtilis* produz esse composto para aumentar a biodisponibilidade de nutrientes insolúveis ou facilitar fixação e desprendimento de células (ROSENBERG; RON, 1999). Pertence ao grupo de lipopeptídeos e sua estrutura consiste de sete aminoácidos ligados aos grupos carboxila e hidroxila de um ácido graxo β -hidroxi com o comprimento variando de 12 a 16 carbonos (Figura 4) (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010).

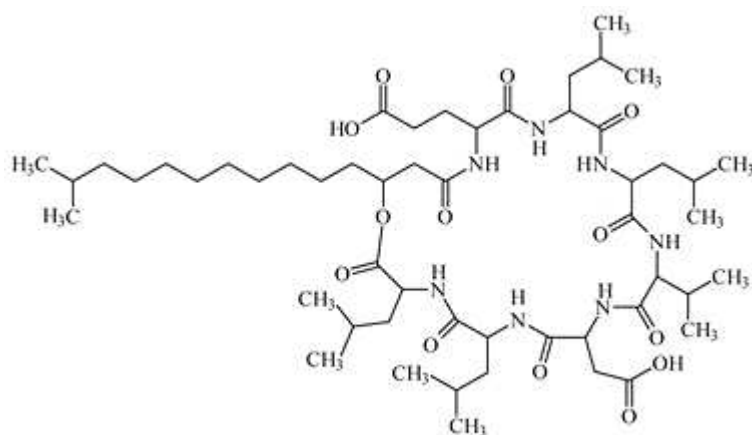


Figura 4: Representação da estrutura química da surfactina (BANAT et al., 2010).

Desse modo, são os aminoácidos e o comprimento da cadeia de ácido graxo que garantem as várias formas da surfactina (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008). Além do mais, surfactina é conhecida como um dos mais eficientes biossurfactantes, pois tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN m⁻¹ com CMC de 10 mg L⁻¹ (YEH; WEI; CHANG, 2005).

3.3.4. Cloreto de benzalcônio

O cloreto de alquil dimetil benzil amônio, conhecido como cloreto de benzalcônio, pertence ao grupo de compostos de amônio quaternário (CAQs), é um agente com propriedades antimicrobianas e apresenta CMC de 1876 mg L⁻¹ (DALTIM, 2011; GILBERT; MOORE, 2005; SMITH et al., 2002). Os CAQs são surfactantes ou agentes tensoativos catiônicos, reduzem a tensão superficial e formam micelas. A porção catiônica da estrutura consiste de um nitrogênio central com quatro grupos ligados e a porção aniônica, carregada negativamente, é geralmente composta por uma molécula de cloro ou bromo ligado ao nitrogênio para formar o sal de amônio quaternário (GERBA, 2015). O cloreto de benzalcônio apresenta um átomo de cloro em sua porção aniônica (Figura 5).

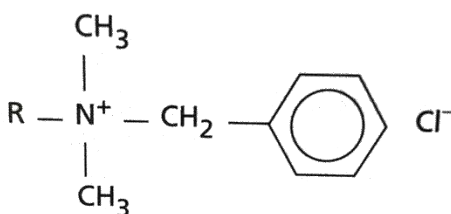


Figura 5: Representação do cloreto de benzalcônio (DALTIM, 2011).

Os CAQs são usados na composição de inúmeros produtos, como em agentes de limpeza, sanitização e desinfecção, tanto em indústrias de alimentos quanto em indústrias de produtos para cuidados com a saúde (GERBA, 2015). A ação antibacteriana ocorre em razão da alta afinidade que agentes catiônicos apresentam com a superfície de tais células, pois se ligam fortemente às paredes celulares e membranas. Essa afinidade se deve à carga líquida negativa da superfície externa das células bacterianas, que está associada ao ácido teicoico e ao polissacarídeo de bactérias gram-positivas, ao lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas e à própria membrana citoplasmática. Então, reagem com a superfície celular e se incorporam à membrana citoplasmática. Essa incorporação na membrana é suficiente para afetar o crescimento (GILBERT; MOORE, 2005). Os CAQs reagem e desorganizam a membrana citoplasmática, ocorrendo assim extravasamento de material intracelular e degradam proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, enzimas autolíticas são liberadas e promovem a lise da parede celular (FAZLARA; EKHTLAT, 2012; GERBA, 2015; McDONNELL, 2007).

3.4. Controle de biofilmes por biossurfactantes

Trabalhos têm mostrado que biossurfactantes, principalmente surfactina e ramnolipídeo, são capazes de controlar biofilmes bacterianos. Araújo et al. (2016) estudaram a capacidade de surfactina e ramnolipídeo inibirem a adesão e a formação de biofilme por condicionamento de superfícies (1 h). *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644 e ATCC 19112) e *P. fluorescens* (ATCC 13525) foram utilizadas para formação dos biofilmes a 35 e 30 °C, respectivamente, em placas de microtitulação de poliestireno e de aço inoxidável 304, com incubação por 30 h. A adesão foi reduzida até 79% e 54% em poliestireno, enquanto a formação de biofilme foi reduzida em 83% e 73% em superfícies de aço inoxidável (ramnolipídeos e surfactina, respectivamente), utilizando concentração de 0,5% (m/v).

Gomes e Nitschke (2012) também avaliaram a capacidade de ramnolipídeo e surfactina na remoção de biofilmes formados em poliestireno de culturas individuais e culturas mistas de *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis. Os pesquisadores utilizaram diferentes concentrações, 0,1 e 0,5 % (m/v) para surfactina e 0,25 e 1,0 % (m/v) para ramnolipídeo, e diferentes tempos de contato (2, 6 e 12 h) com o biofilme pré-formado. Foi observado que o aumento na concentração de biossurfactante e no tempo de contato diminuiu a porcentagem de remoção de biofilme. Dessa forma, o melhor tempo de contato estudado foi de 2 h, no qual a surfactina (0,1%) reduziu os biofilmes de *S. aureus* em 63,7 %, *L. monocytogenes* em 95,9%, *S. Enteritidis* em 35,5% e o biofilme de cultura mista em 58,5%. Ramnolipídeo (0,25%) removeu 58,5% do biofilme de *S. aureus*, 26,5% de *L. monocytogenes*, 23,0% de *S. Enteritidis* e 24,0% da cultura mista.

Em um outro estudo, Dusane et al. (2010), estudando um ramnolipídeo comercialmente disponível, avaliaram a sua capacidade de inibir a adesão e romper biofilme pré-formado de *Bacillus pumilus* (um isolado de origem marinha) em placas de microtitulação de 96 poços de poliestireno. Foi demonstrado que o ramnolipídeo levou a ruptura do biofilme e remoção de EPS em concentrações abaixo da Concentração Inibitória Mínima (MIC). Por ser uma concentração abaixo daquela que apresentaria um poder antimicrobiano, os autores associaram o efeito à ação surfactante desse agente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil.

4.1. Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizada a estirpe de *P. fluorescens* 07A, cedida pelo Departamento de Microbiologia da UFV. Essa cepa foi isolada de amostras de leite cru coletadas de tanques de refrigeração e identificada por Pinto (2004). Culturas estoques foram mantidas conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Merck®) e glicerol (Neon®) a 30%(v/v). Para os estudos, a cultura foi ativada e repicada por duas vezes em 10 mL de caldo BHI a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, a cada 18 h (VIANA, 2006).

