IRANY MESQUITA COELHO MORAIS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS LÁCTICAS E DE COMPOSTOS QUÍMICOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO

BELO HORIZONTE
2014

IRANY MESQUITA COELHO MORAIS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS LÁCTICAS E DE COMPOSTOS QUÍMICOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais para o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

Orientadora: Prof.ª Vera Lúcia dos Santos
Co-orientadores: Prof. Dr. Ângelo de Fátima
Prof.ª Drª Maria Aparecida Resende Stoianoff
Profª Drª Regina Maria Nardi Drumond

BELO HORIZONTE
2014

Tudo posso N'aquele que me fortalece **Filipenses 4,13**

Agradeço

À Deus, fonte de luz em minha vida

Imensamente aos meus pais, Geraldo e Izilda, pelo exemplo de vida
Ao meu esposo, pelo companheirismo
À minha filha Isadora, pela inspiração que me faz querer viver mais e melhor
À Leila, por ser um anjo da guarda em minha vida
Aos meus irmãos, Ildany e Sávio, pela infinita amizade
Aos meus sobrinhos Léo, Lívia, Saulo, Sarah's, Lucas, pela alegria que me proporcionam

Aos meus cunhados e sogro, aos meus primos, tios e amigos, simplesmente por existirem em minha vida

À minha estagiária Ana Luisa Cordeiro, pela paciência e dedicação

Ao Jamil, pela alegria em nos servir

À minha orientadora Profª Vera e co-orientadores Profª Regina, Prof Ângelo e Profª Maria Aparecida, por serem o alicerce dessa pesquisa

À CAPES e ao Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, pela oportunidade da obtenção desse título

Ainda, aos grandes amigos que adquiri nestes quatro anos de experiência vivida no Laboratório de Microbiologia Aplicada, aos amigos da viagem para Natal, aos amigos de outros laboratórios do ICB, vocês fizeram toda a diferença nessa etapa da minha vida.

Viva! Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com classe
e vencer com ousadia, porque o mundo
pertence a quem se atreve e a vida é
muito para ser insignificante
(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

Lista de tabelas..... VII
Lista de figuras..... VII
Lista de abreviaturas..... X
RESUMO..... XII
ABSTRACT..... XIII

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA..... 14

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 18
2.1 Microbiota vaginal..... 18
2.2 Bactérias lácticas e seu papel protetor do trato geniturinário..... 20
2.2.1 Bactérias produtoras de biossurfactantes..... 21
2.3 Infecções do trato geniturinário..... 23
2.3.1 Vaginoses e vaginites bacterianas..... 24
2.3.2 Candidíase vaginal 26
2.4 Adesão e formação de biofilmes..... 29
2.5 Agentes antimicrobianos..... 32
2.5.1 Agentes antifúngicos.....
2.5.2 Agentes antibacterianos.....
2.5.3 Teste de atividade antimicrobiana..... 36
2.6 Biossurfactantes: conceitos e aplicações.....

2.7 Sinergismo entre os agentes microbianos..... 41
2.8 Compostos de Biginelli..... 42
2.9 Compostos benzazóis..... 44

3. OBJETIVOS 46
3.1 Objetivos gerais..... 46
3.2 Objetivos específicos..... 46

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 48
I Avaliação das condições de cultivo e métodos de extração dos

biossurfactantes 48
1.1 Micro-organismos..... 48
1.2 Avaliação das condições de cultivo dos isolados produtores de biossurfactantes..... 48
1.3 Método do espalhamento da gota..... 49
1.4 Método da atividade emulsificante..... 49
1.5 Extração dos biossurfactantes produzidos pelas bactérias lácticas..... 50
II Prospecção de isolados de *Lactobacillus* spp. produtores de biossurfactantes..... 50
2.1 Avaliação da produção de biossurfactantes..... 50
2.1.1 Produção do inóculo..... 50
2.2 Medida da tensão superficial..... 51
2.3 Halos de hemólise em placas de ágar-sangue..... 51
2.4 Atividade antimicrobiana..... 51
2.4.1 Avaliação da sensibilidade de micro-organismos patogênicos aos biossurfactantes..... 52
2.4.2 Diluição dos compostos..... 52
2.4.3 Preparo do inóculo..... 52
2.4.4 Teste de microdiluição em placa..... 53
2.4.5 Leitura e interpretação..... 54
2.5 Ensaios de autoagregação e coagregação..... 54
2.6 Caracterização parcial da composição química dos biossurfactantes..... 55
III Atividade biológica e caracterização físico-química de Biossurfactantes..... 56
3.1 Avaliação da influência da camada S na capacidade de autoagregação e coagregação de patógenos dos isolados *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 56
3.2 Avaliação da produção de peróxido..... 56
3.3 Determinação da concentração micelar crítica..... 57
3.4 Determinação do efeito da concentração dos biossurfactantes produzidos pelos *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 57

3.5 Estudo da estabilidade das emulsões e biossurfactantes a diferentes condições de temperatura, pH, adição de eletrólitos e solventes hidrofóbicos..... 57

3.5.1 Estudo da atividade emulsificante em diferentes valores de pH..... 58

3.5.2 Estudo da estabilidade do biossurfactante após exposição a 100 ºC..... 58

3.5.3 Estudo da estabilidade do biossurfactante após adição de eletrólitos..... 58

3.5.4 Determinação da atividade emulsificante frente a diferentes substratos hidrofóbicos..... 59

IV Avaliação da atividade antiadesiva e caracterização estrutural de biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 59

4.1 Utilização dos extratos contendo biossurfactantes na remoção de biofilmes microbianos em placas de poliestireno..... 59

4.2. Avaliação da atividade antiadesiva dos biossurfactantes produzido por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 60

4.3 Determinação da hidrofobicidade celular de micro-organismos patogênicos após exposição aos biossurfactantes..... 61

4.4 Caracterização dos ácidos graxos e monossacarídeos por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa..... 62

4.5 Caracterização dos biossurfactantes por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier..... 62

V Avaliação das atividades biológicas dos compostos de Biginelli e benzazóis e interação entre biossurfactantes e benzazóis..... 63

5.1 Compostos bioativos usados..... 63

5.2 Determinação da atividade antimicrobiana dos compostos diidropirimidona e benzazois..... 63

5.2.1 Teste de microdiluição em placa..... 64

5.2.2 Leitura e interpretação..... 64

5.3 Determinação da interação dos compostos biossurfactantes e benzazóis na atividade antimicrobiana..... 64

5.3.1 Preparo das soluções..... 65

5.3.2 Preparo do painel Chekerboard..... 65
5.4 Curva de sobrevivência de *C. albicans* e *E. coli* após exposição aos biossurfactantes e benzazóis..... 66
5.5 Avaliação da atividade antiadesiva dos benzazóis 67
5.6 Triagem dos biossurfactantes e compostos benzazóis quanto a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais..... 67
VI Análise estatística..... 68

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 69
I Avaliação das condições de cultivo e métodos de extração dos biossurfactantes 69
1.1 Produção de biossurfactantes em condições de aerobiose e anaerobiose..... 69
1.2 Extração dos biossurfactantes produzidos pelas bactérias lácticas..... 81
II Prospecção de isolados de *Lactobacillus* spp. produtores de biossurfactantes..... 82
2.1 Avaliação das condições de crescimento, atividade surfactante, emulsificante e hemolítica dos diferentes isolados..... 82
2.2 Atividade antimicrobiana dos compostos selecionados..... 86
2.3 Ensaio de autoagregação e coagregação..... 87
2.4 Caracterização parcial da composição química dos biossurfactantes..... 90
III Atividade biológica e caracterização físico-química de biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 91
3.1 Avaliação da influência da camada S na capacidade de autoagregação e coagregação de patógenos dos isolados *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 91
3.2 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio pelos isolados..... 93
3.3 Determinação da concentração micelar crítica..... 94
3.4 Determinação do efeito da concentração dos biossurfactantes produzidos pelos *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 96

