



EFEITO DO PH E FORÇA IÔNICA NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE RAMNOLIPÍDEOS FRENTE À *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Effect of pH and ionic strength on antimicrobial activity of rhamnolipids against Staphylococcus aureus

Amanda Mezete GOUVEIA^{1,2*}, Márcia NITSCHKE²

RESUMO: As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são consideradas uma das causas mais significativas de mortalidade nos países em desenvolvimento, sendo as bactérias um dos principais fatores causadores destas patologias. Dentre elas, destacam-se as doenças causadas por *Staphylococcus aureus*, sendo nocivas tanto pela infecção do organismo hospedeiro, quanto pela intoxicação por enterotoxinas presentes nos alimentos contaminados e mal armazenados. A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, junto ao interesse por antimicrobianos mais sustentáveis, demanda a busca por métodos alternativos de controle. Neste contexto, a utilização de biossurfactantes (BS), como os ramnolipídeos (RL), se mostra promissora uma vez que apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis e sintetizados a partir de fontes renováveis. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pH e da força iônica na atividade antimicrobiana dos RL frente a *S. aureus*. Os resultados mostraram que o aumento do pH de 5 para 7, aumentou o valor da concentração inibitória mínima (CIM), de 78,12 mg/L para >2500 mg/L. Da mesma forma, o aumento da concentração de NaCl favoreceu a ação antimicrobiana dos RL em todos os valores de pH testados. A força iônica combinada com o pH tem um efeito significativo na inibição do crescimento de *S. aureus* por RL apresentando potencial para aplicação em alimentos ácidos e salgados.

Palavras-chave: Força iônica; Biossurfactante; Patógenos alimentares; Ramnolipídeo.

ABSTRACT: Foodborne diseases (FBD) are considered to be one of the most important causes of mortality in developing countries and bacteria one of the main factors causing these pathologies. Among them, diseases caused by *Staphylococcus aureus* are harmful both by infection of the host organism and intoxication by enterotoxins present in contaminated and poorly stored foods. Bacterial resistance to conventional antibiotics, together with the interest in more sustainable antimicrobials, demands the search for alternative methods of control. In this context, the use of biosurfactants (BS), such as rhamnolipids (RL), is promising since they have low toxicity, are biodegradable and synthesized from renewable sources. The main objective of this study was to evaluate the effect of pH and ionic strength on antimicrobial activity of RL against *S. aureus*. The results show that increasing pH from 5 to 7 also increased the minimal inhibitory concentration (MIC) from 78,12 mg/L to > 2500 mg/L. In the same way, increasing the NaCl levels favored the antimicrobial activity of RL in all pH tested. The ionic strength and pH affect significantly in RL activity against *S. aureus* and can be exploited to inhibit such bacteria in salted and acid foods.

Key words: Ionic strength; Biosurfactant; Food pathogens; Rhamnolipid.

*Autor para correspondência

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

¹ Graduada em Biotecnologia, Mestranda em Bioengenharia – USP, São Carlos – SP, Brasil; telefone: (35) 99727-0869, e-mail: amgouveia@usp.br

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

INTRODUÇÃO

A ocorrência das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) têm crescido significativamente a nível mundial. De acordo com o Ministério da Saúde, esse crescimento está relacionado com o aumento populacional e a existência de grupos mais vulneráveis ou mais expostos, ao processo de urbanização desordenado, além da necessidade de produção de alimentos em larga escala (Brasil, 2010). Estima-se que quase uma em cada dez pessoas no mundo adoecem após a ingestão de alimentos contaminados sendo que, 420.000 morrem a cada ano (OMS, 2019).

As DTA são cada vez mais preocupantes para as indústrias do setor alimentício, que devem garantir segurança e qualidade dos seus produtos, evitando perdas econômicas e a veiculação de alimentos contaminados, os quais podem causar danos à saúde dos consumidores. Considerando que muitos microrganismos adquirem resistência aos conservantes convencionais, buscar novas alternativas para o controle do crescimento de patógenos alimentares representa um novo desafio para a indústria. A preferência dos consumidores por aditivos naturais (CAROCHO *et al.*, 2015) somada às preocupações com a saúde e consciência ambiental, aumentou a demanda pelos aditivos "verdes", isto é, aqueles que não agridem o meio ambiente e proporcionam ao consumidor produtos isentos de conservantes artificiais (VOON *et al.*, 2012).