4.2. Preparo da suspensão bacteriana

A cultura ativa foi centrifugada (4300 g, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Centrifuge 5804 R-ependorf) e lavada por duas vezes com solução salina 0,85 % (m/v). As células foram ressuspensas em água peptonada 0,1 % (m/v) e a densidade óptica foi medida com um espectrofotômetro a 600nm (Kazuaki/IL-227). A suspensão bacteriana padronizada a 10^8 UFC mL^{-1} foi diluída em água peptonada 0,1 % (m/v) para obtenção de um concentração de 10^5 UFC mL^{-1} .

4.3. Preparo e limpeza dos cupons de aço inoxidável

Foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304, com acabamento #4, de dimensões 10 x 10 x 1 mm. Antes de cada análise, os cupons foram higienizados e esterilizados seguindo o procedimento descrito por Oliveira et al. (2010). Inicialmente foram limpos por escovação com detergente neutro e enxaguados com água destilada. Posteriormente, foram imersos em acetona 100 % (v/v) por 30 min, seguindo-se imersão em solução de NaOH 1% (m/v) por 1 h. Foram enxaguados com água destilada, secos e limpos com álcool 70 % (v/v). Por fim, foram lavados com água destilada, secos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa e esterilizados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ em autoclave por 15 min.

4.4. Origem dos biossurfactantes

Os biossurfactantes surfactina e ramnolípido utilizados foram cedidos pelo Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente do Departamento de Microbiologia - UFV.

O ramnolípido é da empresa Rhamnolipid Companies, Inc. (www.rhamnolipid.com), mantido em solução estoque de 8,5 % (m/v), com CMC de 65 mg L⁻¹, de acordo a própria empresa.

O extrato bruto contendo a surfactina foi obtido por precipitação ácida, segundo método descrito por Vater et al. (2002). Foi produzido em biorreator por *Bacillus subtilis* RI4914 IsrfA em meio mineral contendo glicose como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. As células foram removidas do meio de cultivo por centrifugação (10400 g, 15 min, 4 °C), o sobrenadante foi recolhido e o pH ajustado para 2,0. Após incubação a 4 °C *overnight*, o biossurfactante precipitado foi recuperado por centrifugação (10400 g, 20 min, 4 °C) e dissolvido em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 7,0. A amostra foi liofilizada por 24 h e mantida a 4 °C. O produto utilizado foi coletado da espuma, apresentando CMC de 31,25 mg L⁻¹. Esta medida foi determinada por meio de medidas de tensão superficial da solução de extrato bruto da produção de biossurfactante, diluindo-se sucessivamente até o valor da tensão se aproximar ao valor da água. O valor de CMC foi dada pelo ponto central da inflexão da curva do gráfico de tensão superficial versus concentração do extrato bruto.

4.5. Preparo das soluções surfactantes

Soluções estoque dos biossurfactantes foram preparadas pela dissolução de cada biossurfactante em tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,2) na maior concentração avaliada (RIVARDO et al., 2009). Estas soluções foram filtradas através de filtros de 0,45 µm e depois armazenadas a 4 ° C. Solução estoque de cloreto de benzalcônio (Vetec[®]) também foi preparada em PBS (esterilizado por filtro com poro de 0,45 µm). Para os experimentos, as soluções estoques dos agentes surfactantes foram diluídas em PBS.

Para cada repetição, uma nova solução estoque foi preparada. As concentrações utilizadas de surfactina, ramnolípido e cloreto de benzalcônio estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Surfactantes e concentrações utilizadas para avaliação da remoção de *Pseudomonas fluorescens* aderidas em cupons de aço inoxidável.

Surfactantes	Concentrações (mg L ⁻¹)
Rhamnolipídeo	32,5
	65,0
	97,5
	130,0
	162,5
Surfactina	15,6
	31,2
	46,8
	62,4
	78,0
Cloreto de benzalcônio	1400
	1800
	2200
	2600
	3000

O critério para seleção dessas concentrações foi baseado na CMC, selecionando-se uma concentração abaixo, uma próxima ou igual e as demais acima dessa concentração.

4.6. Formação do biofilme por *P. fluorescens*

Após a higienização e esterilização dos cupons, estes foram colocados em poços de placa para cultura de poliestireno de 24 poços (Kasvi[®]), segundo o procedimento de Novello (2012) modificado. Os poços foram preenchidos com 900 µL de leite integral UHT (Tabela 2) e 100 µL da suspensão bacteriana a 10⁵ UFC mL⁻¹ (preparada conforme item 4.2), para obter uma concentração inicial de aproximadamente 10⁴ UFC mL⁻¹. Após a imersão dos cupons, as placas para cultura foram incubadas a 7 °C e mantidas por 120 h, sem agitação. Nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 h, os cupons foram removidos e lavados com 1 mL de solução salina 0,85 % (m/v), transferidos para placas de 24 poços com 1000 µL de leite integral UHT e novamente incubados a 7 °C. A cada intervalo de incubação, cupons foram submetidos à quantificação de células aderidas.

Tabela 2: Compostos presentes no leite integral UHT utilizado (valores obtidos da embalagem do produto adquirido comercialmente).

Parâmetros	Valor
Carboidrato (%)	4,4
Proteína (%)	3
Gordura (%)	3

4.7. Quantificação de células aderidas

Para quantificação das células aderidas, segundo o procedimento empregado por Viana (2006) modificado, os cupons foram inicialmente retirados das placas de cultura e lavados com solução salina 0,85 % (m/v), para remoção de células livres. Posteriormente, foram colocados em tubos de ensaio contendo 2 mL de água peptonada 0,1 % (m/v), e submetidos a um banho de ultrassom, com gelo, por 10 min (Frequência 40 kHz; potência 160 W; Branson®), para remoção das células aderidas. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada em vórtex e uma alíquota de 100 µL foi retirada para realização de diluições decimais seriadas em 900 µL de água peptonada 0,1 % (m/v), em microtubos tipo Eppendorf. O plaqueamento foi em triplicata pela técnica de microgotas (MORTON, 2001), inoculando-se 20 µL das diluições em Ágar Triptona de Soja (TSA - OXOID®) contido em placas de Petri descartáveis (Olen®). Após incubação por 12 a 15 h a 26 °C, as contagens foram realizadas em contador de colônias e expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por cm². Quando necessário, plaqueamento em superfície pela técnica de *spread plate* também foi realizado, na qual 100 µL de cada diluição foi inoculada, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, na superfície do ágar TSA. O número de UFC cm⁻² foi calculado pela equação 1 (BERNARDES, 2008).

$$\text{UFC cm}^{-2} = \frac{(V_d/V_a) \times M \times D}{A} \quad \text{eq.1}$$

Em que:

V_d: Volume (mL) do diluente usado para remoção de células aderidas

V_a: Volume (mL) da alíquota usada para plaqueamento

M: Média da contagem (UFC) obtida nas placas

D: Inverso da diluição

A: Área do cupom (cm²)

4.8. Ação das soluções surfactantes sobre os biofilmes de *P. fluorescens*

Os biofilmes de *P. fluorescens* em cupons de aço inoxidável foram formados como descrito no item 4.6. No tempo de 120 h, os cupons foram removidos dos poços, lavados com solução salina 0,85 % (m/v) e transferidos para novos poços com um volume de 1 mL de solução do agente surfactante na concentração desejada, preparadas como escrito no item 4.5. Os cupons foram incubados com essas soluções pelos tempos de 10, 30, 50, 70 e 90 min à temperatura de 25 °C. Além disso, foi realizado um teste controle no qual os cupons foram incubados com tampão fosfato salino (PBS; 10 mM; pH 7,2), nos tempos já descritos. Quando o surfactante utilizado foi o cloreto de benzalcônio, os cupons após o tratamento foram neutralizados em Tween 80 (Sigma[®]) a 2 % (v/v) por 1 min. Os cupons, após os tratamento, foram lavados com solução salina 0,85 % (m/v) para remoção dos produtos residuais e a quantificação de células aderidas foi realizada como descrito no item 4.7.

