



ATIVIDADE BACTERICIDA DE RAMNOLÍPÍDEOS COMBINADOS COM NaCl FRENTE À *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Bactericidal activity of rhamnolipids combined with NaCl against Listeria monocytogenes

Tathiane Ferroni PASSOS^{1*}, Marcia NITSCHKE¹

RESUMO: Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) vem crescendo em taxas elevadas, assim como o aumento da resistência aos tratamentos antimicrobianos convencionais. Neste contexto, a propriedade antimicrobiana de biossurfactantes, como os ramnolípídeos (RLs) vem sendo estudada como uma nova alternativa no controle de patógenos alimentares. Os RLs apresentam estabilidade em alta concentração salina, baixa toxicidade, além de serem biodegradáveis o que favorece sua aplicação em alimentos. Este trabalho tem como objetivo investigar a ação antimicrobiana de RLs na presença de NaCl (cloreto de sódio), relacionando com a sua atividade bactericida frente à *Listeria monocytogenes*. Foram determinados os valores de Concentração Inibitória e Bactericida Mínimas (CIM) e (CBM) dos RLs e RLs-NaCl, além de se realizar medidas de Concentração Micelar Crítica (CMC). Os resultados mostraram redução dos valores de CIM de 156,25 mg/L para 39,06 mg/L em meio contendo 5% de NaCl, e de CBM de >2500 para 78,12 mg/L. Também foi possível observar que o NaCl promoveu redução nos valores de CMC do biossurfactante de 94,2 mg/L para 16 mg/L, sugerindo que a agregação micelar está relacionada com a atividade antimicrobiana. A presença de NaCl aumentou a atividade antimicrobiana dos RLs e pode ser explorada como uma ferramenta promissora para o controle de *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: Força iônica. Biossurfactante. Patógenos alimentares. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT: Foodborne Diseases (FBD) are growing at high rates along with the increased resistance to conventional antimicrobial treatments. In this context, the antimicrobial property of biosurfactants, such as rhamnolipids (RLs) has been studied as a novel alternative to the control of foodborne pathogens. The RLs are stable at high salt concentration, have low toxicity, and are biodegradable which favors their application in the food industry. This work aims to investigate the effect of sodium chloride (NaCl) in the antimicrobial activity of RLs against *Listeria monocytogenes*. The Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC) and (MBC) values of RLs and RLs-NaCl were determined, in addition to performing Critical Micellar Concentration (CMC) measurements. The results showed a reduction in MIC values from 156.25 mg/L to 39.06 mg/L in the medium containing 5% of NaCl, and MBC from > 2500 to 78.12 mg/L. It was also possible to observe that NaCl reduced the CMC values of the biosurfactant from 94.2 mg/L to 16 mg/L, suggesting that micellar aggregation is related to antimicrobial activity. The presence of NaCl increased the antimicrobial activity of RLs and can be exploited as a promising tool for the control of *L. monocytogenes*.

Keywords: Ionic strength. Biosurfactant. Food pathogens. Antimicrobial activity.

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021; aprovado em 05/06/2021

¹ Mestre em Biotecnologia-UFSCar, Doutoranda em Química-USP, São Carlos - SP, Brasil, telefone: (16) 99752-0593, e-mail: tathianepassos@usp.br

² Doutora em Ciência de alimentos- UNICAMP, Professora na USP-São Carlos, e-mail: nitschke@iqsc.usp.br.

INTRODUÇÃO

No âmbito da saúde pública, Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são consideradas uma das mais significativas causas de mortalidade em todo mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) a cada ano as DTAs acometem aproximadamente uma a cada dez pessoas no mundo causando cerca de 420 mil mortes (ORGANIZATION, 2020).

A grande diversidade e patogenicidade das bactérias, faz com que estas se tornem o grupo microbiano mais comumente associado aos casos de DTAs (TAUXE, 2002).