Os biossurfactantes (BS) podem ser considerados como ferramenta tecnológica, inovadora e sustentável para auxiliar no combate dos patógenos alimentares, visto que são moléculas tensoativas, biodegradáveis, pouco tóxicas, além de serem produzidas a partir de fontes renováveis (MULLIGAN *et al.*, 2014). Os ramnolipídeos (RL) são BS da classe dos glicolipídeos, sintetizado especialmente por bactérias do gênero *Pseudomonas*. De acordo com Nitschke & Silva (2018), além da atividade tensoativa e emulsificante, os RL também apresentaram ação antimicrobiana e antibiofilme frente aos patógenos alimentares e, devido a sua versatilidade, podem ser considerados ingredientes multipropósito no processamento dos alimentos.

Trabalhos recentes, mostraram que os RL são mais efetivos na inibição de patógenos alimentares Gram-positivos quando o pH se encontra entre 5-6 (FERREIRA *et al.*, 2019). Além do aspecto sensorial, a adição do cloreto de sódio (NaCl), pode ajudar na preservação da qualidade dos alimentos, inibindo o desenvolvimento de microrganismos (DÖTSCH *et al.*, 2009). Por outro lado, alguns patógenos alimentares como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* são capazes de sobreviver na presença de altos níveis de NaCl (DOYLE; GLASS, 2010), causando sérios riscos de contaminação.

A versatilidade nutricional e a capacidade de crescimento em diversas condições ambientais, faz com que o *S. aureus* se desenvolva com facilidade em diversos tipos de alimentos (LOIR *et al.*, 2003; CARMO, 2002). Geralmente são bactérias halotolerantes, podendo crescer em meios que contenham até 10% de NaCl, sua temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 37°C, podendo resistir ao congelamento até -20°C (WHITMAN *et al.*, 2012), quando se trata de pH, podem crescer na faixa entre 4 a 9,8 sendo o pH ótimo entre 6 e 7 (FRANCO, 2008).

A capacidade de colonização e patogenicidade de *S. aureus* são provenientes de seus fatores de virulência, que permitem sua aderência às células do hospedeiro ou à matriz

extracelular, proporcionando a invasão celular, penetração tecidual ou adesão a superfícies. Esses diferentes mecanismos oferecem proteção e permitem a disseminação mais intensa do microrganismo (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). As toxinas que esta bactéria produz são termoestáveis e apresentam também estabilidade à pH extremo e radiação; sendo assim, uma vez contaminado, o alimento dificilmente estará seguro para consumo (ACHENSON, 2000).

Estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa, mostraram que a presença de NaCl reduziu os valores de CIM dos RL frente a *S. aureus*, entretanto o efeito observado parece depender do pH do meio (VIEIRA, 2018). O estudo aprofundado da interação RL-NaCl permitirá o desenvolvimento de novas alternativas para o controle de patógenos principalmente em alimentos com alto teor de sal. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do pH e força iônica na atividade antimicrobiana de ramnolipídeo frente a células planctônicas de *Staphylococcus aureus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Padronização do inóculo: o inóculo para os testes de microdiluição partiu de dois cultivos subsequentes de 24 h, em meio TSYEA (Tryptone Soya Yeast Extract Agar) incubados a 37°C. Alíquotas das colônias obtidas em meio TSYEA foram suspensas em TSYEB (Tryptone Soy Yeast Extract Broth) e a densidade ótica (DO) foi ajustada para $0,20 \pm 0,01$, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹. A suspensão inicial foi então diluída 10x, ou seja, o inóculo inicial partiu de uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹.

Preparo do Ramnolipídeo: O biossurfactante utilizado foi o Ramnolipídeo Comercial (Rhamnolipid Inc.-EUA), em solução a 25%. O RL foi preparado inicialmente na concentração de 5000 mg/L em meio TSYEB ajustado com seus respectivos valores de pH e concentração salina. As soluções foram esterilizadas por filtração (0,22 µm).

Determinação de CIM: Para a determinação da CIM foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo segundo metodologia estabelecida pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Em placas de microdiluição de 96 poços foram adicionados 100 µL de caldo de cultivo e então foi adicionado mais 100 µL de caldo tratado na concentração de 5000 mg/L na primeira coluna da placa. Metade do conteúdo da primeira coluna da placa foi então coletado e transferido para a segunda coluna e assim sucessivamente até a décima coluna, realizando assim uma diluição seriada abrangendo as concentrações de 2500 a 4,9 mg/L de RL. Posteriormente foram adicionados 20 µL do inóculo padronizado às colunas 1 a 11. As colunas de 1 até 10 foram as colunas testes com meio tratado; as colunas 11 e 12 serviram como controle positivo e negativo, respectivamente. A menor concentração em que não houve crescimento bacteriano foi designada como sendo a CIM. Para facilitar a visualização foram adicionados 20 µL de solução de brometo de tetrazólio (MTT 1 g/L), que altera sua coloração de amarelo para roxo na presença de crescimento celular. Os valores de CIM foram expressos como a moda de pelo menos quatro repetições independentes.