Foi calculado o número de reduções decimais (RD) para cada tratamento utilizando-se a equação 2.

$$RD=X_0-X_1 \quad \text{eq.2}$$

Em que:

RD: número de reduções decimais

X₀: Log₁₀ das contagens de *P. fluorescens* aderidas ao cupom antes da aplicação dos tratamentos

X₁: Log₁₀ das contagens de *P. fluorescens* aderidas ao cupom após a aplicação dos tratamentos

O limite de detecção foi de 10 UFC cm⁻². Assim, para a análise dos dados de reduções decimais, as contagens expressas em <10 UFC cm⁻² foram tomadas como 9 UFC cm⁻², cujos dados foram transformados em log UFC cm⁻² (SALUSTINO, 2007).

4.9. Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Cupons após a formação do biofilme e após a aplicação dos tratamentos (item 4.8) foram lavados duas vezes por imersão em PBS 0,2 M com pH 7,2 e corados segundo metodologia de Calish et al. (1979), modificada por Ribeiro (2012). Os cupons foram incubados na ausência de luz por 15 min com mistura de iodeto de propídeo $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (IP) (Sigma-Aldrich[®], Alemanha) e isotiocianato de fluoresceína $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (FITC) (Sigma-Aldrich[®], Alemanha) em PBS (0,2 M; pH 7,2), preparadas antes do uso. Após incubação, os cupons foram lavados por imersão em PBS (0,2 M; pH 7,2) e analisados em Microscópio Confocal de Varredura a Laser, modelo LSM 510 META (Zeiss, Alemanha), utilizando-se laser de argônio (comprimentos de onda de 458 e 514 nm), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV. As células com coloração esverdeada foram consideradas vivas e aquelas que se apresentaram avermelhadas foram consideradas mortas (WANG et al., 2012).

4.10. Delineamento experimental

Para cada agente surfactante, o experimento foi conduzido segundo um arranjo em parcela subdivida, com concentrações em cinco níveis na parcela com três repetições segundo um delineamento inteiramente casualizado, e o tempo de contato em cinco níveis na subparcela.

Para estudar os dois fatores (concentração, tempo de contato) e a interação, foi realizada análise de variância a 1% de probabilidade. Após a determinação de fatores e/ou interação significativa, os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão. Os modelos foram escolhidos baseado na significância dos coeficientes de regressão pelo teste “t” ao nível de 0,05 de probabilidade e no coeficiente de determinação (R^2).

Todas as análises foram conduzidas com o auxílio do pacote estatístico *Statistical Analysis System* (SAS[®]).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Formação de biofilmes por *P. fluorescens* em aço inoxidável

Os dados relativos ao número de células de *P. fluorescens* aderidas aos cupons de aço inoxidável ao longo de 120 h, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Média do número de células aderidas (Log UFC cm⁻²) de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável AISI 304 # 4, incubado a 7 °C em leite integral UHT.

Tempo (h)	Log (UFC cm ⁻²)*
24	3,41 ± 0,11
48	3,77 ± 0,52
72	5,68 ± 0,38
96	5,74 ± 0,35
120	6,10 ± 0,10

* Média de três repetições

Observou-se que o número de células aderidas aumentou com o tempo de contato. Após 120 h de incubação, foi atingida uma concentração em torno de 10⁶ UFC cm⁻². Além disso, nota-se que após o tempo de 72 h de incubação do cupom de aço inoxidável em leite integral UHT, o número de células de *P. fluorescens* demonstrou uma adesão característica de biofilme, ou seja, acima de 10⁵ UFC cm⁻², conforme proposto por Ronner e Wong (1993). Esses autores afirmam que é necessário um número mínimo entre 10⁵ e 10⁶ UFC cm⁻² para se considerar formação de biofilme. Dessa forma, ao longo do tempo de incubação aqui estudado, as células aderidas aos cupons se multiplicaram e levaram à formação de um biofilme.

No presente estudo, biofilme foi formado à temperatura de 7 °C. Trabalhos também têm mostrado a capacidade dessa espécie formar biofilme em condições de refrigeração. Kives et al. (2005) estudaram *P. fluorescens* B52 (isolada a partir de leite cru refrigerado) quanto à capacidade de formar biofilme por 72 h a 7 °C, em lamínulas de vidro, incubadas em leite desnatado UHT. Após este tempo, ocorreu formação de biofilmes com cerca de 10⁶ UFC cm⁻².

Dessa forma, em razão de cepas dessa espécie serem geralmente psicrotóficas, temperaturas de refrigeração provavelmente não impedem sua multiplicação e/ou formação de biofilmes. Yuan et al. (2018) estudaram um grande número de bactérias psicrotóficas isoladas

de leite cru quanto à formação de biofilme em aço inoxidável e polipropileno, por 7 dias a 7 °C, utilizando leite desnatado UHT. Eles apontaram que baixas temperaturas favoreceram a formação de biofilme, sendo que os isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram mais eficientes em formar biofilmes do que os de outros gêneros.

Estudos também demonstram que algumas linhagens de *P. fluorescens* podem produzir mais biofilmes a baixa do que em alta temperatura. Rossi et al. (2018) demonstraram que a cepa ATCC 13525, após incubação a 48 h, produziu mais biofilme a 10 °C do que a 30 °C. Aswathanarayan e Vittal (2014), estudando a formação de biofilmes de *P. fluorescens* PSD4 (isolado de uma linha de processamento de laticínio), evidenciaram que a 4 °C o biofilme apresentava maior aderência, com alta atividade metabólica do que a 30 °C. Rossi et al. (2016), estudando a formação de biofilme a 10 e 30 °C de 64 linhagens de *P. fluorescens* isoladas de leite, produtos lácteos e laticínios, constataram que 89 % dos isolados formaram biofilmes e, em geral, a temperatura de 10 °C favoreceu a formação de biofilme após 48 h, provavelmente porque as cepas estavam adaptadas às baixas temperaturas.

No entanto, mesmo sendo *P. fluorescens* um microrganismo psicrotrófico, o crescimento e a adaptação à temperatura de refrigeração é dependente da cepa estudada. Caixeta et al. (2012), estudaram a capacidade de adesão e formação de biofilmes por *P. fluorescens* ATCC 13525 em aço inoxidável AISI 304, na presença de leite desnatado reconstituído a 7 °C. Essa cepa mostrou não ser capaz de formar biofilmes.

Outros fatores, além da temperatura, podem afetar a formação de biofilmes, como os nutrientes (ALLEN; HABIMANA; CASEY, 2018). Para a obtenção de resultados mais confiáveis e diretamente aplicáveis à indústria de alimentos, é importante utilizar nas pesquisas condições de temperatura e nutrientes tão semelhantes quanto possível àquelas encontradas na indústria alimentícia, visto que os resíduos alimentares são a principal fonte de nutrientes utilizados pelos microrganismos (LAMAS et al., 2018). Por conta disso, nesse trabalho o aço inoxidável foi utilizado como superfície para formação de biofilme e o leite integral usado como fonte de nutrientes para *P. fluorescens*.

