



POTENCIAL DE USO DE SURFACTINA NA DISPERSÃO DE BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*

Sumária Sousa e Silva¹, Marcia Nitschke²

¹ Profa Dra, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológica, Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Barra do Bugres- MT, Brasil.

(sumariasousa@gmail.com)

² Profa Dra, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos- SP, Brasil.

Recebido em: 08/04/2017 – Aprovado em: 10/06/2017 – Publicado em: 20/06/2017
DOI: 10.18677/EnciBio_2017A115

RESUMO

As bactérias são capazes de crescer e aderir em superfície biótica e abiótica formando agregados multicelulares, denominados de biofilme. Nessa forma de vida, os micro-organismos apresentam maior resistência frente à agentes antimicrobianos e também aos sanitizantes convencionais devido a presença da matriz polimérica extracelular, que impede ou diminui o contato com agentes externos. *Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista, frequentemente multi-resistente capaz de formar biofilmes. A surfactina é um biossurfatante produzido por *Bacillus subtilis* que apresenta potencial de aplicação como substituto aos tensoativos convencionais em diversos segmentos industriais. O presente trabalho avaliou a influência de diferentes concentrações de surfactina na remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus* em três temperaturas de tratamento (4 °C, 25 °C e 37 °C), por um período de duas horas sob condições estáticas. Os biofilmes foram pré-formados em placas de poliestireno de 96 poços, durante 48 horas à 37 °C e em seguida foram submetidos ao tratamento com surfactina. O estudo mostrou que dentre as condições de tratamento analisadas, aquela que proporcionou maior remoção em relação ao controle foi à 37 °C, na concentração de 0,05 % de surfactina, removendo 41 % do biofilme. A capacidade demonstrada pela surfactina em remover os biofilmes pode ser explorada futuramente para controle de biofilmes deste micro-organismo.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilme, Biossurfatante, *Staphylococcus aureus*.

DISPERSION OF *Staphylococcus aureus* BIOFILM USING SURFACTIN

ABSTRACT

Bacteria are able to grow and adhere on biotic and abiotic surfaces forming multicellular aggregates, called biofilms. In this way of life, microorganisms present greater resistance against antimicrobial agents and also to the conventional sanitizers due to the presence of extracellular polymeric matrix, that prevents or

diminishes the contact with external agents. *Staphylococcus aureus* is an often multi-resistant opportunistic pathogen capable of forming biofilms. Surfactin is a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* that presents potential as alternative to synthetic surfactants in several industrial segments. Present work evaluated the influence of different concentrations of surfactin on the removal of *Staphylococcus aureus* biofilms at three treatment temperatures (4 °C, 25 °C and 37 °C) for a period of 2 h under static conditions. The biofilms were preformed into 96-well polystyrene plates for 48 h at 37 °C and then subjected to surfactin treatment. The study showed that the best condition was attained at 37 °C, using 0.05 % surfactin, reaching 41 % of biofilm removal. The ability of surfactin to remove biofilms can be exploited in the future to control biofilms this important microorganism.

KEYWORDS: Biofilm, Biosurfactant, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva que pode causar intoxicação alimentar devido à ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas estáveis ao calor. Uma das principais doenças transmitidas por alimentos contaminados por essa bactéria é conhecida por gastroenterite. A absorção de enterotoxinas estafilocócicas pelo organismo pode causar cólicas abdominais, náuseas, vômitos e diarreia. Os alimentos que frequentemente estão envolvidos nesse tipo de contaminação incluem: carne, produtos de aves e ovos, leite e produtos lácteos em geral (PIMENTEL-FILHO et al., 2014).

Ao longo dos processos industriais *S. aureus* pode se espalhar em superfícies de contato durante a manipulação de alimentos, e também para produtos alimentares. As contaminações podem estar associadas principalmente com a manipulação imprópria de alimentos cozidos ou processados, seguido de armazenamento sob condições que permitem o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas. Além disso, algumas estirpes apresentam capacidade de formar biofilmes em superfícies de processamento de alimentos o que facilita o cruzamento de contaminação (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2013 PIMENTEL-FILHO et al., 2014).