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM): as concentrações de RL que não apresentaram crescimento no teste de CIM foram utilizadas para determinação de CBM. Uma alíquota 100 µL do material foi transferida para placas TSYEA, com o auxílio de uma pipeta e então incubada a 37°C por 24 h. A CBM foi designada pela visualização da menor concentração em que não houve crescimento microbiano. Os resultados foram expressos como a moda de pelo menos quatro repetições independentes.

Curvas de crescimento de *S. aureus*: este ensaio foi realizado para verificar o crescimento de *S. aureus* na presença do RL e sua relação com a força iônica e pH do meio. Baseados nos resultados de CIM obtidos, foi fixada a concentração de 39,06 mg L⁻¹ de ramnolípídeo em 5% de NaCl nos pH 5, 6 e 7 para a obtenção das curvas de crescimento. Foram preparadas placas de microdiluição conforme descrito acima. A placa foi colocada na leitora de microplacas Perkin Elmer (modelo EnSpire), na temperatura de 37°C e o crescimento acompanhado por medidas de DO (610 nm) em intervalos constantes durante 48 h. Os valores de DO foram expressos como a média ± desvio padrão de oito repetições independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos ramnolípídeos (RL) em diferentes valores de pH e concentrações de NaCl é mostrada na Tabela 1. Pode-se observar que o aumento do pH de 5 para 7, tem relação direta com o valor da concentração inibitória mínima (CIM), que aumentou de 78,12 mg/L para >2500 mg/L. Da mesma forma, o aumento da concentração de NaCl de 0% para 5% favoreceu a ação antimicrobiana dos RL em todos os valores de pH testados. Destaca-se que em pH 7, a presença de 5% de sal apresentou CIM o que não foi observado na ausência de NaCl.

Diferente do que foi observado para o CIM, não foi possível eliminar os microrganismos, ou seja, a combinação de parâmetros utilizada não apresentou valor para concentração bactericida mínima (CBM). A população de *S. aureus* pode ser inibida, entretanto, não é erradicada pelo RL, sugerindo adaptação da bactéria ou, ainda, o possível surgimento de resistência ao antimicrobiano.

A partir da determinação dos valores CIM, concluiu-se que o valor do pH exerce grande influência sobre o efeito antibacteriano dos RL. Os resultados apresentados mostram que, quando se reduz o valor do pH, conseqüentemente, o valor de CIM sugerindo que, quanto menor o pH, mais favorecida é a ação dos RL e confirmando a hipótese de que o pH afeta diretamente a atividade antimicrobiana.

Os RL são considerados surfatantes aniônicos em pH neutro ou alcalino, entretanto, em condições ácidas, têm comportamento de tensoativos não-iônicos devido a protonação de grupos carboxílicos (LEBRÓN-PALER; PEMBERTON, 2006). Estudos de Ishigami, Gama e Nagahora

(1987), mostram que o pKa do RL é em torno de 5,6, assim, quando o pH está abaixo deste valor os grupos polares do RL ficam protonados, estando predominante na forma não iônica que, por ser isenta de carga efetiva, evita a repulsão eletrostática com os grupos aniônicos dos fosfolípídios da membrana citoplasmática, facilitando a interação.

Já em pH próximo a neutralidade, ou alcalino, o grupo carboxila fica majoritariamente desprotonado e carregado negativamente (forma aniônica) o que pode dificultar a interação do RL com a célula devido a repulsão eletrostática (FERREIRA *et al.*, 2019). Esta hipótese pode explicar o menor valor de CIM em pH ácidos. Quando em presença de NaCl, a neutralização dos grupos polares negativos pelo íon Na⁺ pode reduzir a repulsão entre as moléculas do surfatante, favorecendo assim a interação com a célula (HELVACI *et al.*, 2004), como observado em pH 7,0 e 5% de sal.

Magalhães & Nitschke (2013) avaliaram a ação antimicrobiana de ramnolípídeos frente à 32 isolados de *L. monocytogenes*. Os resultados mostraram que 90% das linhagens foram sensíveis, com valores de CIM entre 78 – 2.500 µg/mL. Acerca da influência do cloreto de sódio na atividade antimicrobiana dos RL, existe apenas um relato na literatura. Rodrigues *et al.* (2017), demonstraram que ocorre aumento da ação antimicrobiana de RL frente ao *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* na presença de concentrações crescentes de NaCl, entretanto o mecanismo de ação ainda não foi esclarecido.