5.2. Efeito das soluções surfactantes sobre o biofilme de *P. fluorescens*

5.2.1. Surfactina

A análise de variância aplicada aos dados de redução decimal (RD) de *P. fluorescens* em resposta a aplicação de surfactina (Tabela 4) indicou a ocorrência de interação não significativa ao nível de 0,01 de probabilidade pelo teste F entre concentração e tempo. O resultado indica que o efeito de uma variável independe do efeito da outra sobre a variável resposta (RD). Portanto, pode-se analisar os efeitos de concentração e tempo sobre RD separadamente. O fator concentração foi não significativo ($P > 0,01$), sendo o fator tempo significativo ($P < 0,01$). Assim, foi ajustado um modelo de regressão para a resposta em função do tempo (Figura 6).

Tabela 4: Resumo da análise de variância da redução decimal (expressa em Log UFC cm⁻²), de *Pseudomonas fluorescens* 07A aderida em aço inoxidável, após a aplicação de surfactina em diferentes concentrações e tempos de contato.

FV	GL	Quadrado médio
Concentração (CON)	4	0,0715
Erro (A)	10	0,2439
Tempo (TP)	4	0,8770*
CON*TP	16	0,2266
Erro (B)	40	0,1313

*significativo a 1% de probabilidade pelo teste F ($P < 0,01$).

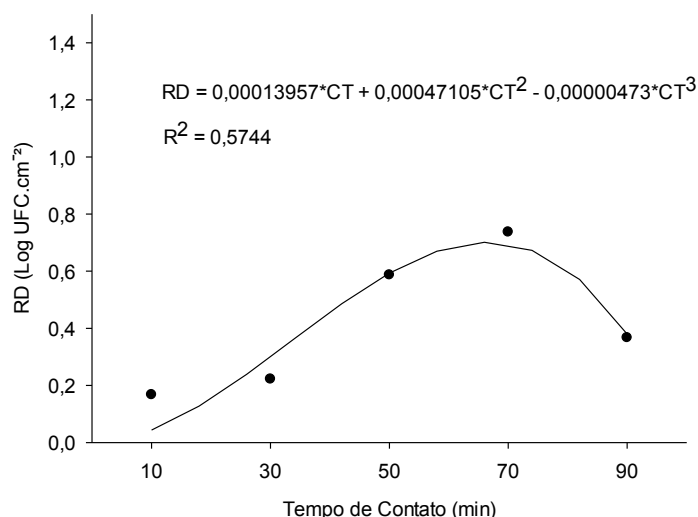


Figura 6: Redução decimal de *Pseudomonas fluorescens* 07A, expressa em UFC cm⁻² aderidos em cupons de aço inoxidável, após o tratamento com surfactina por diferentes tempos de contato.

No presente estudo, as soluções de surfactina apresentavam pH 7,2. Esse biossurfactante, quando em pH neutro, é considerado um surfactante aniônico devido aos resíduos de ácido aspártico e glutâmico que ficam carregados negativamente. As mudanças de pH levam a alterações na molécula e mudanças na hidrofobicidade. Em pH elevado, a surfactina forma estruturas micelares com baixo número de agregação, mas em valores baixos de pH, a estrutura torna-se semelhante a uma haste a pH 6,5 e lamelar a pH 5,5 (SHEN et al., 2011). Por isso, o controle do pH da solução com surfactina pode ser importante quando o interesse é usá-la como agente surfactante.

Nesse trabalho, o efeito da redução populacional de *P. fluorescens*, não foi dependente da concentração de surfactina (Tabela 4). Efeito similar foi obtido no trabalho de Gomes e Nitschke (2012) em que o aumento na concentração desse biossurfactante não aumentou a remoção de biofilmes. Rivardo et al. (2009) também reportaram que o aumento da concentração de biossurfactantes lipopeptídicos, produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* não influenciou o efeito de atividade antiaderente contra *Staphylococcus aureus*.

No trabalho de Nitschke et al. (2009), foi observado que a redução na adesão bacteriana promovida por surfactina parece não estar relacionada à concentração de CMC, uma vez que a concentração que demonstrou efeito foi muito maior que a CMC. Dessa forma, o efeito da surfactina sobre biofilmes/células aderidas está relacionada à concentração desse agente na solução.

Em relação ao tempo de contato (Figura 6), é possível verificar que com o aumento do tempo, a RD do biofilme pré-formado também aumentou, havendo no entanto redução do efeito após 70 min. Gomes e Nitschke (2012) observaram que, após longos tempos de contato, a capacidade de remoção de biofilme desse agente pode diminuir. Dessa forma, pode-se sugerir que esse biossurfactante poderia estar estimulando o crescimento celular, sendo usado como nutriente, ou as moléculas foram degradadas, levando à diminuição de sua atividade. Ou ainda devido a adaptação enzimática do microrganismo ao agente, favorecida por longos tempos de contato (GOMES e NITSCHKE, 2012).

5.2.2. Ramnolipídeo

Os resultados da análise de variância (Tabela 5) mostraram que o número de RD de *P. fluorescens* diferiu ($P < 0,01$) em razão das concentrações de ramnolipídeo e dos tempos de contato. No entanto, não foram constatadas diferenças ($P < 0,01$) nesse número quando se avaliou a interação concentração e tempo de contato. Dessa forma, foi ajustado um modelo de regressão para cada fator (Figura 7; Figura 8).

Tabela 5: Resumo da análise de variância da redução decimal (expressa em Log UFC cm⁻²), de *Pseudomonas fluorescens* 07A aderida em aço inoxidável, após a aplicação de ramnolipídeo em diferentes concentrações e tempos de contato.

FV	GL	Quadrado médio
Concentração (CON)	4	1,1288*
Erro (A)	10	0,1435
Tempo (TP)	4	1,0451*
CON*TP	16	0,4357
Erro (B)	40	0,1766

* significativo a 1% de probabilidade pelo teste F ($P < 0,01$)

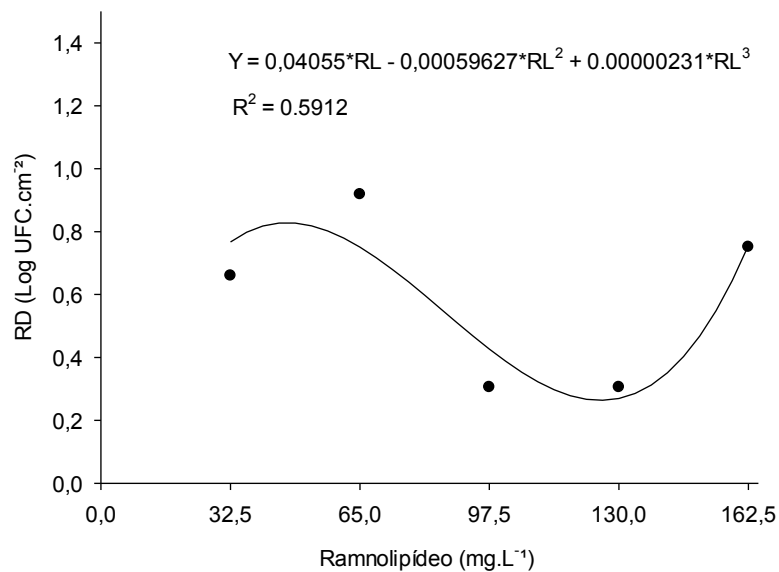


Figura 7: Redução decimal de *Pseudomonas fluorescens* 07A, expressa em UFC cm⁻² aderidos em cupons de aço inoxidável, após o tratamento com diferentes concentrações de ramnolipídeo.