3.5 Avaliação da estabilidade dos biossurfactantes..... 97
3.5.1 Estudo da atividade emulsificante em diferentes valores de pH..... 97
3.5.2 Estudo da estabilidade do biossurfactante após exposição a 100 ºC..... 98
3.5.3 Influência da adição de eletrólitos na atividade emulsificante. 98
3.5.4 Determinação da atividade emulsificante frente a diferentes substratos hidrofóbicos..... 99
IV Avaliação da atividade antiadesiva e caracterização estrutural de biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 102
4.1 Utilização dos extratos contendo biossurfactantes na redução de biofilmes microbianos em placas de poliestireno..... 102
4.2. Avaliação da atividade antiadesiva dos compostos produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 103
4.3 Determinação da hidrofobicidade celular de micro-organismos patogênicos após exposição aos biossurfactantes..... 106
4.4 Caracterização dos ácidos graxos e monossacarídeos por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa..... 107
4.5 Caracterização dos biossurfactantes por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier..... 109
V Avaliação das atividades antimicrobianas e antiadesivas dos compostos de Biginelli benzazois e interação entre benzazóis e biossurfactantes..... 113
5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos diidropirimidona..... 113
5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos Benzazois..... 113
5.3 Avaliação da interação antimicrobiana dos compostos biossurfactantes e benzazois..... 118
5.4 Curva de sobrevivência de *C. albicans* e *E. coli* após exposição aos biossurfactantes e benzazóis..... 121
5.5 Avaliação da atividade antiadesiva dos compostos benzazóis..... 123
5.6 Determinação da hidrofobicidade celular dos micro-organismos

patogênicos após incubação com benzazóis..... 126

5.7 Triagem dos biossurfactantes e compostos benzazóis quanto a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais..... 128

6. CONCLUSÕES..... 131

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 134

8. Anexo I: Produção científica..... 162

9. Anexo II: Artigo..... 165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do índice ICIF para avaliar o tipo de interação.... 66
Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) dos dados de crescimento e diferentes isolados de *Lactobacillus* cultivados em aerobiose e anaerobiose..... 69
Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) dos dados de *E24* para condições de cultivo diferentes extratos e solvente tolueno... 72
Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) dos dados de *E24* para condições de cultivo e solvente querosene..... 73
Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) dos dados de atividade surfactante..... 78
Tabela 6: Atividade emulsificante de biossurfactantes extraídos por precipitação ácida ou extração alcoólica..... 82
Tabela 7: Resultados do crescimento, atividade surfactante, atividade emulsificante e hemolítica..... 85
Tabela 8: Caracterização parcial dos biossurfactantes..... 91
Tabela 9: Habilidade de coagregação de patógenos por *L. jensenii* P_{6A}.. 92
Tabela 10: Habilidade de coagregação de patógenos por *L. gasseri* P_{65}. 93
Tabela 11: Composição de ácidos graxos dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 108
Tabela 12: Composição de monossacarídeos dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}..... 108
Tabela 13: Correspondência entre espectro IR e grupos funcionais detectados em biossurfactantes produzidos por bactérias lácticas..... 111
Tabela 14: Determinação da concentração inibitória mínima de compostos benzazois contra bactérias, leveduras e fungos patogênicos do trato geniturinário..... 114
Tabela 15: Valores de ICIF correspondentes a diferentes interações

entre biossurfactantes e benzazóis..... 119
Tabela 16: Valores de IC50 (µM) das substâncias ativas nas respectivas linhagens de células..... 129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral da reação de Biginelli..... 42
Figura 2: Produtos de Biginelli que apresentam importantes atividades biológicas..... 43
Figura 3: Estrutura geral dos benzoimidazóis e benzotiazóis..... 45
Figura 4: Painel Checkerboard com combinações dos antimicrobianos benzoimidazóis e benzotiazóis e biossurfactantes..... 65
Figura 5: Densidade celular de 23 isolados de bactérias lácticas em condições de aerobiose e anaerobiose..... 71
Figura 6: Avaliação da atividade emulsificante (*E24*) de 23 amostras de bactérias lácticas..... 75
Figura 7: Avaliação da atividade emulsificante E_{24} dos 23 isolados de bactérias lácticas em condições de aerobiose e anaerobiose usando querosene como solvente hidrofóbico..... 77
Figura 8: Efeito para atividade surfactante avaliando as condições de cultivo..... 78
Figura 9: Avaliação da atividade surfactante pelo método do espalhamento da gota de 23 amostras de bactérias lácticas em condições de aerobiose e anaerobiose..... 80
Figura 10: Valores de porcentagem de autoagregação de 5 isolados de *Lactobacillus* spp..... 88
Figura 11: Efeito da concentração do biossurfactante na tensão superficial..... 95
Figura 12: Efeito da concentração dos biossurfactantes na atividade emulsificante..... 97
Figura 13: Atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *L. jensenii* P_{6A}, utilizando diferentes substratos hidrofóbicos.. 101
Figura 14: Atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *L. gasseri* P_{65} utilizando diferentes substratos hidrofóbicos..... 101

Figura 15: Percentual de redução de biofilmes de micro-organismos patogênicos pelo extrato de *Lactobacillus jensenii* P_{6A}..... 103
Figura 16: Percentual de redução de biofilmes de micro-organismos patogênicos pelo extrato de *L. gasseri* P_{65}..... 103
Figura 17: Porcentagem de redução adesão de micro-organismos patogênicos por biossurfactante produzido por *L. jensenii* P_{6A}..... 105
Figura 18: Porcentagem de redução da adesão de micro-organismos patogênicos por biossurfactante produzido por *L. gasseri* P_{65}..... 105
Figura 19: Hidrofobicidade celular de micro-organismos patogênicos após exposição aos biossurfactantes..... 107
Figura 20: Espectros de FT-IR dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} (BS P6A) e *L. gasseri* P_{65} (BS P65)..... 112
Figura 21: Curva de sobrevivência *C. albicans* após exposição aos biossurfactantes e compostos benzazóis..... 121
Figura 22: Curva de sobrevivência de *C. albicans* após exposição aos biossurfactantes associados aos compostos benzazóis..... 121
Figura 23: Curva de sobrevivência de *E. coli* após exposição aos biossurfactantes e compostos benzazóis..... 122
Figura 24: Curva de sobrevivência de *E. coli* após exposição aos biossurfactantes associados aos compostos benzazóis..... 122
Figura 25: Porcentagem de redução na adesão micro-organismos patogênicos usando o composto benzoimidazol I06..... 124
Figura 26: Porcentagem de redução na adesão de micro-organismos patogênicos usando o composto benzoimidazol I16..... 124
Figura 27: Porcentagem de redução da adesão de micro-organismos patogênicos usando o composto benzoimidazol I17..... 125
Figura 28: Hidrofobicidade celular de micro-organismos patogênicos após exposição aos compostos benzazóis..... 128
Figura 29: Avaliação da atividade citotóxica das substâncias em células tumorais e células VERO..... 129

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - por cento

µg – micrograma

µL – microlitro

Agg – índice de autoagregação

AS – atividade surfactante

ATCC – American type culture collection

BC -

BHI – meio para cultivo de bactérias (brain heart infusion)

BSA – albumina sérica bovina

CAS – compostos ativos de superfície

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

Coagg – índice de coagregação

CTAB -

DMSO - dimetilsulfóxido

DO – densidade óptica

E_{24} – índice de emulsificação mensurado após 24 h

g – grama

g – gravidade

g/L – grama por litro

h – hora

ICIF -

HCl – ácido clorídrico

K_2HPO_4 – fosfato de potássio monobásico

KCl – cloreto de potássio

KH_2PO_4 – fosfato de potássio dibásico

L – litro

M - molar

mg – miligrama

MH – meio Muller Hinton

min - minuto

min – minutos

mL – mililitro

mm - milímetro

mmol – milimolar

mN/m – mili Newtons por metro

MOPS – ácido 3 – (N-morfolino) propanosulfônico

MRS – meio para cultivo de lactobacilos, desenvolvido por Man, Rogosa e Sharpe

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NCCLS - National Committe for Clinical Laboratory Standards

nm - nanômetro

ºC – grau Celsius

PBS – salina tamponada em fosfato

pH – potencial hidrogeniônico

rpm – rotações por minuto

RPMI – meio de cultivo desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial

Tween – polissorbato

TTAB

TTC

UFC – unidades formadoras de colônias

v/v – volume por volume

VA – vaginite aeróbica

VB – vaginose bacteriana

Resumo

Um grande número de substâncias, entre elas, biossurfactantes, diidropirimidonas e benzazóis, tem sido testado *in vitro*, com o objetivo de avaliar a inibição do crescimento ou mesmo eliminação de micro-organismos patogênicos, com intuito de diminuir os processos infeciosos. Neste trabalho, cinquenta e duas amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de mulheres com infecções vaginais foram avaliados quanto à capacidade de produção de biossurfactantes. Destes, 19 isolados foram selecionados e então avaliados quanto à atividade antimicrobiana e inibição de formação de biofilme, sozinhos ou associados aos compostos diidropirimidona e benzazóis. A capacidade de coagregação a patógenos e autoagregação também foi avaliada. Estas características são importantes na adesão às células epiteliais e consequente prevenção da colonização por micro-organismos patogênicos. Os biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli, Staphylococcus saprophyticus, Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*. Diidropirimidonas apresentaram CIM's em concentrações iguais ou maiores que 64 $\mu g.mL^{-1}$, valores considerados altos para esta classe de compostos. Cinco compostos benzazóis apresentaram atividade antimicrobiana contra leveduras do gênero *Candida*; estes foram também avaliados quanto à capacidade de sinergismo em associação aos biossurfactantes. Dois benzazóis (I06) e (T17) apresentaram sinergismo contra *C. albicans* e quatro compostos apresentaram sinergismo contra *E. coli*. A caracterização da estrutura dos biossurfactantes indicou o predomínio de ácidos graxos de 12, 15, 18 e 20 carbonos e dos açúcares galactose, glicose, raminose e ribose. Esta estrutura complexa foi confirmada pela espectroscopia de absorção na região do

infravermelho que inferiu a presença de ligações peptídicas, ésteres e carboidratos. Os resultados obtidos nos permitiu obter informações sobre o possível uso de biossurfactantes em associação aos compostos benzazóis como agentes antimicrobianos e antiadesivos de micro-organismos de interesse clínico.