Os biofilmes podem ser definidos como uma forma de vida microbiana sésil, que caracterizam-se pela adesão de micro-organismos a uma superfície biótica ou abiótica, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) formando uma rede gelatinosa, que imobiliza e protege as células (OLIVEIRA et al., 2010; MYSZKA & CZACZYK, 2011). A formação de biofilmes provoca alterações fenotípicas das células planctônicas (livres) permitindo a sobrevivência dos micro-organismos em ambientes em condições adversas. Além disso, favorece maior resistência a aplicação de estímulos externos de estresse, tais como: dessecação, luz UV e tratamento com antimicrobianos e agentes de higienização, devido a baixa atividade metabólica das células, variabilidade fenotípica e baixa difusão de antimicrobianos (MYSZKA & CZACZYK, 2011). Em espécies de estafilococos, o desenvolvimento de biofilmes é principalmente facilitado pelo polissacarídeo intercelular adesina (PIA). Outro fator envolvido no desenvolvimento do biofilme de *S. aureus* é a sinalização intercelular, muitas vezes referido como sensor de *quorum*. Este sistema *quorum sensing* é codificado pelo gene acessório regulador (*gar*) local, uma rede global de regulação de fatores de virulência, incluindo o desenvolvimento de biofilme (HAMADI et al., 2014).

Diante disso tornam-se necessários estudos de novos agentes que possam controlar o crescimento ou até mesmo remover biofilmes contribuindo com a

qualidade e segurança de produtos e processos. Uma alternativa para controle de patógenos alimentares é o uso de Biossurfactantes (BS), que compreendem um grupo diverso de moléculas anfipáticas com estruturas químicas diferentes, produzidas por vários micro-organismos (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Estas moléculas são formadas principalmente como metabólitos secundários e desempenham papéis críticos na sobrevivência de micro-organismos, agindo como agentes biocidas que podem não só reduzir a sobrevivência dos micro-organismos contaminantes, mas eliminar os biofilmes (NITSCHKE & PASTORE, 2002; GUDINÃ et al., 2013).

A surfactina é um biossurfactante do tipo lipopeptídeo cíclico, produzida por várias cepas de *Bacillus subtilis* e sua estrutura geral é a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos (L-asparagina, L-leucina, L-glicina, L-leucina, L-valina e duas D-leucinas), ligados a uma cadeia de ácido graxo beta-hidróxi, sendo que esta cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (CHEN et al., 2015; JIN et al., 2016). As isoformas diferenciam ligeiramente em suas propriedades físico-químicas devido a variações no tamanho da cadeia, a ligação ao componente ácido graxo β -hidróxi e a substituições dos aminoácidos componentes do anel (MEENA & KANWAR, 2015). Estas variações dependem da linhagem e das condições nutricionais e ambientais, mais do que de determinação genética (BARROS et al., 2007; CHEN et al., 2015).

A surfactina tem recebido atenção pela diversidade de aplicações nas áreas industriais e biotecnológicas (JIN et al., 2016). Quando comparada a outros biossurfactantes, e a alguns surfactantes sintéticos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de trimetil amônio (BTA), a surfactina apresenta maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial. Possui atividade superficial excepcional, reduzindo a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN m⁻¹ em concentrações menores de 20 μ M, além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 para valores menores que 1 mN m⁻¹ (BARROS et al., 2007; MANDAL et al., 2013).

Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial uso de surfactina na dispersão de biofilmes de *Staphylococcus aureus* em diferentes condições de temperatura e concentração.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo e padronização do inóculo

A cepa selecionada para o presente estudo foi *Staphylococcus aureus* ATCC 8095, relacionada com contaminação alimentar. A bactéria foi cultivada em caldo nutriente (pH 7,4 \pm 0,2) e incubada a 37 \pm 2 °C por 24 horas, a partir de solução estoque, mantida a -20 °C em caldo nutriente suplementado com 20 % de glicerol (v/v). O inóculo foi diluído em solução salina (NaCl 0,86 %) a fim de se obter uma suspensão final contendo 10⁹ UFC mL⁻¹. Esse procedimento foi realizado usando espectrofotômetro com medida de absorbância 610 nm seguido da técnica de contagem em gotas.

Superfície de ensaio

A superfície abiótica utilizada para o desenvolvimento dos biofilmes foi o poliestireno, um material amplamente utilizado na indústria de alimentos. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (*Perfecta*) de fundo redondo (dimensões da placa: 85,4 x 127,6 x 14,4 mm/ dimensões do poço: 6,92 x 12 mm), fabricadas em poliestireno de alta transparência e esterilizadas por raio gama.

Cinética de formação de biofilmes

Após a padronização do inóculo, foi possível realizar os testes de cinética de formação de biofilme, nos tempos de 0- 96 h, e nos tratamentos de remoção de biofilmes usando o biossurfatante surfactina (*Sigma-Aldrich*), com $\geq 98\%$ de pureza, ($C_{53}H_{93}N_7O_{13}$, Massa molecular: 1036,34 Da). Para avaliar a formação dos biofilmes, em diferentes tempos, alíquotas de 20 μL de suspensão bacteriana (10^9 UFC mL^{-1}) foram inoculadas em microplaca de poliestireno de 96 cavidades contendo 180 μL do meio caldo nutriente (pH $7,4 \pm 0,2$). As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por um período de 0- 96 h em estufa bacteriológica, devidamente vedadas para evitar a evaporação.

Tratamento dos biofilmes com surfactina

Após o crescimento dos biofilmes como descrito acima, o meio de cultura foi removido e realizou-se lavagens (2x) das cavidades com água destilada. Em seguida foi adicionado 200 μL de solução de surfactina, previamente filtrada em poro de 22 μm , em diferentes concentrações (0,01 %, 0,025 %, 0,05 % e 0,1 %) deixando-se em contato por duas horas. Os tratamentos foram realizados em triplicatas independentes sob condições estáticas nas temperaturas de 4 °C, 25 °C e 37 °C.

Quantificação da biomassa celular

Após o estabelecimento dos biofilmes realizou-se a quantificação da biomassa celular, através do seguinte procedimento: o biofilme aderido foi fixado com 200 μL de álcool metílico 99,9 % (*Qhemis*) por 15 minutos e a adesão bacteriana visualizada após 15 minutos de coloração com 200 μL de solução aquosa de cristal violeta 0,5 % (*Synth*). Após lavagem com água destilada o corante foi extraído com 200 μL com ácido acético glacial 33 % (*Synth*) e após 15 minutos procedeu-se a leitura da absorbância (Abs) da solução a 595 nm em leitora automática de microplacas *Enspire* (*PerkinElmer*) (MIRELES II et al., 2001). A quantidade de biofilme removido foi comparada com o controle tratado com água destilada. Esse controle serviu de referência (sendo considerado 100 % de biofilme não removido).

Análise estatística

Os ensaios microbiológicos foram expressos como a média de no mínimo três repetições independentes. Os dados obtidos foram comparados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 95 % de probabilidade e o teste de Tukey foi usado para avaliar as diferenças entre as médias. As análises foram feitas utilizando o software *Origin v. 9* (*OriginLab Corporation*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização do inóculo resultou na relação de valores de densidade óptica (D.O.), que foi de 0,80 com o número de unidades formadoras de colônia (10^9 UFC mL^{-1}). Este parâmetro é considerado extremamente importante, pois o número inicial de micro-organismos influencia na formação de biofilme. Segundo ANDRADE et al., (2008) para ser considerado um biofilme, é necessário apresentar um número mínimo de 10^7 UFC cm^{-2} , enquanto que RONNER & WONG, (1993) consideram como biofilme um número de células aderidas de 10^5 UFC cm^{-2} e WIRTANEN et al., (1996) um valor de 10^3 UFC cm^{-2} . Neste trabalho, utilizou-se o valor de 10^9 UFC mL^{-1} para garantir o maior número de células na etapa inicial de formação dos biofilmes.