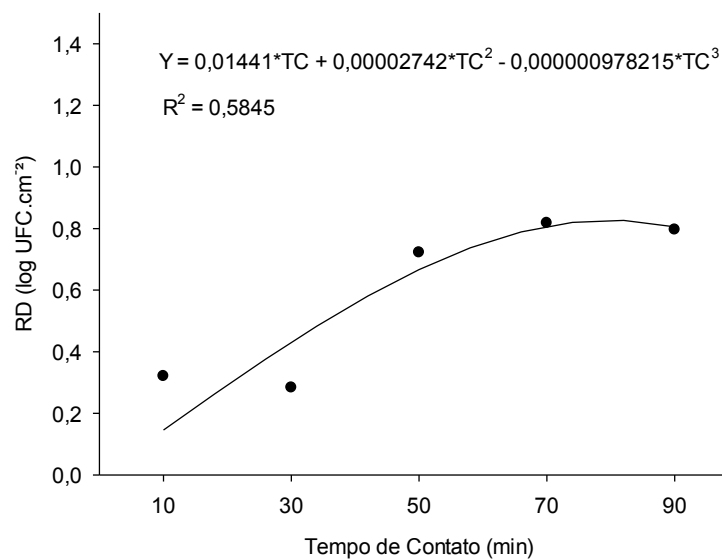


Figura 8: Redução decimal de *Pseudomonas fluorescens* 07A, expressa em UFC cm⁻² aderidos em cupons de aço inoxidável, após o tratamento com ramnolipídeo por diferentes tempos de contato.

Nesse estudo, as soluções de ramnolipídeo apresentavam pH de 7,2. Esse biossurfactante, de acordo com o aumento do valor do pH, apresenta transformações morfológicas, passando de grandes vesículas para pequenas vesículas e depois para micelas (DAHRAZMA; MULLIGAN; NIEH, 2008). Além disso, o ramnolipídeo tem caráter aniônico

em pH neutro (LEBRÓN-PALER; PEMBERTON, 2006). Por isso, a necessidade de controle do pH da solução com esse biossurfactante.

Além do pH, a capacidade de ramnolipídeo em remover biofilmes é fortemente dependente da natureza do meio de cultura utilizado para formação do biofilme. No trabalho de Silva et al. (2017) um ramnolipídeo foi avaliado quanto à sua capacidade de remover biofilmes de *S. aureus* formados em placas de poliestireno utilizando caldo nutriente e leite desnatado como meio de crescimento. O tratamento com esse agente foi realizado em diferentes concentrações de surfactante e temperaturas. O ramnolipídeo removeu até 88,9% dos biofilmes que se formaram durante o cultivo em leite, enquanto que, para o meio nutriente, 35% da remoção foi obtida. O resultado foi explicado pelo alto teor de carboidratos dos biofilmes formados durante o cultivo em leite, o que possivelmente favoreceu sua ruptura por ramnolipídeo.

No presente estudo, ramnolipídeo na concentração da CMC (65 mg L⁻¹) foi capaz de reduzir 0,92 UFC cm⁻² da população de *P. fluorescens* (Figura 7). No trabalho de Kim et al. (2015), ramnolipídeo em PBS também mostrou grande potencial para redução de um biofilme maduro (4 dias) quando em concentrações próximas à CMC. No entanto, aqui foi observado que nas concentrações de 97,5 e 130 mg L⁻¹, a capacidade desse agente de remoção do biofilme reduziu. Gomes e Nitschke (2012) observaram que ramnolipídeo aumentou a adesão de células de *Listeria monocytogenes* e sugeriram que esse agente poderia promover uma alteração nas propriedades hidrofóbicas ou eletrostáticas da superfície, o que pode favorecer a fixação das células. Entretanto, na concentração de 162,5 mg L⁻¹, o número de RD aumentou (Figura 7). Isso pode estar relacionado ao fato de que ramnolipídeo tem se mostrado como um agente antimicrobiano (ARAÚJO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2016). Assim concentrações mais elevadas poderiam mostrar um maior efeito na redução da população bacteriana de um biofilme, por meio de sua ação antimicrobiana.

Em relação ao tempo de contato (Figura 8), houve aumento da redução decimal da população de *P. fluorescens* aderida ao cupom de aço inoxidável. Dessa forma, maior tempo de contato pode estar permitindo que o biossurfactante penetre na interface entre a superfície e o biofilme, depois adsorva na interface, reduzindo a tensão interfacial, e assim diminuindo as interações entre as superfícies bacterianas e a superfície do aço inoxidável, facilitando a remoção do biofilme (GOMES; NITSCHKE, 2012; McLANDSBOROUGH et al., 2006). No entanto, esse aumento de RD pode também estar relacionado à capacidade antimicrobiana desse biossurfactante.

5.2.3. Cloreto de benzalcônio

A partir da análise de variância quanto à aplicação de cloreto de benzalcônio (Tabela 6), observa-se que houve efeito significativo de interação entre concentração e tempo para a variável resposta, a 1% de probabilidade, pelo teste F. Sendo assim, os efeitos de concentração e tempo não podem ser analisados isoladamente. Dessa forma, foi ajustado um modelo para se representar a interação dos fatores (Figura 9; Tabela 7). Para esse agente surfactante, não foi ajustado modelo utilizando os dados obtidos para tempo de contato de 90 min, uma vez que, para todas as concentrações nesse tempo, o limite de detecção de $<10 \text{ UFC cm}^{-2}$ foi atingido.

Tabela 6: Resumo da análise de variância da redução decimal (expressa em Log UFC cm^{-2}), de *Pseudomonas fluorescens* 07A aderida em aço inoxidável, após a aplicação de cloreto de benzalcônio em diferentes concentrações e tempos de contato.

FV	GL	Quadrado médio
Concentração (CON)	4	0,9206*
Erro (A)	10	0,0287
Tempo (TP)	3	10,2900*
CON*TP	12	0,3476*
Erro (B)	30	0,0178

* significativo a 1% de probabilidade pelo teste F ($P < 0,01$)

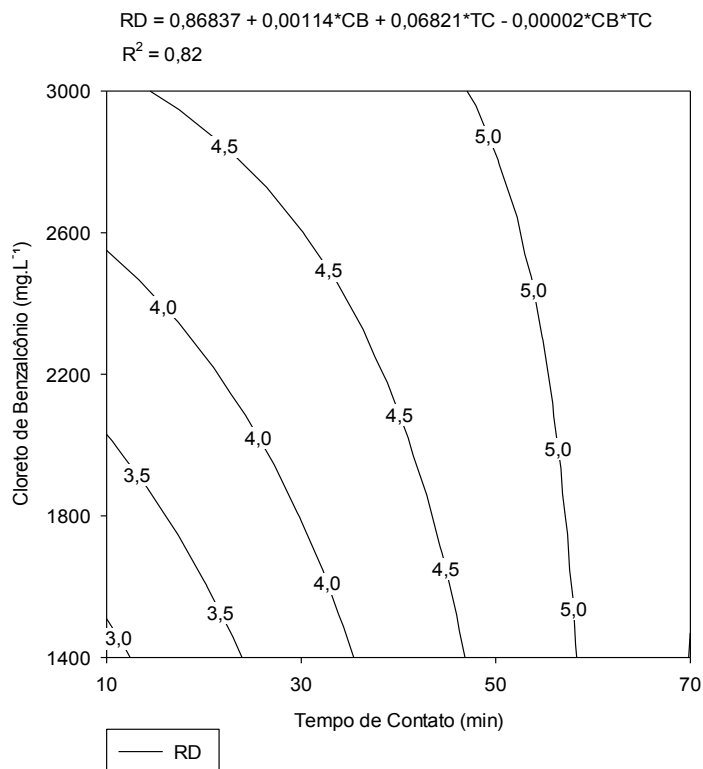


Figura 9: Gráfico de contorno da redução decimal de *Pseudomonas fluorescens* 07A, expressa em UFC cm⁻² aderido em cupons de aço inoxidável, após o tratamento com diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio por diferentes tempos de contato.