Abstract

A large number of substances, including, biosurfactants diidropirimidonas and benzazoles, has been tested in vitro, with the objective of evaluating the growth inhibition or elimination of pathogenic micro-organisms, in order to reduce the infectious processes.. In this study, fifty-two samples of *Lactobacillus* spp. isolated from women with vaginal infections were evaluated for their ability to produce biosurfactants and of these, 19 selected isolates were evaluated for antimicrobial activity and inhibition of biofilm formation, together with the compounds diidropirimidona and benzazoles. The ability of auto-agregation and coaggregation of the pathogens was also evaluated, these characteristics are important in adhesion to epithelial cells and consequent prevention of colonization by pathogenic microorganisms. The biosurfactants produced by *L. jensenii* P_{6A} and *L. gasseri* P_{65} showed antimicrobial activity against *Escherichia coli, Staphylococcus saprophyticus, Klebsiella pneumoniae and Enterobacter aerogenes*. Diidropirimidonas presented MIC's equal to or greater than 64 µg.mL-1, values considered high for this class of compounds. Five benzazoles compounds showed antimicrobial activity against yeasts of *Candida* spp. these were also evaluated for their ability synergism in combination with biosurfactants. Two benzazoles (I06) and (T17) exhibited synergism against *C. albicans* and four compounds showed synergism against *E. coli*. The structure characterization of the biosurfactant indicated a predominance of fatty acids with 12, 15, 18 and 20 carbons and sugars galactose, glucose, ribose and rhamnose. This complex structure was confirmed by infrared spectroscopy to infer the presence of peptide bonds, esters and carbohydrates. The results provided us information on the possible use of biosurfactants in association with benzazoles

compounds as antimicrobial and anti-adhesive agents of micro-organisms of clinical interest.

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Fungos e bactérias coabitam uma grande variedade de ambientes, e as interações entre eles podem ter efeitos significativos na sobrevivência, colonização e na patogênese desses micro-organismos. Há casos em que as bactérias proveem compostos que aumentam a produção de determinantes de virulência para os fungos. Outras vezes, produzem compostos com potencial de inibição da patogênese por reprimirem a filamentação dos fungos ou por causarem danos às estruturas celulares microbianas (FALAGAS et al., 2007).

No sistema urogenital feminino, coabitam mais ou menos 50 espécies microbianas (KAPER & SPERANDIO, 2005). Destes, espécies de *Lactobacillus* constituem os micro-organismos mais frequentemente isolados, sendo encontrados em 50 a 90 % das mulheres, onde as espécies podem variar de um indivíduo para o outro (ZHONG et al., 1998). Em mulheres em idade reprodutiva, o ambiente vaginal quando quantitativamente dominado por espécies de *Lactobacillus* produtores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tem sido frequentemente associado a mulheres grávidas saudáveis, à diminuição no aparecimento de infecções vaginais e ainda diminuição de desenvolvimento de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o HIV (SPURBECK et al., 2008).

O desequilíbrio da microbiota vaginal pode resultar no desenvolvimento de infecções causadas por bactérias, leveduras e protozoários patogênicos. Estes micro-organismos são responsáveis pela instalação de quadros de vaginites, vaginoses, entre outras infecções do trato geniturinário (DONDERS et al., 2002). As vaginoses bacterianas (VB), que são as mais prevalentes formas de infecção vaginal em mulheres em idade reprodutiva, têm sido a etiologia mais comum de sintomas vaginais em consultórios médicos (SOBEL, 1997; ALLSWORTH & PELPERT, 2007). Esta síndrome pode estar relacionada à depleção da população normal de lactobacilos e uma produção elevada de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, acompanhada pela diminuição da acidez (BUMP et al., 1988; BOHBOT & LEPARGNEUR, 2012).

A candidíase vaginal (CV) corresponde a segunda maior causa de vaginites em mulheres em idade reprodutiva, tendo a *Candida albicans* como seu principal agente, seguida de *C. glabrata* e *C. tropicalis* (FIDEL et al., 1999; GALLE & GIANINNI, 2004).

Organismos probióticos podem desempenhar um papel importante na redução da incidência destas infecções, atuando na prevenção ou tratamento da candidíase vaginal, de vaginose bacteriana e de infecções recorrentes do trato urinário inferior. Além disso, podem melhorar a resposta de defesa imunológica e diminuir a atividade de numerosos antimetabólitos tóxicos no ser humano (FALAGAS, et al., 2006a; FALAGAS, et al., 2006b; FALAGAS et al., 2007; CRIBBY et al., 2008; CUKROWSKA et al., 2009). Tem sido sugerido que o efeito protetor destes micro-organismos pode estar associado à produção de biossurfactantes que alteram as características das superfícies e reduzem a capacidade de adesão de uma vasta gama de patógenos (VELRAEDS et al., 1998, FRACCHIA et al., 2010). Além disso, os lactobacilos podem se ligar e coagregar a alguns patógenos bloqueando a adesão às mucosas do hospedeiro; podem matar os patógenos pela produção de antimicrobianos e manutenção de um pH vaginal em torno de 4,5; desta forma, prevenindo a propagação desses micro-organismos patogênicos para outras áreas da vagina e bexiga (REID et al., 1990, AROUTCHEVA et al., 2001, ETGETON et al., 2011).

Neste contexto, muitos estudos têm sido direcionados ao entendimento do processo de adesão e consequente formação de biofilmes e ainda, no desenvolvimento de técnicas para sua redução e inibição. Para muitos micro-organismos, a adesão aos tecidos do hospedeiro é essencial para a patogênese e as características microbianas responsáveis por esta adesão às superfícies das mucosas são consideradas atributos da virulência (CASADEVALL & PIROSKI, 2001).

Também, os micro-organismos sésseis, organizados no biofilme, são mais resistentes a agentes antimicrobianos e sanitizantes quando comparados às

células planctônicas (GILBERT et al., 2002). É sugerido que esta resistência está associada à camada de substâncias poliméricas extracelulares presente no biofilme que restringe a difusão dos antibióticos para o interior do biofilme, ficando somente as camadas superficiais expostas a doses letais de antimicrobianos (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

Uma alternativa viável é o uso de compostos ativos de superfícies (CAS) produzidos por micro-organismos que devido à estrutura anfipática das moléculas tem atividade de superfície, atividade emulsificante e ainda, propriedades antiadesivas e antimicrobianas. Os surfactantes de origem microbiana apresentam vantagens sobre os surfactantes sintéticos, como baixa toxicidade, biodegradabilidade, diversidade de estrutura química, efetividade sob condições ambientais extremas de pH, temperatura e força iônica. Devido a estas vantagens o uso de surfactantes sintéticos tem sido substituído por estes biossurfactantes em vários setores incluindo a indústria petroquímica, alimentícia e o uso como antiadesivos em dispositivos médico-hospitalares (ZERAIK & NISTCHKE, 2010). A fim de elucidar as propriedades antiadesivas e biocidas destes compostos, mais estudos são necessários, para que sejam consideradas como uma nova estratégia na redução da aderência microbiana (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

Os biossurfactantes têm despertado o interesse da classe científica por ter apresentado alguns compostos com atividade antimicrobiana, como os glicolipídeos produzidos por *Rhodococcus erythropolis* (ABDEL-MEGEED et al., 2011), a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* (HUANG et al., 2011) e raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (NISTCHKE &PASTORE, 2002). Diante do potencial do uso de biossurfactantes no controle microbiano e da necessidade da descoberta de novas estratégias de tratamento de infecções microbianas, no presente estudo foi investigado a interação e os efeitos de linhagens de lactobacilos e biossurfactantes por eles produzidos, incluindo a caracterização físico-química desses últimos.