Para verificar a capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica em condições estáticas e temperatura fixa de 37 °C foi necessário realizar previamente ensaios cinéticos com o micro-organismo de estudo, em microplacas de poliestireno contendo 96 cavidades. Esta técnica possibilitou visualizar a formação de biofilmes em diferentes tempos no intervalo de 0 a 96 h. Os resultados de formação de biofilmes em superfície de poliestireno estão representados na Figura 1. Os dados mostram que o poliestireno apresenta boa capacidade adesiva frente à *S. aureus* ATCC 8095 e uma maior formação de biofilme é observada com o passar do tempo, tendo máximos em oito horas e também após 80 horas de contato.

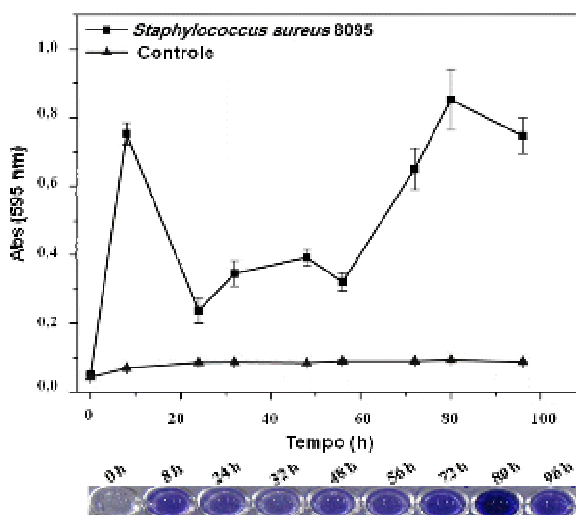


FIGURA 1. Cinética de formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* ATCC 8095 em superfície de poliestireno.
 FONTE: Autoria própria (2017).

Estudos realizados por DI CICCIO et al., (2015), também demonstraram a capacidade de várias cepas de *S. aureus* em formar biofilme em superfície onde ocorre manipulação e processamento de alimentos, como: poliestireno e em aço inoxidável. Os resultados mostraram que as cepas analisadas formaram biofilme preferencialmente em poliestireno (65,7 %) em relação ao aço inoxidável (63,1 %) e em particular em temperatura de 37 °C. Em geral as bactérias têm uma tendência natural para aderir em diferentes superfícies como um mecanismo de sobrevivência. Superfícies que proporcionam desenvolvimento de biofilme incluem: plástico, vidro, metal, madeira, e produtos alimentares (ABDALLAH et al., 2014). Além disso, propriedades da superfície da célula, como a presença de flagelo, fímbrias, pili, proteínas adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicoico e cápsula, também influenciam na adesão a superfície (OLIVEIRA et al., 2010).

SINDE & CARBALLO (2000) relataram que *Salmonella* e *Listeria* apresentam maior capacidade de adesão em superfícies hidrofóbicas do que em superfícies hidrofílicas. Além disso, as superfícies cobertas por macromoléculas, tais como substâncias orgânicas, favorecem ainda mais adesão de algumas células bacterianas (SREY et al., 2013). Dessa maneira, a adesão bacteriana é um processo bastante complexo que envolve a interação multifacetada de três componentes: bactéria, superfície (hidrofobicidade, rugosidade, carga superficial, etc) e microambiente (pH, disponibilidade nutricional, inóculo bacteriano, etc) em que eles se encontram (TRENTIN et al., 2013).