Na Figura 1, observa-se que o crescimento da bactéria corrobora com os dados observados na Tabela 1. Nota-se, entretanto, que a presença de sal estimulou o crescimento bacteriano principalmente em pH ácidos, sugerindo que a linhagem de *S. aureus* utilizada tenha comportamento halofílico. Estudos preliminares mostraram que o crescimento em pH 7 na ausência de sal é muito limitado, apresentando uma DO máxima de 0,36 ± 0,02.

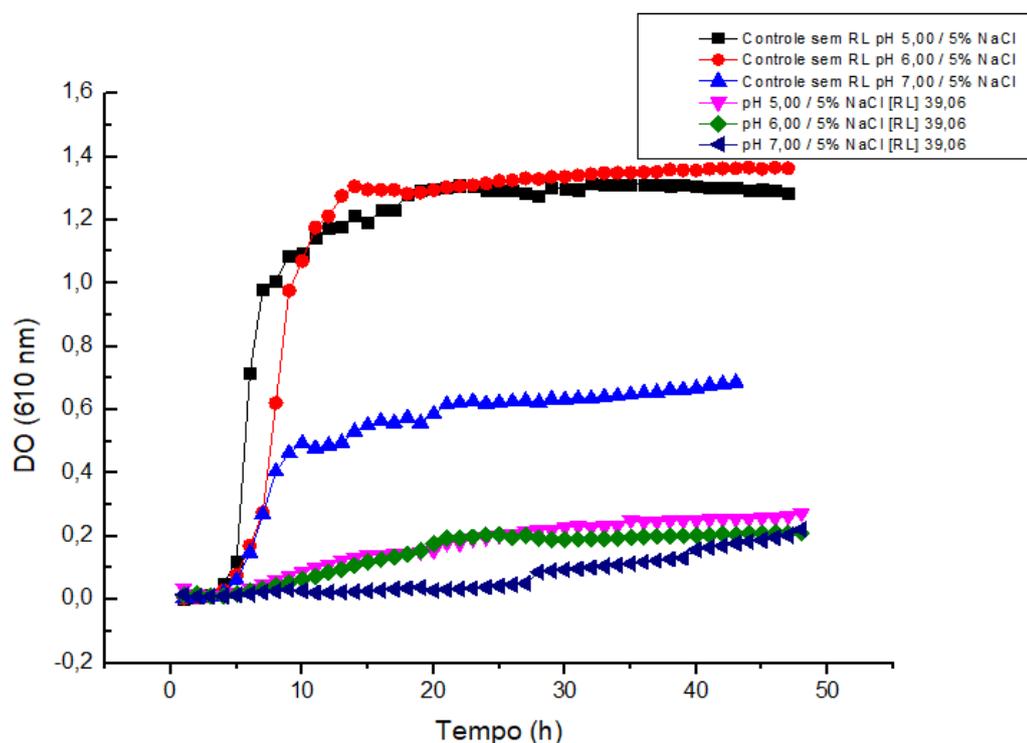
Apesar do estímulo promovido pelo NaCl, a presença de RL foi capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* especialmente em pH ácidos, como é apresentado na Figura 1, sugerindo potencial para controle de *S. aureus* em alimentos ácidos e salgados. Estudos mais aprofundados são necessários para melhor entendimento da interação entre RL-NaCl visando sua futura aplicação em diferentes setores industriais.

Tabela 1 – Efeito da concentração de NaCl e pH na atividade antimicrobiana do RL frente a *S. aureus*.

%NaCl	CIM (mg/L) *		
	pH 5,00	pH 6,00	pH 7,00
0%	78,12	156,25	>2500
2%	78,12	156,25	>2500
5%	39,06	39,06	39,06

*CIM – Concentração inibitória mínima

Figura 1 – Curva de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 8095) em meio de cultura contendo 5% de NaCl e 39,06 mg/L de RL. Os valores representam a média \pm erro padrão de 8 repetições independentes. As barras de erro foram omitidas para facilitar a visualização



CONCLUSÕES

O presente estudo nos mostra que a força iônica combinada com o pH tem um efeito significativo na inibição do crescimento de *S. aureus* apresentando potencial para aplicação em alimentos ácidos e salgados.