Por outro lado, compostos sintéticos como diidropirimidonas e benzazóis têm despertado um interesse especial da química orgânica e medicinal, por apresentarem importantes propriedades farmacológicas, tais como efeitos antibacterianos, antivirais, anti-hipertensivos, antitumorais e bloqueadores dos canais de cálcio (KAPPE, 2000).

Diante disso, foi avaliada se a associação de biossurfactantes com estes compostos sintéticos foi capaz de melhorar suas propriedades antimicrobianas sobre micro-organismos de interesse clínico, além da atividade citotóxica e antiadesiva. Os resultados obtidos serão de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de controle das infecções vaginais podendo abranger o uso destes compostos para diversos outros setores industriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microbiota vaginal

Anatomicamente o trato genital feminino, denominado trato geniturinário, é formado por um conjunto de órgãos como: tubas de falópio, cavidade uterina, endocérvice, vagina, com as funções de micção e reprodução (REID, 1998). Externamente, compreende o períneo e a vulva, onde se encontra a abertura da uretra e vagina. O canal vaginal constitui o habitat de grande número de espécies microbianas, que representam um dos mais importantes mecanismos de defesa do canal vaginal, prevenindo ou reduzindo a possibilidade de infecção geniturinária, incluindo algumas doenças sexualmente transmissíveis (BURTON & REID, 2002; DEMBA et al., 2005; FREDRICKS et al., 2005).

Devido à proximidade com o canal vaginal, o trato gastrointestinal age como um reservatório de micro-organismos para o trato geniturinário (KAPER & SPERANDIO, 2005). No entanto, das mais de 700 espécies microbianas encontradas no intestino, estima-se que apenas 50 destas espécies microbianas são encontradas como parte da microbiota vaginal (REDONDO-LOPEZ et al., 1990; REID, 2001; OAKLEY et al., 2008). Além da influência do trato gastrointestinal, outros fatores desempenham papel relevante na complexidade da microbiota vaginal. Antes da puberdade, quando os níveis de estrogênio estão baixos, a microbiota vaginal é constituída por poucas espécies de micro-organismos, ausência de *Lactobacillus* spp., predomínio de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e bactérias anaeróbias obrigatórias (JAQUIERY et al., 1999). Após a puberdade, além de *Lactobacillus* spp., há um predomínio de bactérias anaeróbias obrigatórias que suplantam o número de bactérias aeróbias na proporção de 10:1, sendo comumente isolados *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Veillonella* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp. e enterobactérias, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Proteus* spp. (LARSEN & MONIF, 2001; MARRAZZO, 2002, ZHOU et al., 2004) além dos micro-organismos aeróbios

como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Candida albicans* (LARSEN & MONIF, 2001; BURTON et al., 2003).

Espécies de *Lactobacillus* constituem os micro-organismos mais frequentemente isolados do trato geniturinário feminino, sendo encontradas em 50 a 90% das mulheres. A prevalência das espécies parece variar de um indivíduo para outro, embora a falta de métodos padronizados de identificação possa explicar parte das variações das populações encontradas por diferentes pesquisadores (ZHONG et al., 1998). As populações de *Lactobacillus* spp. do trato geniturinário exercem seu papel protetor de duas formas gerais: pela competição por sítios de adesão e nutrientes (BALISH & WAGNER, 1998; YOSHIDA et al., 2003; ZHOU, et al., 2004; FREDRICKS, et al., 2005) e pela produção de substâncias como, peróxido de hidrogênio, ácido lático, bacteriocinas e biossurfactantes, que inibem o crescimento de outros micro-organismos.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido por várias espécies de *Lactobacillus* exerce um efeito protetor contra espécies patogênicas, tais como as relacionadas com a VB (vaginose bacteriana) e gonorréia (MARRAZZO et al., 2002; METTS et al.,2003; BRANCO, 2005), devido ao seu efeito oxidativo. A produção de ácido lático mantem o pH vaginal em cerca de 4,5, desfavorecendo o crescimento de grande número de micro-organismos tanto de origem exógena quanto do próprio hospedeiro (BOSKEY et al., 1999; AROUTCHEVA et al., 2001; ETGETON et al., 2011). As bacteriocinas são proteínas de alto peso molecular ou peptídeos, biologicamente ativos, que inibem o crescimento de uma variedade de bactérias por atuar, em sua maioria, na membrana plasmática de espécies de micro-organismos intimamente relacionadas ao micro-organismo produtor (AROUTCHEVA et al., 2001). A proteção exercida pela produção de biossurfactantes se deve à alteração na tensão superficial da mucosa e redução na capacidade de uma vasta gama de patógenos se aderirem a superfícies (VELRAEDS et al., 1998, FRACCHIA et al., 2010) ou ainda por sua ação antimicrobiana prevenindo a propagação de patógenos (ETGETON et al., 2011).

Vários fatores podem desequilibrar a microbiota vaginal, como o estresse, uso prolongado de agentes antimicrobianos, duchas para higiene vaginal, frequente troca de parceiros sexuais, uso de métodos anticoncepcionais como espermicidas, capuz cervical e diafragmas. (HOOTON et al., 1994; GUPTA et al., 2000; EHRSTRÖM et al., 2005; PASCUAL et al., 2006; CARVALHO et al., 2007; ETGETON et al., 2011). Estes fatores podem desencadear o desequilíbrio das comunidades de *Lactobacillus* spp., favorecendo o desenvolvimento de infecções como tricomoníase, blenorragia (SEWANKABO et al., 1997; MARTIN et al., 1999; EDWARDS, 2004; DEMBA et al., 2005), infecções do trato urinário causadas por *Escherichia coli* (NADER-MACIAS et al., 1996; REID, 1999a), vaginoses bacterianas (VB) (VAN KESSEL et al., 2003; WILSON, 2004) e candidíases vaginais (CV) (WYNNE et al., 2004).

2.2 Bactérias lácticas e seu papel na proteção do trato geniturinário

O gênero *Lactobacillus* consiste de um grupo genetica e fisiologicamente diverso de bactérias Gram positivas, em forma de haste, catalase negativa, não esporulados (ABDULLA et al., 2014). Embora a principal espécie identificada inicialmente tem sido *Lactobacillus acidophillus*, outras espécies, como *L. crispatus, L. inners, L. gasseri, L. jensenii, L. gallinarum* e *L. vaginalis* têm sido frequentemente detectadas através de amplificação gênica (PAVLOVA et al., 2002).

Agregados multicelulares de lactobacilos têm mostrado desempenhar um importante papel na colonização das cavidades orais e urogenitais (REID et al., 1990). A capacidade de autoagregação é caracterizada pela agregação de células do mesmo gênero, e a coagregação, envolve células de espécies distintas (KOLENBRANDER, 1988). Agregação celular entre células de *Lactobacillus* parece envolver a interação dos componentes da superfície celular, tais como ácidos lipoteicóico, proteínas e carboidratos, bem como proteínas solúveis (CLEWELL & WEAVER, 1989;. RENIERO et al, 1991). Os estudos sobre o mecanismo de autoagregação em lactobacilos mostraram que as

proteínas presentes no sobrenadante da cultura e as proteínas ou lipoproteínas localizadas na superfície celular estão envolvidas na agregação celular. Além disso, observou-se que os sobrenadantes de cultura de lactobacilos que se autoagregaram, além de promover a agregação de células do mesmo gênero, também promovem a agregação de outras bactérias lácticas e mesmo *E. coli* (SCHACHTSIEK et al., 2004).

Mastromarino e colaboradores (2002), avaliando dez isolados de lactobacilos para uso como probiótico, demonstraram que *Lactobacillus gasseri* 335 e *Lactobacillus salivarius* FV2 foram capazes de coagregar *in vitro* com *Gardnerella vaginalis*. Quando essas linhagens de lactobacilos foram combinadas com *Lactobacillus brevis* CD2 em tablete vaginal, a adesão de *G. vaginalis* à mucosa foi reduzida. Em outro estudo Boris e colaboradores (1998) observaram que as propriedades aderentes de *G. vaginalis* foram igualmente afetadas por *L. acidophilus*.

Noverr e colaboradores (2004) examinaram os efeitos das bactérias produtoras de ácido láctico na morfogênese de *C. albicans*. Sobrenadantes das culturas de *L. rhamnosus* GG foram capazes de inibir a transição da forma leveduriforme de *C. albicans* para a fase filamentosa. Espécies de *Lactobacillus* e *Streptococcus* têm se mostrado capazes de promover o desprendimento de *Enterococcus faecalis* uropatogênicos aderidos a substratos hidrofóbicos ou hidrofílicos em câmara de fluxo paralelo, possivelmente através da produção de biossurfactantes (VELRAEDS et.al*.,* 1996b).