O poliestireno, um material usado na indústria de alimentos possui características hidrofóbicas. Sabe-se que os materiais hidrofóbicos são mais susceptíveis a adesão bacteriana do que superfícies hidrofílicas (MYSZKA & CZACZYK, 2011; DI CICCIO et al., 2015). Porém, fatores ambientais como: pH, temperatura, composição do meio de cultivo, e características bacterianas também desempenham papéis importantes na alteração do fenótipo de células planctônicas (livres) para a forma séssil (MYSZKA & CZACZYK, 2011; SREY et al., 2013).

A partir dos resultados mostrados na Figura 1 foi possível determinar o período de formação dos biofilmes de *S. aureus* a serem tratados com a surfactina em experimentos posteriores. Sendo que foi escolhido o tempo de 48 horas para formação de biofilmes de *S. aureus* ATCC 8095, pois considera-se um biofilme maduro, e, portanto, mais resistente a ação de agentes externos.

De acordo com a Figura 2, o tratamento do biofilme de *S. aureus* ATCC 8095 em caldo nutriente indicou diferença significativa para a maioria das concentrações analisadas, em relação ao controle, além de notável influência da temperatura. Observou-se que a 4 °C todas as concentrações analisadas apresentaram diferença significativa em relação ao controle, sendo que aquela que apresentou maior potencial de remoção foi a concentração de 0,05 % de surfactina, com 37,40 % de remoção (Tabela 1). O tratamento dos biofilmes a 25 °C mostrou um perfil diferente, pois a remoção do biofilme foi proporcional ao aumento da concentração, exceto na concentração de 0,1 % de surfactina, na qual não houve remoção significativa. No entanto, para os tratamentos a 37 °C, observou-se que houve diferença significativa em todas as concentrações analisadas, sendo que aquela que apresentou maior remoção foi 0,05 %, com 41,00 % da biomassa celular (Tabela 1).

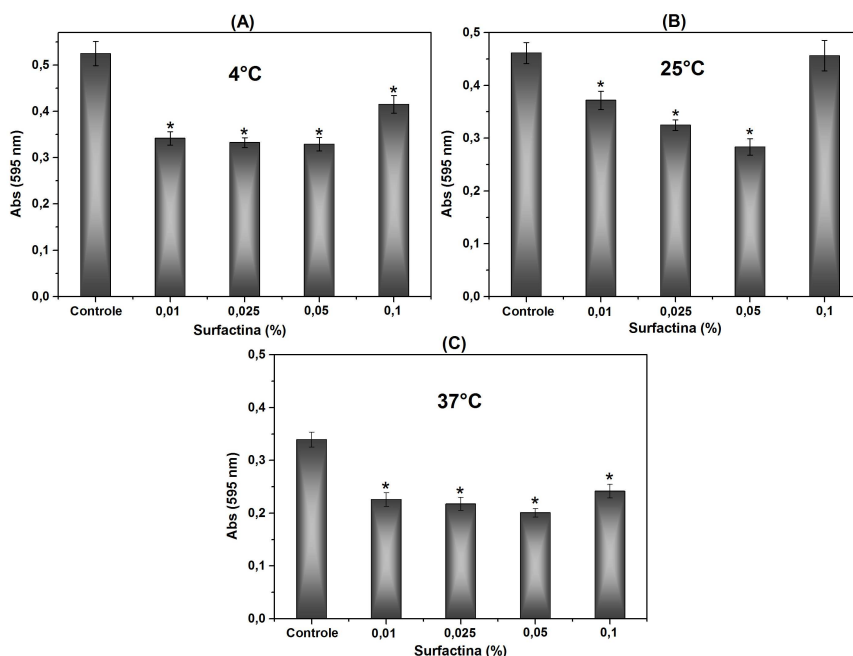


FIGURA 2. Quantificação da biomassa celular do biofilme formado por *Staphylococcus aureus* ATCC 8095, submetido ao tratamento com a surfactina, nas temperaturas de (A) 4 °C (B) 25 °C e (C) 37 °C. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes. (*) Diferem significativamente em relação ao controle pelo Teste Tukey ($P < 0,05$). FONTE: Autoria própria (2017).