Dentre as bactérias patogênicas mais relevantes envolvidas está *Listeria monocytogenes*, responsável pela doença chamada listeriose. Geralmente essas bactérias produzem toxinas, o que muitas vezes dificulta sua eliminação, sendo a formação de biofilmes um dos fatores que também favorece a virulência desse microrganismo (NEWELL *et al.*, 2010; PINTO, 1996; RADOSHEVICH; COSSART, 2018). Além disso, *L. monocytogenes* apresenta-se resistente às variações no ambiente, como pH baixo e alta concentração salina, característica que causa grande preocupação para a indústria alimentícia (RADOSHEVICH; COSSART, 2018).

Embora o número de infecções por *L. monocytogenes* seja moderadamente baixo, a mortalidade entre indivíduos infectados é muito alta (20-30%) (NOORDHOUT *et al.*, 2015). Desta forma, buscas por recursos tecnológicos e de engenharia de alimentos que visem a erradicação ou diminuição de contaminações em produtos alimentícios, principalmente por linhagens de *L. monocytogenes*, vêm se tornando cada vez mais necessárias.

Surfactantes são compostos químicos anfílicos que apresentam minimamente uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. Geralmente são utilizados na indústria como matéria-prima para produção de detergentes, sendo que a grande maioria deriva de fontes não renováveis, como compostos obtidos a partir do petróleo (BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Apresentam propriedades tensoativas, reduzindo a tensão superficial e a tensão interfacial entre dois líquidos, exibindo também propriedades emulsificantes, podendo formar micelas, vesículas e bicamadas dependendo do pH, concentração, e presença de eletrólitos em solução, o que permite a solubilização de compostos hidrofóbicos em água (NITSCHKE; PASTORE, 2002; PEKER, 2004; SANTANA-FILHO, *et al.*, 2015). Apesar de serem bastante utilizados, os surfactantes sintéticos podem ser tóxicos aos seres humanos e ao meio ambiente, o que tem tornado a busca por compostos biodegradáveis cada vez mais recorrente (BANAT, 2000; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Uma alternativa ao uso dos surfactantes sintéticos convencionais são os biossurfactantes (BS), produzidos por bactérias, fungos filamentosos e/ou leveduras (BANAT, 2000). Dentre as vantagens de sua utilização, tem-se baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, estabilidade em extremos de pH e concentração salina,

além de serem obtidos a partir de fontes renováveis (APARNA, *et al.*, 2012).

Os ramnolipídeos (RLs), são classificados como biossurfactantes glicolipídicos, sendo produzidos principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Apresentam-se como uma mistura de homólogos onde os mono-ramnolipídeos (mono-RL) e os di-ramnolipídeos (di-RL) são predominantes. O mono-RL é formado por uma unidade de ramnose ligada a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (Rha-C₁₀-C₁₀), já o di-RL é constituído por duas unidades de ramnose ligadas a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) (NITSCHKE, *et al.*, 2011).

Apesar das diferentes composições, os RLs são em sua maioria, considerados de baixa toxicidade, o que os torna apropriados para usos na área farmacêutica, cosmética e alimentos (NITSCHKE, 2007).

Muitos estudos mostraram a eficácia dos RLs no controle de microrganismos de importância alimentar como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tanto na forma planctônica como em biofilmes (BENINCASA *et al.*, 2004; HABA *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2015; MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2017; SHA *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação responsável pela atividade antimicrobiana dos RLs ainda não foi esclarecido, segundo Shulga (2008) os RLs podem solubilizar proteínas e lipídeos constituintes da superfície da membrana celular, perturbando sua integridade e permeabilidade por meio da formação de poros transmembrana que servem como canais para o interior da célula (SHULGA, 2008).

Em relatos anteriores, foi observado que a atividade biológica dos RLs está relacionada com sua capacidade em formar agregados, o que pode ser afetado pelo pH e pela presença de eletrólitos no meio (CHAMPION *et al.*, 1995; OTZEN, 2017). Em estudos recentes, foi observado que o acréscimo de NaCl à mistura de ramnolipídeos aumentou consideravelmente a atividade antimicrobiana (FERREIRA, *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2017). Segundo Rodrigues e colaboradores (2017), este resultado pode ser relacionado ao estado de agregação do surfactante (RODRIGUES *et al.*, 2017).