2.2.1 Bactérias lácticas produtoras de biossurfactantes

A produção de compostos inibidores de adesão microbiana por bactérias lácticas, como: biossurfactantes, tem despertado o interesse de vários pesquisadores, a fim de desenvolver novas estratégias de prevenção da colonização microbiana. Estudos têm sido realizados avaliando a ação de biossurfactantes produzidos por *Lactococcus lactis* 53 na inibição da adesão microbiana em próteses de voz

produzidas com borracha de silicone (RODRIGUES et al., 2004 a,b). A adesão celular é favorecida quando a tensão superficial entre o sólido, o micro-organismo e a suspensão líquida é reduzida (KLOTZ, 1990), e também à alteração na hidrofobicidade da superfície, facilitando a adesão (NEU, 1999).

Outros gêneros do grupo de bactérias lácticas mostraram-se produtores de biossurfactantes, como linhagens de *Streptococcus thermophilus* isoladas de placas aquecedoras de pasteurizadores na indústria de laticínios (BUSSCHER et al., 1994). Busscher e colaboradores (1997) determinaram que biossurfactantes produzidos por *S. thermophilus* podem aumentar a vida útil das próteses de voz de borracha de silicone em pacientes laringectomizados inibindo a adesão de diferentes isolados de leveduras. Os resultados obtidos permitiram provar que o consumo de produtos lácticos com bactéria ativa pode prolongar a vida útil dessas próteses. Posteriormente, os mesmos autores (1999) também observaram que a presença de estreptococos influenciou a formação de biofimes de fungos e bactérias em borracha de silicone.

Gan e colaboradores (2002) demonstraram que a linhagem probiótica de *Lactobacillus fermentum* RC-14 e o seu biossurfactante foram capazes de inibir o crescimento e reduzir a aderência de *S. aureus* a implante cirúrgico reduzindo as infecções. Millsap e colaboradores (1996) demonstraram que a adesão dos lactobacilos à borracha de silicone difere de acordo com a linhagem e carga hidrofóbica, e que os componentes do meio podem afetar a habilidade das linhagens de *Lactobacillus* hidrofílicas aderirem ao substrato.

Um estudo conduzido por Mack e colaboradores (1999) com *Lactobacillus plantarum* 299v e *Lactobacillus rhamnosus* GG mostrou que estas linhagens probióticas poderiam inibir adesão de *Escherichia coli* a células epiteliais intestinais pelo estímulo da expressão de mucinas epiteliais. Porém, em outro estudo estas linhagens mostraram também serem produtoras de biossurfactantes (RODRIGUES et al., 2005a). Estas observações sugerem que os biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus* podem estar envolvidos na inibição da adesão

microbiana e consequentemente, na prevenção de infecções (MILLSAP et al., 1996; VELRAEDS et al., 1997) e ainda, que esses compostos têm potencial no revestimento de materiais de implantes com atividade antiadesiva contra patógenos (RODRIGUES et al., 2005c; FRACCHIA et al., 2010).

2.3 Infecções do trato geniturinário

As infecções do trato genital inferior (TGI) representam, historicamente, enfermidades de caráter relevante nos serviços de atendimento ginecológico, não só por sua elevada frequência e multiplicidade de agentes, como também por seu reflexo negativo no aspecto social, emocional e reprodutivo da mulher (CHANG et al., 2003; KUHN et al., 2003).

A complexa população de bactérias anaeróbicas e aeróbicas presente no microambiente vaginal convive em equilíbrio, em meio a células esfoliadas, transudatos e exsudatos, conforme estímulos endógenos baseados nos níveis hormonais e exógenos como, uso de substâncias intravaginais e dispositivo intrauterino (DONDERS et al., 2000). No entanto, Spinillo e colaboradores (1997) apontam que vários outros fatores podem favorecer o desenvolvimento de infecções, como o uso de antibióticos, contraceptivos orais, a presença de *diabetes mellitus*, gravidez, obesidade, uso de roupas justas, absorventes, regiões com clima quente e deficiências imunológicas específicas.

Estes fatores podem levar ao desequilíbrio da microbiota vaginal, resultando na instalação de quadros de vaginites, vaginoses ou cervicites. Entre os principais agentes infecciosos envolvidos nestes processos estão *Trichomonas vaginalis*, *Candida* spp, bactérias anaeróbicas como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp. e *Chlamydia trachomatis,* além de bactérias aeróbicas como *Escherichia coli, Klebsiella spp.* e *Staphylococcus saprophyticus. (*GUIDONI & TOPOROVSKI*,* 2001).

2.3.1 Vaginoses e vaginites bacterianas

A VB (vaginose bacteriana) é caracterizada inicialmente pelo aumento de anaeróbios no fluido vaginal com predomínio de *Gardnerella vaginalis, Prevotella spp., Mobiluncus spp., Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*. Atualmente, técnicas de identificação molecular têm expandido esse espectro microbiológico confirmando a presença de *Atopobium vaginae, Megasphaera* e *Leptotrichia* no fluido vaginal de mulheres com infecções (MARRAZZO et al., 2011).

Vaginoses bacterianas (VB), por serem as mais prevalentes formas de infecção vaginal, podem estar associadas a sérias complicações médicas como aborto espontâneo, ruptura prematura de membrana fetal, corioamnionites, infecção do fluido amniótico, parto prematuro, endometrites e endometrites pós-parto, além de complicações em recém-nascidos (CAUCI et al., 2002). As bactérias causadoras de VB podem ser também isoladas de mulheres não grávidas com endometrites, endometrites pós-aborto, e doenças inflamatórias pélvicas (PID) não associadas à *Chlamydia* e *Neisseria* (KOUMANS et al., 2002). A prevalência de vaginoses bacterianas varia de acordo com etnia, sendo 2,4 vezes maior em mulheres africanas em relação às europeias (MENDLING et al., 2013).

Vaginoses bacterianas sintomáticas, que acontecem em 60% de todos os casos, tipicamente causam corrimento vaginal anormal e mal cheiroso. Este corrimento resulta da degradação do gel de mucina vaginal normal, formado por enzimas produzidas por bactérias associadas às vaginoses bacterianas, particularmente anaeróbios Gram negativos (OLMSTED, 2003). O odor, usualmente conhecido como cheiro de peixe, é derivado da volatilização de aminas produzidas pelo metabolismo destas bactérias anaeróbias. O aumento na população de anaeróbios é acompanhado pelo aumento na produção de sialidase, glicosidase, aminas voláteis e o perfil de citocinas característico incluindo níveis elevados de interleucina 1β e interleucina 10, e reduzidos níveis de interleucina 8 e SLPI (protease secretora de leucócitos) (NUGENT et al., 1991; OLMSTED, 2003).

Acredita-se que o proeminente fator para desenvolvimento das VB seja a formação de um biofilme polimicrobiano aderente ao epitélio vaginal. O biofilme consiste de *G. vaginallis* e *A. vaginae*, mas lactobacilos podem estar presentes em menor quantidade (MEDLING et al. 2014, SWIDSINSKI, et al., 2008 a). Biofilmes bacterianos são típicos de infecções associadas ao uso de cateteres por períodos longos, implantes e doenças crônicas. Esses biofilmes têm sido detectados também em células epiteliais presentes na urina de mulheres com VB e de seus parceiros sexuais (SWIDSINSKI, et al., 2010 a,b,c).

As vaginites aeróbicas (VA), termo proposto por Donders e colaboradores em 2002, define uma patologia que não é classificada como vaginite especificamente, nem como vaginose bacteriana. Estas VA são consideradas como uma condição anormal da microbiota vaginal que difere das VB. Apresentam sintomas como: inflamação vermelha, corrimento amarelo, dispareunia vaginal (dor durante ato sexual). Em contraste com VB, VA produz uma resposta imune do hospedeiro que leva à produção elevada de interleucina-6 e interleucina-1 no fluido vaginal (IMSEIS et al., 1997; DONDERS et al., 2002).

Do ponto de vista microbiológico, a vaginite aeróbica difere da vaginose bacteriana por não ocorrer aumento no número de micro-organismos anaeróbicos e sim pela presença de bactérias aeróbicas do reservatório retal, especialmente *Escherichia coli*, seguido dos demais Gram negativos *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas spp.* e ainda cocos Gram positivos, como *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae* (SATO et al., 2005). Esta vaginite é resultado da alteração da homeostase e o consequente aumento da colonização por bactérias entéricas (AMSEL, 1983; SOBEL, 1997). Para Guidoni e Toporovski (2001), as bactérias uropatogênicas, alojam-se principalmente no intestino grosso, migrando e colonizando inicialmente a genitália externa e a região periuretral, podendo inclusive ascender às vias urinárias estéreis e causar infecções do trato urinário.