No geral observou-se que os biofilmes de *S. aureus* ATCC 8095 formados em caldo nutriente apresentaram uma tendência de maior remoção, em maiores concentrações de surfactina, até 0,05 %, pois a 0,1 % este efeito foi desfavorecido, principalmente a 25 °C, na qual removeu apenas 1,08 % (Tabela 1). Porém a temperatura mostrou-se um fator relevante. Observa-se que quando em baixas concentrações nas temperaturas estudadas o efeito da remoção é favorecido, principalmente nas temperaturas de 4 °C e 37 °C (Tabela 1). Destaque para a concentração de 0,05 %, a qual mostrou-se mais eficiente nas três temperaturas analisadas.

TABELA 1. Porcentagem de remoção dos biofilmes *S. aureus* ATCC 8095 formados em superfície de poliestireno na presença de caldo nutriente, após 2 h de tratamento com surfactina em diferentes condições de concentração e temperatura.

Meio de cultivo	%Surfactina	% Remoção*		
		4 °C	25 °C	37 °C
Caldo	0,01	34,92 ^{A, a}	19,52 ^{B, a}	33,63 ^{A, a}
	0,025	36,64 ^{A, a}	29,50 ^{A, b}	35,98 ^{A, a}
Nutriente	0,05	37,40 ^{A, a}	38,61 ^{A, c}	41,00 ^{A, b}
	0,1	20,99 ^{A, b}	1,08 ^{B, d}	28,90 ^{C, a}

*Em cada linha os valores seguidos da mesma letra maiúscula não diferem significativamente $P < 0,05$. **Em cada coluna os valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem significativamente $P < 0,05$. FONTE: Autoria própria (2017).

A remoção dos biofilmes está relacionada com a capacidade do biossurfatante em penetrar na interface célula-célula e/ou célula-superfície, e uma vez adsorvido nesta interface, promove a redução da tensão interfacial. Dessa forma, a interação entre as células e a superfície é reduzida e o biofilme é mais facilmente removido (McLANDSBOROUGH et al., 2006).

Neste caso, os resultados sugerem que a ação de surfactina quanto aos fatores temperatura e concentração influenciaram significativamente, na remoção dos biofilmes. Em estudos realizados por GOMES & NITSCHKE, (2012) também foi demonstrado a suscetibilidade de biofilme de *L. monocytogenes* ATCC 19112, *S. aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enterica* Enteritidis PNCQ0301 ao tratamento com surfactina. A porcentagem de remoção mostrou-se variável para cada bactéria estudada, porém o tempo de contato (2, 6 e 12 horas) não apresentou diferença significativa para os biofilmes de *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Além de favorecer a remoção de biofilmes formados por bactérias, foi relatado também o potencial de surfactina como agente anti-adesivo e anti-biofilme frente ao fungo *C. albicans* (CERESA et al., 2016). Esses resultados mostram que a eficiência de surfactina em remover biofilmes depende de diversos fatores como: tipo de micro-organismo, concentração, temperatura, superfície de crescimento, dentre outros, o que dificulta a identificação do mecanismo de ação. Apesar de existirem poucos estudos a respeito de aplicações industriais da surfactina, suas propriedades químicas, tecnológicas e funcionais indicam fortes possibilidades de uso neste setor em substituição aos sanitizantes e desinfetantes tradicionalmente utilizados.

CONCLUSÕES

A partir deste estudo foi possível avaliar o potencial de aplicação do biossurfactante surfactina no controle de biofilmes de *S. aureus* formados em superfície de poliestireno. Os biofilmes mostraram-se susceptíveis ao tratamento em condições variadas, demonstrando que fatores como temperatura e concentração são determinantes para o desenvolvimento de estratégias de remoção de biofilmes utilizando surfactina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP) pelo apoio financeiro e estrutural para realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N.-E. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, p. 453-472, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>>. doi: 10.1007/s00203-014-0983-1.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N. J. (Ed.) **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela; p. 181- 226. 2008.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. DE; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200031>>. doi: 10.1590/S0100-40422007000200031.