Tabela 7: Valores de RD estimados⁽¹⁾ em função da interação entre tempos de contato (TC), considerando intervalos de 10 min, e concentrações de cloreto de benzalcônio (CB), com intervalos de variação de 200 mg L⁻¹.

TC \ CB	10	20	30	40	50	60	70	Média
1400	2,90	3,33	3,77	4,20	4,64	5,07	5,51	4,20
1600	3,09	3,49	3,89	4,29	4,69	5,09	5,49	4,29
1800	3,28	3,64	4,01	4,37	4,74	5,10	5,47	4,37
2000	3,47	3,80	4,13	4,46	4,79	5,12	5,45	4,46
2200	3,66	3,96	4,25	4,55	4,84	5,14	5,43	4,55
2400	3,86	4,11	4,37	4,63	4,89	5,15	5,41	4,63
2600	4,05	4,27	4,50	4,72	4,94	5,17	5,39	4,72
2800	4,24	4,43	4,62	4,81	4,99	5,18	5,37	4,81
3000	4,43	4,59	4,74	4,89	5,05	5,20	5,35	4,89
Média	3,66	3,96	4,25	4,55	4,84	5,14	5,43	4,55

⁽¹⁾ Equação: RD = 0,86837 + 0,00114*CB + 0,06821*TC - 0,00002*CB*TC

Pelo gráfico de contorno (Figura 9), é possível observar que o número de RD foi aumentado com o avanço do tempo de contato para todas as concentrações. Da mesma forma, o aumento da concentração de CB também aumentou o valor da variável resposta. O número de RD de *P. fluorescens* continuou a aumentar mesmo em valores acima da CMC (1876 mg L⁻¹). Sabe-se que a tensão superficial da solução estará reduzida ao máximo em valores iguais ou maiores que a CMC (ROSEN; KUNJAPPU, 2012). Dessa forma, ocorre uma maior molhabilidade da superfície do aço inoxidável, favorecendo, portanto, maior remoção da população da bactéria aderida.

Além disso, o CB é um composto de amônio quaternário (CAQ) e tem bons efeitos antibacterianos contra diversos microrganismos, sendo que concentrações menores que 200 mg L⁻¹ têm demonstrado esse efeito (FAZLARA; EKHTLAT, 2012). Essa ação antimicrobiana está associada à capacidade dos CAQs reagirem e desorganizarem a membrana citoplasmática, ocorrendo assim extravasamento de material intracelular e degradação de proteínas e ácidos nucleicos (FAZLARA; EKHTLAT, 2012; GERBA, 2015; McDONNELL, 2007).

5.3. Biofilmes de *P. fluorescens* observados por microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

A MCVL permitiu visualizar, por meio do uso dos fluoróforos isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídeo (IP), células viáveis e não viáveis nos biofilmes antes e após a aplicação dos agentes surfactantes.

A capacidade de marcação de células com FITC está relacionada à reatividade desse composto com grupos aminas e sulfidrilas nas proteínas (BROWN; HAMPTON, 2011; CASANOVAS et al., 2008). Já o IP, ao entrar na célula, liga-se aos ácidos nucleicos e sua fluorescência é aumentada. Assim, células com membranas danificadas (mortas) fluorescem em vermelho, sobrepondo ao verde do FITC (DAVEY; HEXLEY, 2011; RIEGER et al., 2011).

Na Figura 10 é possível visualizar as imagens obtidas por MCVL de biofilmes de *P. fluorescens* em aço inoxidável formados na presença de leite integral UHT, antes e após o tratamento com os agentes surfactantes. Tendo em vista que FITC liga-se a proteínas, sem nenhuma especificidade se é bacteriana ou não, proteínas possivelmente oriundas do leite integral UHT utilizado como meio de cultivo neste estudo também foram marcadas. Dessa forma, a superfície do cupom de aço inoxidável também apresentou emissão de fluorescência.

A imagem obtida da superfície do cupom de aço inoxidável com o biofilme formado sem tratamento (Figura 10A) mostra um grande número de células vivas. Após a aplicação dos agentes surfactantes, surfactina a $31,2 \text{ mg L}^{-1}$ por 70 min (Figura 10B), ramnolipídeo a 65 mg L^{-1} por 70 min (Figura 10C) e cloreto de benzalcônio 1800 mg L^{-1} por 10 min (Figura 10D), observam-se mudanças no biofilme. Todos os três agentes promoveram morte de células aderidas. No entanto, só ramnolipídeo e cloreto de benzalcônio reduziram a densidade do biofilme, sendo que CB proveu maior redução. Esses resultados confirmam os dados previamente obtidos por contagem de células viáveis por plaqueamento.

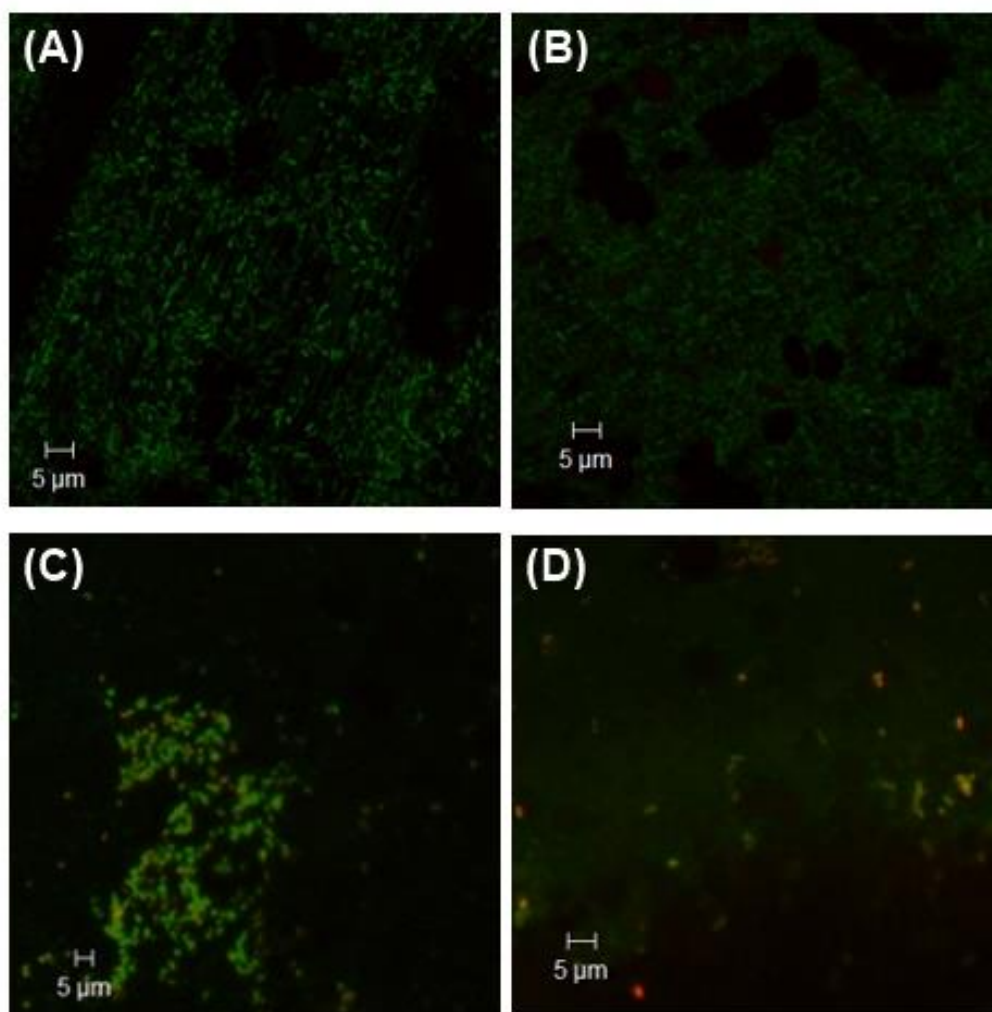


Figura 10: Imagens de Microscopia Confocal de Varredura a Laser de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* 07A, formados sobre aço inoxidável por 120 h a 7 °C, em leite integral UHT, sem tratamento (A) e após aplicação de surfactina (31,2 mg L⁻¹ por 70 min) (B), rhamnolípídeo (65 mg L⁻¹ por 70 min) (C) e de cloreto de benzalcônio (1800 mg L⁻¹ por 10 min) (D).