Sabe-se que em determinadas concentrações, o sal (NaCl) dissolvido em solução é capaz de inibir o crescimento bacteriano de uma variedade de cepas (TAORMINA, 2010), no entanto, apesar da importância da concentração de eletrólitos para o desenvolvimento bacteriano, sua influência na atividade antimicrobiana dos RLs ainda não foi elucidada. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da ação combinada RL-NaCl no crescimento de *L. monocytogenes* visando futura aplicação na indústria de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Ramnolipídeos (RLs)

Utilizou-se o biossurfactante ramnolipídeo (RL) comercial (Rhamnolipid Inc. ®) em solução a 25%. A solução foi diluída em meio de cultura Caldo Soja Tryptona acrescido de Extrato de Levedura (TSYEB -

acumedia®) pH 7,3± 0,2 com e sem adição de NaCl (0 e 5% m/v) e esterilizada por filtração (0,22 µm).

2. Testes antimicrobianos

2.1 Preparo do inóculo

Foi utilizada a linhagem *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112) mantida em cultura estoque (-20 °C). Com auxílio de alça de inoculação, transferiu-se a cultura para o meio Ágar Soja Triptona acrescido de Extrato de Levedura (TSYEA acumedia®) pH 7,3 ± 0,2, mantendo-se incubação a 37°C± 1 °C por 24 horas. Obteve-se colônias isoladas, as quais foram transferidas para o meio TSYEB. O inóculo foi padronizado para a densidade óptica D.O (610nm) de 0,10± 0,01 (*Thermo Scientific, Genesys 10UV*), correspondente a aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). A suspensão foi diluída em TSYEB ajustando-se a população inicial para 10⁷ UFC/mL.

2.2 Determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)

Este teste foi baseado na técnica de microdiluição em caldo, descrita na metodologia estabelecida pela *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012)*.

Foi utilizado meio de cultura TSYEB em pH 7,0± 0,1 com e sem adição de 5% (m/v) de NaCl. Adicionou-se 100 µL de cada solução em linhas distintas de uma microplaca de 96 orifícios, seguiu-se com a adição de 100 µL da solução de RL preparada como anteriormente na concentração de 5000 mg/L. De modo a realizar a diluição seriada dos RLs, transferiu-se 100 µL da primeira coluna para a segunda, e assim sucessivamente até a décima coluna. Por fim, foram adicionados 20 µL do inóculo preparado como em 2.1 às colunas 1-11, deixando-se a 11^a coluna como controle positivo. Utilizou-se a 12^a coluna como controle negativo e a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano aparente, após 24 horas de incubação a 37°C± 1 °C, foi designada como sendo a CIM. Para melhor visualização da CIM, adicionou-se em cada poço 20 µL de uma solução de MTT 1 mg/mL, observando-se o resultado após uma hora.

Para a determinação de CBM, retirou-se 10 µL de cada orifício onde não havia crescimento bacteriano visível no teste de CIM, e transferiu-se para o meio de cultura TSYEA. Incubou-se por 24 horas a 37°C± 1 °C. O valor de CBM foi designado como a menor concentração de RL que não apresentou crescimento microbiano após o período de incubação.

2.3 Curva de crescimento

Este ensaio foi baseado na metodologia descrita por Balouiri, e colaboradores, 2016. Em uma microplaca,

adicionou-se o meio de cultura TSYEB nas concentrações de CIM e CBM para os RLs e RLs-NaCl como obtidos em 2.2., além de se manter um controle positivo e um controle negativo. Ademais, adicionou-se 20 µL do inóculo em cada orifício, preparado como em 2.1. Os valores de densidade óptica (D.O - 610nm) com relação ao tempo foram obtidos por meio de uma leitora de microplaca (PerkinElmer, EnSpire®) mantendo-se a incubação por 48 horas a 37°C± 1 °C.