REFERÊNCIAS

Acheson, D.W.K- Pediatric Gastrointestinal Disease- 3ª edition- 2000 – pp 485- 501

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. Natural food additives: Quo vadis?. Trends in Food Science & Technology, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf Brasília: [Ministério da Saúde], 2010.

CARVALHO, S.A.; CARVALHO, M.A.R.; CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; ABREU, E.F.; BRAGA, R.G. Pesquisa de enterotoxinas e de substâncias antagonistas produzidas por *Staphylococcus aureus* recuperados de leite bovino in natura e de outros alimentos. In: SEMANA DE PÓS GRADUAÇÃO DA UFMG, 3. Belo Horizonte, 2002. Anais. Belo Horizonte, 2002.

Doyle, Marjorie & Glass, Kathleen. (2010). Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 9. 44 - 56. 10.1111/j.1541-4337.2009.00096.x.

FERREIRA, Jakeline de Freitas. Estudo da atividade antimicrobiana de ramnolípídeos contra bactérias patogênicas de importância alimentar. 2017. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017. doi: 10.11606/D.82.2018.tde-20082018-115010. Acesso em: 2020-12-14.

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

ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; NAGAROKA, H. The pH sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. Chemistry Letters. v. 5, p. 763-766, 1987.

Lebrón-Paler, Ariel & Pemberton, Jeanne & Becker, Bridget & Otto, William & Larive, Cynthia & Maier, Raina. (2006). Determination of the Acid Dissociation Constant of the Biosurfactant Monorhamnolipid in Aqueous Solution by Potentiometric and Spectroscopic Methods. Analytical chemistry. 78. 7649-58. 10.1021/ac0608826.

LOIR, Y. LE; BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetic Molecular Research, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

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

Mariska Dötsch, Johanneke Busch, Max Batenburg, Gie Liem, Erwin Tareilus, Rudi Mueller & Gert Meijer (2009) Strategies

- to Reduce Sodium Consumption: A Food Industry Perspective, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49:10, 841-851, DOI: 10.1080/10408390903044297
- MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. *Biosurfactants: Research, Trends and Applications*. CRC Press, London, New York, 2014
- NITSCHKE, Marcia; SILVA, Sumária Sousa e. Recent food applications of microbial surfactants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, New York, Taylor & Francis, v. 58, n. 4, p. 631-638, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635> > DOI: 10.1080/10408398.2016.1208635.
- Raza, Z. A.; Khalid, Z. M.; Khan, M. S.; Banat, I. M.; Rehman, A.; Naeem, A.; Saddique, M. T.; *Biotechnol. Lett.* 2010, 32, 811.
- Ray, S. J. An investigation into the Effects of Salt Concentration on Surfactant Adsorption Using a Quartz Crystal Microbalance. Master's Thesis, University of Tennessee, 2008.
- Rodrigues, A.I., Gudiña, E.J., Teixeira, J.A. *et al.* Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. *Sci Rep* 7, 12907 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13424-x>
- Shadizadeh, Seyed Reza & Salari, Zargham. (2014). Dependency of Critical Micellization Concentration of an Anionic Surfactant on Temperature and Potassium Chloride Salt. *Petroleum Science and Technology*. 32. 10.1080/10916466.2011.653700.
- SHAPIRO, J. A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Review of Microbiology*. v. 52, p. 81-104, 1998.
- Sood, AK, Aggarwal, M. Avaliação das propriedades micelares do dodecilbenzeno sulfonato de sódio na presença de alguns sais. *J Chem Sci* 130, 39 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12039-018-1446-z>
- Ş.Ş. Helvacı, S. Peker, G. Özdemir, Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 35, Issues 3-4, 2004, Pages 225-233, ISSN 0927-7765, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.01.001>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776504000104>)
- VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. Staphylococcus aureus methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud Publica de Mexico*, v. 47, n. 5, p. 381-387, 2005.
- VIEIRA, Estevão Alan. Ação antimicrobiana de rhamnolipídeos sobre células sésseis e planctônicas de Staphylococcus aureus: efeito do pH. 2018. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018. doi:10.11606/D.75.2019.tde-13032019-163150. Acesso em: 2020-12-08.
- Voon, HC; Bhat, R.; Rusul, G., 2012. Extratos de flores e seus óleos essenciais como potenciais agentes antimicrobianos para uso em alimentos e aplicações farmacêuticas. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 11 (1): 34-55
- World Health Organization. Food Safety. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 25 abr. 2020
- WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K.I. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed., v. 5, part B, Springer-Verlag, New York, NY, 2012