6. CONCLUSÃO

Pseudomonas fluorescens foi capaz de formar biofilme em superfície de aço inoxidável na presença de leite integral UHT durante 120 h, na temperatura de 7 °C.

O biossurfactante surfactina não demonstrou maior capacidade de remoção do biofilme com aumento da concentração. No entanto, demonstrou que diferentes tempos de contato foram capazes de ter efeito na redução de células. Já o ramnolipídeo demonstrou que, na concentração empregada da CMC, pode ser capaz de remover aproximadamente 1 log de UFC cm⁻². Também, o aumento do tempo de contato exerce efeito sobre a capacidade de remoção.

O cloreto de benzalcônio, o surfactante sintético usado para comparação, apresentou melhor capacidade de remoção e morte da população de células de *P. fluorescens* aderidas ao cupom. E isso foi também confirmado pela Microscopia Confocal de Varredura a Laser.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N. E. Chihib. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, p. 453–472, 2014.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1323-1336, 2010.
- ALLEN, A.; HABIMANA, O.; CASEY, E. The effects of extrinsic factors on the structural and mechanical properties of *Pseudomonas fluorescens* biofilms: A combined study of nutrient concentrations and shear conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 165, p. 127–134, 2018.
- ARAÚJO, L. V.; ABREU, F.; LINS, U.; SANTA ANNA, L. M. M.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, p. 481–488, 2011.
- ARAÚJO, L. V.; GUIMARÃES, C. R.; MARQUITA, R. L. S.; SANTIAGO, V. M. J.; SOUZA, M. P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v. 63, p. 171-178, 2016.
- ASWATHANARAYAN, J. B.; VITTAL, R. R. Attachment and Biofilm Formation of *Pseudomonas fluorescens* PSD4 Isolated from a Dairy Processing Line. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 1903-1910, 2014.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.
- BERNARDES, P. C. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão.** 2008. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. 2008.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.
- BROWN, K. K.; HAMPTON, M. B. Biological targets of isothiocyanates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 888–894, 2011.
- CAIXETA, D. S.; SCARPA, T. H.; BRUGNERA, D. F.; FREIRE, D. O.; ALVES, E.; ABREU, L. R. D.; PICCOLI, R. H. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 1, p. 142-150, 2012.

CALDERA, L.; FRANZETTI, L.; VAN COILLIE, E.; DE VOS, P.; STRAGIER, P.; DE BLOCK, J.; HEYNDRICKX, M. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. **Food Microbiology**, v. 54, p. 142-153, 2016.

CALISH, V. L. G.; KIPNIS, T. L.; MARIANO, M.; NETO, C. F.; SILVA, W. D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 12, p. 20-30, 1979.

CARNIELLO, V.; PETERSON, B. W.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 261, p. 1-14, 2018.

CAPUTO, L.; QUINTIERI, L.; BIANCHI, D. M.; DECASTELLI, L.; MONACI, L.; VISCONTI, A.; BARUZZI, F. Pepsin-digested bovine lactoferrin prevents Mozzarella cheese blue discoloration caused by *Pseudomonas fluorescens*. **Food Microbiology**, v. 46, p. 15-24, 2015.

CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCIA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 545-556, 2012.

CARRASCOSA, C.; MILLÁN, R.; JABER, J. R.; LUPIOLA, P.; ROSARIO-QUINTANA, C.; MAURICIO, C.; SANJUÁN, E. Blue pigment in fresh cheese produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Food Control**, v. 54, p. 95-102, 2015.

CASANOVAS, J.; JACQUEMIN, D.; PERPÈTE, E. A.; ALEMÁN, C. Fluorescein isothiocyanate: Molecular characterization by theoretical calculations. **Chemical Physics**, v. 354, p. 155-161, 2008.

CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158-169, 2015.

CLOETE, T. E.; THANTSHA, M. S.; MALULEKE, M. R.; KIRKPATRICK, R. The antimicrobial mechanism of electrochemically activated water against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as determined by SDS-PAGE analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 379-384, 2009.

CORONEL-LEÓN, J.; MARQUÉS, A. M.; BASTIDA, J.; MANRESA, A. Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control, **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 99-111, 2016.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

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.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. 1 ed. São Paulo: Blucher, 2011. 330 p.

DAVEY, H. M.; HEXLEY, P. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* permeable to propidium iodide. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 163–171, 2011.

DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 1027-1036, 2003.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; VAN HOORDE, K.; MESSENS, W.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Influence of Storage Conditions on the Growth of *Pseudomonas* Species in Refrigerated Raw Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2 p. 460–470, 2011.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 580-589, 2013.

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

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

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

DUSANE, D. H.; NANCHARAI, Y. V.; ZINJARDE, S. S.; VENUGOPALAN, V. P. Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 242–248, 2010.

EASTOE, J.; TABOR, R. F. Cap. 6 - Surfactants and Nanoscience. In: BERTI, D.; PALAZZO, G. (Ed.). **Colloidal Foundations of Nanoscience**. Amsterdam: Elsevier, p. 135 – 157, 2014.

FAZLARA, A.; EKHTELAT, M. The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 12, n. 1, p. 23-29, 2012.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623, 2010.

GE, Y.; ZHU, J.; YE, X.; YANG, Y. Spoilage potential characterization of *Shewanella* and *Pseudomonas* isolated from spoiled large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, p. 86-93, 2017.

GERBA, C. P. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 464-469, 2015.

GILBERT, P.; MOORE, L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 703–715, 2005.

GOMES, M. Z. V.; 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. 441-44, 2012.

GONÇALVES, L. D. A.; PICCOLI, R. H.; PERES, A. P.; SAÚDE, A. V. Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 352-358, 2017.

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; ALVES, E.; DOMINGUES, M. R.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 87-93, 2015.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.

KIM, L. H.; JUNG, Y.; YU, H. W.; CHAE, K. J.; KIM, I. S. Physicochemical Interactions between Rhamnolipids and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Layers. **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 3718–3726, 2015.

KIVES, J.; GUADARRAMA, D.; ORGAZ, B.; RIVERA-SEN, A.; VAZQUEZ, J.; SANJOSE, C. Interactions in Biofilms of *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* and *Pseudomonas fluorescens* Cultured in Cold UHT Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4165-4171, 2005.

KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, I. E.; MEDRZYCKA, K.; HALLMANN, E.; KARPENKO, E.; POKYNBRODA, T.; MACIERZANKA, A.; JUNGnickel, C. Rhamnolipid CMC prediction. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 488, p. 10-19, 2017.