3. Concentração micelar crítica (CMC)

Preparou-se uma solução aquosa de 300 mg/L de RL, com adição de 0 e 5% (m/v) de NaCl em pH 7,0± 0,1.

O valor de CMC de cada solução foi determinado por meio de um tensiômetro (Attension, Sigma 700), a partir de medidas da tensão superficial (TS) pelo método do anel de Du Nouy (NOUY, DU, 1919). O cálculo foi realizado utilizando-se o Software Attension Sigma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se a Tabela 1, é possível observar uma relação intrínseca entre a presença de NaCl no meio e a redução dos valores de CIM e CBM. Na ausência de NaCl, não foi possível observar um valor de CBM para o RL, sendo este >2500 mg/L e o biossurfactante considerado bacteriostático nestas condições.

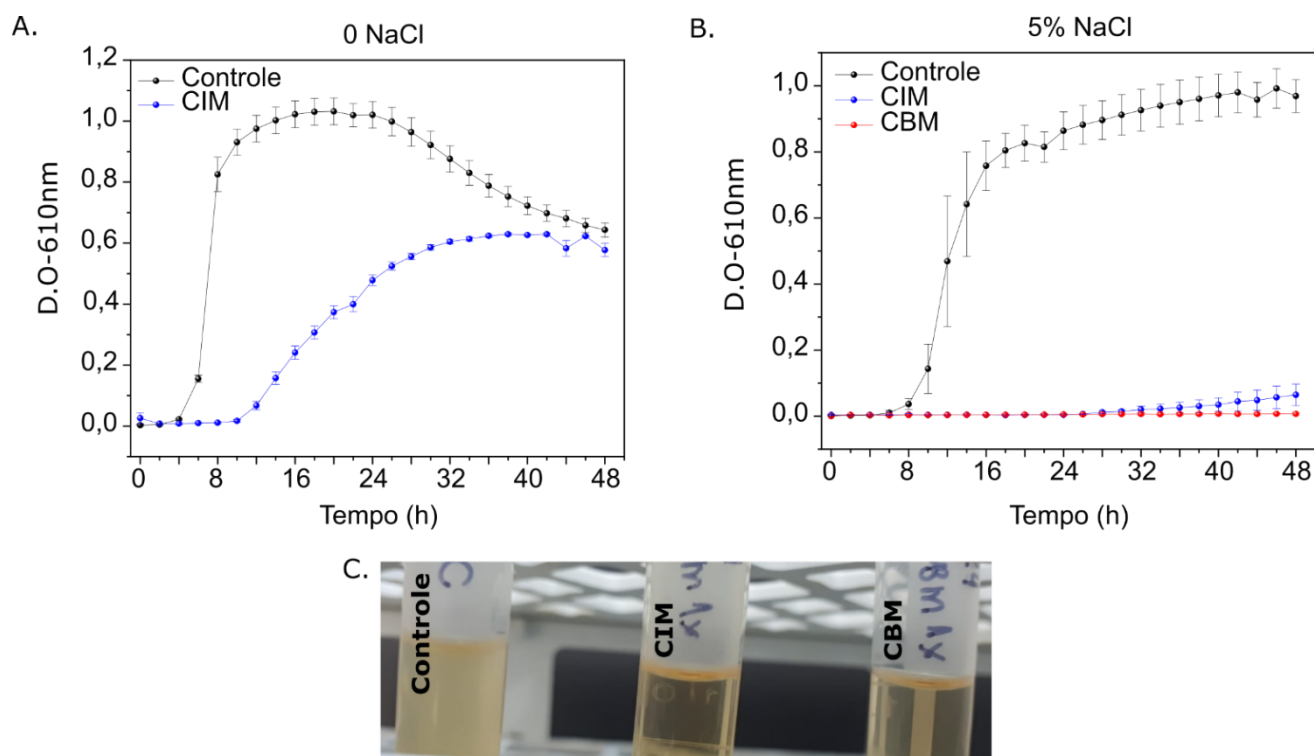
Tabela 1. Efeito da concentração de NaCl na atividade antimicrobiana e CMC de RLs frente a *L. monocytogenes* (ATCC 19112).