As causas para a ocorrência destas infecções são provavelmente múltiplas. Um aumento no pH vaginal de 3.5 a 4.5 para 7.0 ou mais, pode ser observado, o que reduz o efeito inibitório do peróxido de hidrogênio, favorecendo o crescimento de anaeróbios. Mudanças hormonais e inoculação através de parceiros sexuais também são observadas (MEEUWIS et al., 2010). O critério de diagnóstico e escolha terapêutica para estas patologias tem sido bem estudado pela comunidade científica e se faz necessário a fim de utilizar a terapia eficaz para cada grupo de micro-organismos (MEEUWIS et al., 2010).

2.3.2 Candidíase vaginal

A candidíase vaginal (CV) é uma doença causada por leveduras do gênero *Candida*, que habitam o trato gastrointestinal e geniturinário da espécie humana. Estas leveduras possuem distribuição universal, podendo ser encontradas associadas ao hospedeiro, como comensais ou patógenos, no solo, na água, nos vegetais, nos alimentos e em ambientes hospitalares (BARNETT et al., 1983; PAULA et al., 1983; PFALLER, 1987; ODDS, 1988; LACAZ et al., 1991). Como patógenos, podem colonizar o trato intestinal, oral, vaginal, respiratório, urinário e o sangue. A maioria dos indivíduos desenvolve defesas imunológicas que impedem a proliferação e desenvolvimento de candidíase (GLEHN & RODRIGUES, 2012). Contudo, em um paciente imunocomprometido, esta levedura pode causar sérias infecções nas mucosas, que incluem candidíases vaginais e orais ou ainda infecções sistêmicas (O'SULLIVAN et al., 2000). O problema em se determinar a diversidade deste grupo de leveduras em cada nicho corporal reside no fato da maioria dos resultados dos diferentes estudos não serem comparáveis, pois incluem diversos grupos populacionais e grande variação das técnicas usadas para coleta de amostras, isolamento e identificação das leveduras (OLIVEIRA & SOARES, 2007).

Sendo a segunda principal causa de vaginite em mulheres em idade reprodutiva, a CV acomete milhões de mulheres anualmente em todo o mundo (SOBEL & CHAIM, 1996; SINGH et al., 2002, SOBEL, 2007), especialmente aquelas que

vivem nos climas tropicais ou subtropicais. Alguns especialistas estimam que aproximadamente 75 % das mulheres irão experimentar pelo menos um caso de CV durante sua vida, sendo que, 45% destas, apresentarão mais de um episódio, sendo 5 % infecções reincidentes (CONSOLARO et al., 2004; SOBEL, 2007; LOPEZ-MARTINEZ, 2010). Cerca de 80% a 90% dos casos estão relacionados à *C. albicans* e o restante a outras espécies não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. tropicalis, C. krusei* e *C. parapsilosis* (HOLLAND et al., 2003; GAZETA JÚNIOR et al., 2011).

Os fatores de risco que predispõem às infecções por *Candida* spp. incluem o uso de antibióticos de largo espectro, que suprimem a microbiota, uso de fármacos para tratamentos antitumoral, imunossupressão seguida de um transplante de órgãos, procedimentos cirúrgicos resultantes de tratamentos hospitalares intensivos e prolongados, hemodiálise e diálise interperitoneal em doentes imunocomprometidos (MERZ, 1990). Estas infecções podem também estar associadas à utilização de dispositivos médicos tais como implantes, cateteres vasculares, próteses dentárias, lentes de contato, enxertos cardíacos, articulações artificiais, discos intervertebrais (BAILLIE & DOUGLAS, 1998; CHANDRA et al., 2001; BRAJTBURG & BOLARD, 2003; YANG et al., 2003); distúrbios endócrinos, gravidez, deficiência de ferro, xerostomia e desordens imunológicas (SAMARANAYAKE & MARCFARLANE, 1982). Candidíase disseminada tem sido verificada em pacientes com a mucosa gastrointestinal alterada resultante de danos induzidos pelo uso de drogas ou tumor (MORAIS et al., 2012).

A CV causa grande desconforto para a paciente, decorrente do aparecimento dos sintomas como: prurido intenso, ardor, eritema, fissuras na pele, disúria (dor, ardor ou sensação de queimação ao urinar), dispareunia (dor durante o ato sexual) e corrimento consistente, semelhante a “leite talhado” (ECKERT et al., 1998; COCO & VANDENBOSCHE, 2000; NYIRJESY, 2001). A candidíase vaginal não é tradicionalmente considerada uma doença sexualmente transmissível, pois ocorre em mulheres em abstinência, além de a levedura

constitui parte da microbiota indígena vaginal. No entanto, isso não significa que a transmissão sexual de *Candida* spp. não ocorra (SOBEL, 1997; LISBOA, 2011).

Na maioria dos pacientes, a infecção por *C. albicans* é decorrente principalmente do reservatório endógeno (DELGADO & AGUIRRE, 1997). Sua virulência está condicionada a fatores ligados ao hospedeiro e ao micro-organismo. A microbiota vaginal controla a infecção por *Candida*, afetando a colonização por competições nutritivas e produção de substâncias tóxicas, além de interferir na aderência das leveduras às células epiteliais, o que constitui pré-requisito de transformação da levedura de colonizadora a agente patogênico (KLOTZ & SMITH, 1991; GREENFIELD, 1992; DELGADO & AGUIRRE, 1997). O equilíbrio parasita-hospedeiro pode ser mantido pela preservação das barreiras anatômicas teciduais, pela conservação da microbiota autóctone e pela resposta do sistema imune. A candidíase emerge diante de modificações desta interação, determinando infecção desde localizada até sistêmica ou fatal (ODDS, 1988; SOUZA, 1988; SOUZA et al., 1990).

Diversos autores têm descrito os determinantes de patogenicidade para o gênero *Candida* como aderência às células epiteliais do hospedeiro, a variabilidade fenotípica, a composição de sua parede celular com a presença de adesinas (manoproteínas), produção de enzimas como proteases, fosfolipases, hialuronidase e condroitina sulfatase, capazes de hidrolisar constituintes importantes da membrana citoplasmática da célula hospedeira e ainda, o dimorfismo (formação de hifas) (GHANNOUM & ABU-ELTEEN, 1990; DOROCKA-BOBKOWSKA et al., 2003; EGGIMANN et al., 2003; SUDBERY et al., 2004; MENEZES et al., 2005; SHIP et al., 2007).

A variabilidade fenotípica contribui como um fator importante, pois diminui a capacidade de fagocitose de células do sistema imune, sendo que a forma de micélio proporciona uma maior aderência à superfície da célula (GHANNOUM & ABU-ELTEEN, 1990). Algumas espécies, como *C. albicans*, produzem brotos

que não se separam uns dos outros; estes brotos formam uma cadeia de células chamada de pseudo-hifa, forma esta necessária para invadir tecidos mais profundos nos quadros de infecção (MOLERO et al., 1998).

2.4 Adesão e formação de biofilme

Para muitos micro-organismos, a adesão aos tecidos do hospedeiro é essencial para a patogênese e as características microbianas responsáveis por esta adesão às superfícies das mucosas são consideradas atributos da virulência (CASADEVALL & PIROFSKI, 2001). O fenômeno de adesão é conferido a proteínas especializadas de superfície celular chamadas de adesinas que se ligam especificamente a aminoácidos ou açúcares na superfície de outras células ou promovem a adesão a superfícies abióticas. Todas as adesinas fúngicas compartilham três domínios estruturais, que são: domínio C-terminal que contém a âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) responsável pela ligação da adesina à parede celular, a porção N-terminal que contém o carboidrato ou peptídeo de ligação, e o domínio central caracterizado pela presença de múltiplas repetições de serina e treonina, codificados por uma sequência conservada do DNA (VERSTREPEN & KLIS, 2006).

O processo de adesão de espécies de *Candida* às superfícies do hospedeiro é controlado e induzido por várias cascatas de sinalização celular tanto no fungo como também no ambiente, em prol de sua virulência. Drago e colaboradores (2000) observaram que células epiteliais orais promoviam a endocitose de *C. albicans*. Mais tarde, Park e colaboradores (2005) corroboraram este achado ao demonstrarem que o acúmulo de actina na célula epitelial ao redor da hifa internalizada sugeriria a endocitose do fungo por estas células. Assim, concluíram que após a adesão, *C. albicans* invade o epitélio oral *in vitro* através da indução da sua própria endocitose pelas células do hospedeiro.