LAMAS, A.; REGAL, P.; VÁZQUEZ, B.; MIRANDA, J. M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C. M. Influence of milk, chicken residues and oxygen levels on biofilm formation on stainless steel, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. **Food Control**, v. 90, p. 1-9, 2018.

LAZAR, V. Quorum sensing in biofilms—how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?. **Anaerobe**, v. 17, p. 280-285, 2011.

LEBRÓN-PALER, A.; PEMBERTON, J. E. Determination of the acid dissociation constant of the biosurfactant monorhamnolipid in aqueous solution by potentiometric and spectroscopic methods. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 7649-7658, 2006.

MAIFRENI, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; BUIATTI, S.; PICON, S.; MARINO, M. Bacterial biofilm as a possible source of contamination in the microbrewery environment. **Food Control**, v. 50, p. 809-814, 2015.

MATÉOS, A.; GUYARD-NICODÈME, M.; BAGLINIÈRE, F.; JARDIN, J.; GAUCHERON, F.; DARY, A.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 78-88, 2015.

McDONNELL, G. E. Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action and resistance. **ASM Press**, Washington, 2007.

McLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, A.; PÉREZ-CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: At the Interface between Biophysics and Microbiology. **Food Biophysics**, v. 1, p. 94-114, 2006.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO K (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, cap. 7, p. 66 – 67, 2001.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.

NAKAMA, Y. Cap. 15 – Surfactants. In: SAKAMOTO, K.; LOCHHEAD, R.; MAIBACH, H.; YAMASHITA, Y. (Ed.). **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**. Elsevier, p. 231-244, 2017.

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

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

NOVELLO, J. C. L. **Implantação de íons de prata em aço inoxidável e infecção fágica para o controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos**. 2012. 112f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. 2012.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 97-106, 2010.

OTZEN, D. E. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1859, p. 639-649, 2017.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 633-654, 2011.

PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção de leite UHT**. 2004. 97f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. 2004.

PINTO, C. L. O.; MACHADO, S. G.; CARDOSO, R. R.; ALVES, R. M.; VANETTI, M. C. D. Proteolytic potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw milk. **Brazilian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 4, n. 2, p. 16-25, 2014.

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterisation and applications of biosurfactants - Review. **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 360-370, 2008.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; OLIVEIRA, A. M.; SILVA, F. G.; TAMANINI, R.; OLIVEIRA, A. L. M.; BELOTI, V. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 75-83, 2018.

RIBEIRO, K. V. G. **Ecofago 017 atua na prevenção e degradação de biofilme de *Escherichia coli***. 2012. 54f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa. 2012.

RIEGER, A. M.; NELSON, K. L.; KONOWALCHUK, J. D.; BARREDA, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **Journal of Visualized Experiments-JoVE**, n. 50, 2011.

RIVARDO, F.; TURNER, R. J.; ALLEGRONE, G.; CERI, H.; MARTINOTTI, M. G. 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.

RONNER, A. B., WONG, A. C. L., Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and bunan rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, n.9, p.750-758, 1993.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. Surfactants and interfacial phenomena. 4 ed. **John Wiley & Sons**, 2012.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROSSI, C.; CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; GOFFREDO, E.; GOGA, B. T. C.; PAPARELLA, A. Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, p. 154-157, 2016.

ROSSI, C.; SERIO, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; ANNIBALLI, F.; AURICCHIO, B.; GOFFREDO, E.; CENCI-GOGA, B. T.; LISTA, F.; FILLO, S.; PAPARELLA, A. Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. **Food Control**, v. 86, p. 241-248, 2018.

SALUSTINO, V. C. **Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após a pasteurização do leite**. 2007. 75f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. 2007.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; TERUEL, J. A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, p. 246-253, 2007.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, n. 2, p. 123-133, 2008.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin—a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 119-134, 2010.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S.; CHAUHAN, N.; BANSAL, A.; PROCHA, S. Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant, **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

SHEN, H. H.; LIN, T. W.; THOMAS, R. K.; TAYLOR, D. J. F.; PENFOLD, J. Surfactin Structures at Interfaces and in Solution: The Effect of pH and Cations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, p. 4427–4435, 2011.

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

SILVA, S. S.; CARVALHO, J. W. P.; AIRES, C. P.; NITSCHKE, M. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 7864–7873, 2017.

SMITH, M. J.; FLOWERS, T. H.; COWLING, M. J.; DUNCAN, H. J. Method for the measurement of the diffusion coefficient of benzalkonium chloride. **Water Research**, v. 36, p. 1423-1428, 2002.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, p. 96-104, 2014.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SUMMERTON, E.; ZIMBITAS, G.; BRITTON, M.; BAKALIS, S. Low temperature stability of surfactant systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 60, p. 23-30, 2017.

TEH, K. H.; FLINT, S.; PALMER, J.; ANDREWES, P.; BREMER, P.; LINDSAY, D. Biofilm – An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products?. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 32-40, 2014.

TEH, K. H.; FLINT, S.; PALMER, J.; ANDREWES, P.; BREMER, P.; LINDSAY, D. Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. **International Journal of Food Microbiology**. v. 157, p. 28–34, 2012.

TEH, K. H.; FLINT, S.; PALMER, P.; LINDSAY, D.; ANDREWES, P.; BREMER, P. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 10, p. 742-747, 2011.

VAN BOGAERT, I. N. A.; SAERENS, K.; MUYNCK, C. D.; DEVELTER, D.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 23-34, 2007.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 626-633, 2005.

VATER, J., KABLITZ, B., WILDE, C., FRANKE, P., MEHTA, N., CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6210-6219, 2002.

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicrotólicas isoladas de leite**. 2006. 159f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. 2006.

VON NEUBECK, M.; BAUR, C.; KREWINKEL, M.; STOECKEL, M.; KRANZ, B.; STRESSLER, T.; FISCHER, L.; HINRICHS, J.; SCHERER, S.; WENNING, M. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. **International Journal of Food Microbiology**. 211, p. 57–65, 2015.

WANG, H.; CAI, L.; LI, Y.; XU, X.; ZHOU, G. Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants. **Food Control**, v. 91, p. 397-403, 2018.

WANG, H.; WANG, H.; XING, T.; WU, N.; XU, X.; ZHOU, G. Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 298-304, 2016.

WANG, R.; NEOH, K. G.; SHI, Z.; KANG, E. T.; TAMBYAH, P A.; CHIONG, E. Inhibition of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* Adhesion and Biofilm Formation on Medical Grade Silicone Surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 336-345, 2012.

XIN, L.; MENG, Z.; ZHANG, L.; CUI, Y.; HAN, X.; YI, H. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China. **International Dairy Journal**. V. 66, p. 34-41, 2017.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1329–1334, 2005.

YUAN, L.; BURMØLLE, M.; SADIQ, F. A.; WANG, N.; HE, G. Interspecies variation in biofilm-forming capacity of psychrotrophic bacterial isolates from Chinese raw milk. **Food Control**, v. 91, p. 47-57, 2018.

YUAN, L.; SADIQ, F. A.; LIU, T.; FLINT, S.; CHEN, J.; YANG, H.; GU, J.; ZHANG, G.; HE, G. Psychrotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 84, p. 409-418, 2017.

ZHANG, C.; BIJL, E.; HETTINGA, K. Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin. **Food Chemistry**, v. 263, p. 127–134, 2018.

ZHANG, S.; LI, H.; ULUKO, H.; LIU, L.; PANG, X.; LV, J. Investigation of Protease Production by *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 and Degradation on Milk Proteins. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 2466-2472, 2015.