%NaCl	CIM (mg/L)*	CBM (mg/L)**	CMC (mg/L)***
0	156,25	∅	94,2
5%	39,06	78,12	16

*CIM- Concentração Inibitória Mínima **CBM- Concentração Bactericida Mínima ***CMC- Concentração Micelar Crítica

Na Figura 1 tem-se a representação da curva de crescimento de *L. monocytogenes* na presença do biossurfactante. Para o meio sem NaCl, foi observado o efeito bacteriostático dos RLs na concentração de CIM (Figura 1A). Entretanto, quando foi adicionado 5% de NaCl ao meio, (Figura 1B), os RLs foram capazes de eliminar a população bacteriana nas primeiras duas horas de experimento. Na Figura 1C, é possível notar a diferença com relação à turbidez das amostras tratadas com RLs combinados com NaCl e a amostra controle, sem adição do biossurfactante, a qual apresentou-se mais turva devido à maior concentração de células bacterianas presentes, o que corrobora o efeito bactericida observado na curva de crescimento.

Figura 1. Curva de crescimento *L. monocytogenes* (ATCC19112) na presença de RLs em diferentes concentrações de NaCl. A. Meio de cultura TSYEB sem adição de NaCl B. Meio de cultura TSYEB contendo 5% de NaCl. C. Soluções contendo 5% de NaCl (m/v) após 24 horas de incubação, amostra controle, sem adição de RLs, e amostras tratadas nas concentrações de CIM e CBM.



Sabe-se que as moléculas de ramnolípídeos possuem grupos carboxílicos, que podem se apresentar na forma ionizada ou não ionizada dependendo do valor de pH em que se encontra o meio. Os valores de pka reportados para mono-RLs e di-RLs são 5,9 e 5,6 respectivamente. Desta forma, geralmente o melhor efeito antimicrobiano é observado em pH ácido, o que pode ser explicado pela ausência de cargas nas moléculas, já que neste valor de pH a maioria se encontra em sua forma não iônica. Por outro lado, ao se trabalhar com valores de pH acima do valor de pka, como no caso deste estudo em pH 7,0, estima-se que a maior parte das moléculas esteja ionizada, apresentando-se em sua forma aniônica (carga negativa) (ABBASI *et al.*, 2013; ISHIGAMI *et al.*, 1987; SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

A adição de um sal, como NaCl, ao meio cultura tende a minimizar repulsões eletrostáticas entre grupos ionizados dos RLs, majoritariamente em soluções com valores de pH acima de pka, por meio da neutralização das cargas. Desta forma, tende-se a favorecer a formação de agregados do biossurfactante mais organizados na interface, facilitando sua adsorção na superfície celular (ABBASI *et al.*, 2013; PEKER, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

A redução do CMC observada na presença de NaCl (Tabela 1) corrobora a hipótese anterior, uma vez que a neutralização dos grupos carboxílicos desprotonados (-COO⁻) pelos íons Na⁺, diminui a repulsão eletrostática o que tende a favorecer a formação de micelas reduzindo assim, o valor da concentração de RLs necessária para tal (ABBASI *et al.*, 2013; PEKER, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2007)

A relação da carga da molécula com a atividade antimicrobiana dos RLs, se deve ao fato que biossurfactantes não iônicos tendem a não sofrer repulsão eletrostática causada por moléculas carregadas negativamente presentes na parede celular

bacteriana, como os ácidos teicóicos nas bactérias gram-positivas, o que por sua vez facilita a permeação e interação com a célula, podendo levar a desestruturação da membrana e morte celular (MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013; SHULGA, 2008).