A superfície celular bacteriana exerce importante função no estágio inicial de adesão das células. As condições de crescimento afetam o sistema de síntese da

parede que, por sua vez, afetam os polímeros aniônicos e as enzimas presentes na parede do micro-organismo. Características da superfície dependem do pH da cultura e do estado energizado da membrana. Mudanças nas propriedades de superfície induzidas por diferentes valores de pH do ambiente de crescimento podem explicar aumento na adesão à superfície (LIU et al., 2008) A adesão de diferentes estirpes de bactérias é também influenciada pelas propriedades físico-químicas e termodinâmicas do substrato envolvido, baseado nas análises das características da superfície em termos de carga elétrica e hidrofobicidade (JULLIEN et al., 2002; JURAK et al., 2009).

Por sua vez, adesão microbiana a superfícies inanimadas, como próteses, equipamentos metálicos e cateteres é mediada pela interação específica entre as estruturas da superfície celular e grupos moleculares específicos na superfície do substrato (CHRISTENSEN et al., 1989) ou por forças de interação não-específica, incluindo forças de Van der Walls, forças eletrostáticas, interações ácido-bases e forças de moção Browniana (VAN OSS, 1991). As interações específicas são forças que agem em regiões mais altas da superfície que interage sob distâncias menores que 5nm, enquanto forças de interações não-específicas tem um caráter de longo alcance e partem de toda a superfície (GOTTENBOS et al., 2002). Ao aproximar de uma superfície, organismos podem ser atraídos ou repelidos pela superfície, dependendo do resultado da interação das diferentes forças não-específicas (OLIVEIRA, 1992; REID, 1999b).

Em se tratando de dispositivos médicos, após a sua exposição aos fluidos corporais, tais como: sangue, saliva ou urina, componentes macromoleculares adsorvem para formar um filme condicionante (GRISTINA, 1987; REID et al. 1992). Moléculas proteináceas, tais como albumina sérica, fibrinogênio, colágeno e fibronectina presentes na superfície, têm mostrado afetar adesão bacteriana subsequente (KEOGH & EAFON, 1954; AN & FRIEDMAN, 1988; CHRISTENSEN et al., 1989). Se for possível enfraquecer ou quebrar esta ligação, por exemplo, pela influência de forças de interações ou usando

surfactantes (VELRAEDS et al., 1996; RODRIGUES et al. 2004 a,b), a formação do biofilme não se completa.

Para os micro-organismos o biofilme confere de 500 até 1000 vezes mais resistência às células sésseis quando comparadas às células planctônicas, pela presença da matriz de exopolissacarídeo que restringe a penetração dos medicamentos impedindo a ação de antimicrobianos (GILBERT et al., 2002). Células em biofilme podem também apresentar muitas alterações fenotípicas, principalmente nos aparatos de motilidade, no tamanho da célula e no metabolismo, decorrentes da restrição de nutrientes e de oxigênio em algumas fases, da variação na taxa de reprodução e em toda a regulação gênica (XAVIER et al., 2005). Biofilmes são as únicas estruturas microbianas que permitem a coexistência de organismos aeróbios e anaeróbios estritos a distâncias de poucas centenas de micrômetros um do outro. São compostos por microcanais internos, úteis na distribuição de nutrientes e água, no escoamento de metabólitos e de enzimas alginatoliases e proteases, necessárias ao destacamento de células do biofilme e na distribuição de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (HALL-STOODLEY et al., 2004).

O desprendimento de partes de um biofilme pode ocorrer com o aumento do número de organismos aderidos. A razão de crescimento diminui devido a limitações de nutrientes e oxigênio, e ainda pelo acúmulo de ácidos orgânicos. Isto pode levar eventualmente a um biofilme de biomassa estacionária, onde a adesão e crescimento contrabalançam o desprendimento de micro-organismos. Esta etapa é regulada pelo fenômeno *quorum sensing*, onde o acúmulo de moléculas de baixo peso molecular permite que células individuais sintam, quando o *quorum* mínimo de população ou unidade de bactérias foi atingido (RODRIGUES, 2005a).

2.5 Agentes antimicrobianos

2.5.1 Agentes antifúngicos

Os agentes antifúngicos usados no tratamento de micoses são classificados de acordo com o tipo de ação que exercem sobre as células dos fungos. Nas classes mais comumente utilizadas encontram-se, os poliênicos; análogos nucleosídeos, azóis, pneumocandinas-equinocandinas, pradimicinas-benanomicinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos (ANDRIOLE, 1999). As drogas antifúngicas de uso comum atuam sobre a molécula do ergosterol, o principal esterol da célula fúngica, importante para integridade e manutenção das funções da membrana celular. Este esterol possui funções semelhantes ao colesterol em células de mamíferos (VANDEN BOSSCHE *et al*., 1987; JOSEPH-HORNE & HOLLOMON, 1997; WHITE et al. 1998).

Os poliênicos como, anfotericina B e nistatina, formam complexos com o ergosterol desnaturando a membrana plasmática, o que leva ao aumento da permeabilidade, levando à morte da célula. Estes compostos são classificados como fungicidas e tem um largo espectro de ação, sendo considerado, dentre os antifúngicos disponíveis no mercado o de maior espectro de ação. Usados desde 1956, ainda são considerados como padrão no tratamento da maioria das infecções invasivas causadas por leveduras, considerado como escolha para o tratamento de infecções muito graves, associado a 5-fluorocitosina (análogo nucleosídeo) (ESPINEL-INGROFF 1998; BOFF et al., 2008). A grande desvantagem dos antifúngicos deste grupo é o fato de não serem solúveis em água. Por exemplo, a anfotericina é associada a um detergente deoxilato em tampão fosfato, o qual provoca muitos efeitos secundários indesejáveis ao paciente; devido a essa alta toxicidade, seu uso é restrito ao ambiente hospitalar (BRAJTBURG & BOLARD, 2003). Para combater estes efeitos têm sido desenvolvidas novas formulações com atividades antifúngicas. Um exemplo são as associações lipídicas, onde o antifúngico é contido dentro de lipossomas em maiores quantidades, liberando doses com menor toxicidade para as células humanas (GHANNOUM & RICE, 1999).

Os azóis (ex. miconazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol) inibem a biossíntese do ergosterol, por interferir no citocromo P-450 da levedura, consequentemente inibindo a enzima lanosterol desmetilase e a incorporação do acetato de ergosterol (RICHARDSON & WARNOCK, 1993). Estes compostos sintéticos ainda são usados como uma alternativa ao uso da anfotericina B, uma vez que apresentam uma menor toxicidade, além de exibirem amplo espectro de ação e melhores propriedades farmacocinéticas (LYMAN e WALSH, 1992). Muitas revisões têm enfocado a resistência de *Candida* spp. aos azólicos e a maioria tem colocado o fluconazol em primeiro lugar por ser esta a droga mais extensamente usada. Isolados de *Candida* spp*.* resistente aos azólicos têm sido mais encontradas em pacientes com SIDA devido à dificuldade de tratamento clínico nesta população de pacientes, uma vez que são imunocomprometidos e têm uma microbiota deficitária (MAHMOUD & RICE, 1999).

As pneumocandinas-equinocandinas (lipopeptídicos cíclicos) são fungicidas. Atuam comprometendo a síntese da parede celular através da inibição não competitiva da 1,3-β-D-glucanosintetase que catalisa a polimerização da glicose-uridina-fosfato (UDP) em β-1-3 glicana, um componente estrutural importante da parede celular (ZAAS, 2008). As pradimicinas-benanomicinas**,** compostos fungicidas, ligam-se às manoproteínas da parede celular provocando lise osmótica desta parede, e consequente liberação dos componentes celulares, em particular do potássio, acabando por conduzir à morte das células (CARRILLO-MUÑOZ, 2006). As nicomicinas são inibidores competitivos das enzimas celulares que sintetizam a quitina, enzimas fundamentais na síntese da parede celular (ANDRIOLE, 1999).

As alilaminas (ex.: terbinafina) e tiocarbamatos**,** fungicidas sintéticos, inibem a esqualenoepoxidase, uma enzima que juntamente com a ciclenociclase converte o esqualeno em lanosterol que por sua vez é convertido em ergosterol. Sem este componente estrutural a função e estrutrura da parede celular é afetada levando assim à morte celular (ANDRIOLE, 1999). A terbinafina é altamente eficaz contra dermatófitos e outros fungos filamentosos (JESSUP et al., 2000).

2.5.2 Agentes antibacterianos

Como terapia para as doenças ginecológicas bacterianas, vários antibióticos são usados por via intravaginal. O metronidazol, um antiprotozoário da classe dos nitroimidazóis tem atividade antimicrobiana contra bactérias anaeróbicas (VB). A clindamicina, uma lincosamina, tem um espectro de ação sobre bactérias Gram positivas, como *S. agalactiae* (SWEDBERG et al., 1985, CHARTERIS et al., 1998). Aminoglicosídeos e tetraciclinas têm sido usados para tratar tais infecções, estes antibióticos possuem várias propriedades desejáveis, como a rápida atividade bactericida contra um grande número de patógenos, especialmente bactérias Gram-negativas, baixo custo e estabilidade química (HILLIER et al., 2008).