CERESA, C.; RINALDI, M.; CHIONO, V.; CARMAGNOLA, I.; ALLEGRONE, G.; FRACCHIA, L. Lipopeptides from *Bacillus subtilis* AC7 inhibit adhesion and biofilm formation of *Candida albicans* on silicone. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, p.1375–1388, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10482-016-0736-z>>. doi: 10.1007/s10482-016-0736-z.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930- 936, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.048>>. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.10.048

CHEN, WEI-CHUAN; JUANG, RUEY-SHIN; WEI, YU-HONG. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**. v. 103, p. 158-169, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>>. doi: 10.1016/j.bej.2015.07.009.

GOMES, M. Z. do 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- 447, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.025>>.doi:
10.1016/j.foodcont.2011.11.025.

GUDIÑA, E. J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, p. 667-675, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.002>>. doi: 10.1016/j.tips.2013.10.002.

HAMADI, F.; ASSERNE, F.; ELABED, S.; BENSOUA, S.; MABROUKI, M.; LATRACHE, H. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, v. 38, p.104-108, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.006>>.doi: 10.1016/j.foodcont.2013.10.006

JIN, L.; GARAMUS, V. M.; LIU, F.; XIAO, J.; ECKERLEBE, H.; WILLUMEIT-RÖMER, R.; MUA, B.; ZOU A. Interaction of a biosurfactant, Surfactin with a cationic Gemini surfactant in aqueous solution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 481, p. 201- 209, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.07.044>> doi: 10.1016/j.jcis.2016.07.044.

MANDAL, S. M.; BARBOSA, A. E.A.D.; FRANCO, O. L. Lipopeptides in microbial infection control: Scope and reality for industry. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 338-345, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.004>> doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. **BioMed Research International**, v., n. ID 473050, p. 1- 9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/473050>>. doi: 10.1155/2015/473050.

MIRELES II, J. P.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R. M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 20, p. 5848- 5854, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001>>. doi: 10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001.

McLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, A.; PÉREZ- CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: At the interface between biophysics and microbiology. **Foods Biophysics**, v. 1, n. 2, p. 94-114, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11483-005-9004-x>>. doi: 10.1007/s11483-005-9004-x.

MYSZKA, K.; CZACZYK, K. Bacterial biofilms on food contact surfaces- a review. **Polish Journal of Food And Nutrition Sciences**, v. 61, n.3, p. 173-180, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2478/v10222-011-0018-4>>. doi: 10.2478/v10222-011-0018-4.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n.5, p. 772-776, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>>. doi: 10.1590/S0100-40422002000500013.

OLIVEIRA, M. M. M. de; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277-84, 2010. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/6327>>.

PIMENTEL-FILHO, N. J.; MARTINS, M. C. F.; NOGUEIRA, G. B.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v.190, p. 1- 8, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.004>>. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.004.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless-steel and buna-N rubber. **Journal Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-56.9.750>>. doi: 10.4315/0362-028X-56.9.750.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v.17, p. 439- 447, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/fmic.2000.0339>>. doi: 10.1006/fmic.2000.0339.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>>. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113- 238, 2013. Disponível em:<http://www.liberato.com.br/sites/default/files/arquivos/Revista_SIER/v.%2014%2C%20n.%2022%20%282013%29%2F09.biofilmes.pdf>

VAZQUEZ-SANCHEZ, D.; HABIMANA, O.; HOLCK, A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. **Current Microbiology**, v. 66, n. 2, p.110-121, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00284-012-0247-8>>. doi: 10.1007/s00284-012-0247-8

WIRTANEN, G; HUSMARK U; MATTILA-SANDHOLM T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food processing systems. **Journal Food Protection**, v. 59, p: 727-733,1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-59.7.727>> doi: 10.4315/0362-028X-59.7.727.