CONCLUSÕES

O biossurfactante ramnolípídeo foi efetivo na inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* entretanto, quando combinado com NaCl, promoveu ação bactericida eliminando a população em menos de duas horas. O aumento na eficácia do RLs pode estar relacionado com a redução da CMC promovida pelo sal. A presença de NaCl aumentou a atividade antimicrobiana dos RLs e pode ser explorada como uma ferramenta promissora para o controle de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, H. *et al.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Physicochemical characterization of a monoramnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 101, p. 256–265, 2013.
- APARNA, A. *et al.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 95, p. 23–29, 2012.
- BALOUIRI, M. *et al.* Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.
- BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

- BANAT, M. I. M. Potential commercial applications of microbial surfactants. p. 495–508, 2000.
- BENINCASA, M. *et al.* Chemical structure , surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. p. 1–8, 2004.
- CHAMPION, J. T. *et al.* Electron Microscopy of Rhamnolipid (Biosurfactant) Morphology: Effects of pH, Cadmium, and Octadecane. *Journal of Colloid And Interface Science*, v. 170, p. 569–574, 1995.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition.* [s.l: s.n.]. v. 32
- FERREIRA, J. D. F. *et al.* The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. *Food Research International*, v. 116, n. September 2018, p. 737–744, 2019.
- HABA, E. *et al.* Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. 2003.
- ISHIGAMI, Y. *et al.* The pH-Sensitive Conversion of Molecular Aggregates of Rhamnolipid Biosurfactant. *Chemistry Letters*, p. 763–766, 1987.
- KIM, L. H. *et al.* Physicochemical Interactions between Rhamnolipids and *Pseudomonas aeruginosa* Bio fi Im Layers. 2015.
- MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control*, v. 29, n. 1, p. 138–142, 2013.
- NEWELL, D. G. *et al.* International Journal of Food Microbiology Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, v. 139, p. S3–S15, 2010.
- NITSCHKE, M. Biosurfactants in food industry. v. 18, p. 252–259, 2007.
- NITSCHKE, M. *et al.* Rhamnolipids and PHAs : Recent reports on *Pseudomonas* -derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 3, p. 621–630, 2011.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, M. Revisão. v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- NOORDHOUT, C. M. DE *et al.* Europe PMC Funders Group The global burden of listeriosis : a systematic review and meta- analysis. v. 14, n. 11, p. 1073–1082, 2015.
- NOUY, L. P. DU. A new apparatus for measuring surface tension. *The Journal of General Physiology*, p. 521–524, 1919.
- ORGANIZATION, W. H. Foodborne diseases. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_2>. Acesso em: 16 jun. 2020.
- OTZEN, D. E. *Biochimica et Biophysica Acta Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins : Same but different ?* ☆. *BBA - Biomembranes*, v. 1859, n. 4, p. 639–649, 2017.
- PEKER, S. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. v. 35, p. 225–233, 2004.
- PINTO, A. DE F. M. A. *Doenças de Origem Microbiana Transmitidas Pelos Alimentos.* Millenium, v. 4, p. 91–100, 1996.
- RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis.* *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 32–46, 2018.
- RODRIGUES, A. I. *et al.* Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. n. August, p. 1–9, 2017.
- SÁNCHEZ, M. *et al.* Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. v. 307, p. 246–253, 2007.
- SANTANA-FILHO, A. P. DE. *et al.* Evaluation of the Structural Composition and Surface Properties of Rhamnolipid Mixtures Produced by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in Different Cultivation Periods. p. 988–995, 2015.
- SHA, R. *et al.* Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. p. 458–466, 2012.
- SHULGA, E. K. Æ. A. Rhamnolipid – Biosurfactant Permeabilizing Effects on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains. p. 639–644, 2008.
- TAORMINA, P. J. Implications of Salt and Sodium Reduction on Microbial Food Safety. v. 8398, 2010.
- TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. v. 78, p. 31–41, 2002.