Tem sido observado que os antibacterianos com amplo espectro de ação contra a maioria dos anaeróbios são efetivos contra VB, porém a maioria das mulheres com VB apresentam recorrência nos meses seguintes ao tratamento. Estudos têm reportado que metronidazol e clindamicina resolvem 71 a 89 % dos casos no primeiro mês, porém a terapia intravaginal com metronidazol, com menos efeitos colaterais, tem eficácia similar à administrada via oral (HILLIER et al., 2008), podendo ser administrada como alternativa para suprimir a recorrência rápida (30 % em três meses, 50 % em seis meses) (SOBEL et al., 2006).

A escolha terapêutica para vaginites aeróbicas deve levar em consideração características do antibiótico como: efeito bactericida contra a maioria das bactérias de origem fecal, sem interferência com o ecossistema vaginal, em particular, a população de lactobacilos. Para aumentar a segurança e conformidade, procura-se usar uma formulação tópica com capacidade de absorção baixa, mantendo uma concentração farmacêutica correta *in situ* (DONDERS et al., 2002).

2.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Vários estudos de susceptibilidade a antibióticos têm sido realizados visando à descoberta de novas drogas e definição de novas terapias para o combate das infecções causadas por micro-organismos patogênicos (REX et al., 2001). Os métodos utilizados na execução dos testes de suscetibilidade para fungos têm sido adaptações daqueles empregados para bactérias (CHEN et al., 1996; VANDEN BOSSCHE et al., 1998; WHITE et al., 1998; GHANNOUM & RICE, 1999; REX et al., 2001). As técnicas disponíveis baseiam-se na diluição em caldo, diluição em ágar e difusão em ágar. Os dois primeiros testes avaliam a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento microbiano, ou ainda a concentração fungicida mínima (CFM) ou concentração bactericida mínima (CBM) que é a menor concentração da droga capaz de matar o micro-organismo (MERZ, 1986; CURY & MICHEL, 1989a; CURY et al., 1989b; ALVES & CURY, 1992; ESPINEL-INGROFF et al., 1992; PFALLER et al., 1992). O teste de difusão em ágar utiliza discos que contêm uma concentração única da droga, classificando o micro-organismo em susceptível, intermediário ou resistente àquela droga, de acordo, com a capacidade de inibição do crescimento microbiano (REX et al., 1993). Estes estudos têm permitido caracterizar o perfil de resistência e susceptibilidade dos micro-organismos patogênicos aos antimicrobianos de uso clínico. Os resultados sugerem a necessidade de estudos de prospecção de novas drogas, formulações de menor efeito colateral e novas estratégias de tratamento antimicrobiano. Diante da necessidade da descoberta de novas drogas, a pesquisa por novos agentes antimicrobianos vem se intensificando, como é o caso das moléculas anfipáticas com aplicações diversificadas na indústria e biorremediação.

2.6 Biossurfactantes: conceitos e aplicações

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas, particionando, entre as interfaces óleo e água ou ar e água, o que explica seu ampla aplicação ambiental (BANAT, 1995 a,b; MULLIGAN, 2005; TAHMOURESPOUR et al., 2011). Para todos os sistemas interfaciais, sabe-se

que moléculas orgânicas de fases aquosas tendem a imobilizar-se na interface sólida, formando um filme conhecido como filme condicionante, o qual muda as propriedades (umidade e energia de superfície) da superfície original (NEU, 1996). Em uma analogia com o filme condicionante orgânico, biossurfactantes podem interagir com as interfaces e podem afetar a adesão e desligamento da bactéria. Além disso, as propriedades de superfície do substrato podem determinar a composição e orientação das moléculas condicionando a superfície durante as primeiras horas de exposição. Após cerca de quatro horas, pode-se obter uma uniformidade nessas propriedades e a composição do material adsorvido torna-se independente do substrato (NEU & MARSHALL, 1990). Micro-organismos podem excretar ácidos graxos, lipídeos e biossurfactantes dentro do meio circundante. Uma célula microbiana capaz de excretar biossurfactantes dentro da fase aquosa pode ser responsável pelo filme condicionante criado microbiologicamente na interface, alterando a interface de hidrofóbica para hidrofílica (RODRIGUES, 2005c; OLTEANU et al., 2011).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química e origem microbiana (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). As principais classes incluem uma grande variedade de estruturas, como glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos de polissacarídeos ou proteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros. É, portanto, razoável esperar diversas propriedades e atividades fisiológicas para diferentes grupos de biossurfactantes. Também estas moléculas podem ser produzidas para atender a diferentes aplicações específicas, alterando o substrato de crescimento ou condições de crescimento (FLECHTER, 1992; MULLIGAN, 2009). Os biossurfactantes podem exercer um papel essencial na sobrevivência dos micro-organismos produtores, quer facilitando o transporte de nutrientes, a interação entre o hospedeiro e os micro-organismos produtor ou mesmo como agente biocida contra outros micro-organismos presentes no ambiente.

Biossurfactantes têm se tornado produtos biotecnológicos importantes para aplicações médicas e industriais (BANNAT et al., 2010). As razões para sua

popularidade como produto antimicrobiano estão primeiramente em sua ação específica, baixa toxicidade, facilidade relativa de preparação e aplicabilidade generalizada. Vários estudos relativos às aplicações, métodos de produção e caracterização dos biossurfactantes estão descritos na literatura, onde estas moléculas mostram-se como agentes emulsificantes, desemulsificantes, agentes umidificantes, agentes espumantes, ingredientes de alimentos funcionais e detergentes (FLECHTER, 1992; KOSARIC, 1992; LIN, 1996; MULLIGAN, 2009, SMYTH et al., 2010).

Embora a exata função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções têm sido atribuídas a estes compostos. Estas propriedades são: emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água e transporte de hidrocarbonetos para o interior da célula, facilitando o crescimento de micro-organismos, ligação de metais pesados e formação de biofilmes (COOPER et al., 1981; SINGH e CAMEOTRA, 2004). Esta última função foi atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *C. tropicalis* (KAPPELI & FLECHTER, 1997), onde um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando o micro-organismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido-graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos. Outra função importante seria a aderência-liberação da célula a superfícies. Uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos micro-organismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. O elemento chave nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsáveis pela aderência das células a superfícies. Nestas, os micro-organismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos ambientes com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG & RON, 1999; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

Atualmente, nos países industrializados, 70 a 75 % dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, no entanto, existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais (BOGNOLO, 1999). Esta tendência é movida pela necessidade de produtos menos tóxicos, pela necessidade de substituição de compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados) e pelo aumento da especificidade dos produtos (BARROS et al., 2008).

Embora a maior aplicação dos biossurfactantes tem sido na recuperação de petróleo (BANNAT et al., 2000), alguns estudos têm sido direcionados para suas possíveis aplicações biomédicas (FLASZ et al., 1998; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; BENINCASA et al., 2004, RODRIGUES et al., 2006). Alguns biossurfactantes são alternativas viáveis para os agentes medicinais e antimicrobianos sintéticos, e podem ser usados como agentes terapêuticos efetivos e seguros. Por apresentar diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podem ser utilizados em uma gama de aplicações industriais. (BANNAT et al., 2010). Entretanto, ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis e de baixo custo. Uma possível alternativa seria o uso de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial. Com o aumento dos esforços no desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação, no melhoramento das linhagens e dos processos de produção, e devido à sua versatilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, os biossurfactantes poderão se tornar compostos de uso comum nas indústrias em um futuro próximo (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Pesquisas sobre o uso de biossurfactantes como novos métodos para impedir ou retardar a formação de biofilme sobre dispositivos médicos têm sido realizadas e destacam o papel dos biossurfactantes como defesa na competição pela adesão com outros isolados ou espécies, principalmente biossurfactantes liberados por

linhagens de *Streptococcus mitis* contra adesão de *Streptococcus mutans* (PRATT-TERSPSTRA et al*.,* 1989; VAN HOOGMOED et al*.,* 2000). Assim o tratamento de superfícies com biossurfactantes pode constituir um novo e efetivo meio de combate à colonização por micro-organismos patogênicos (SINGH e CAMEOTRA, 2004). Pré-revestimento dos cateteres uretrais com surfactina, biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, resultou em uma diminuição da quantidade de biofilme formado por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (MIRELES et al., 2001). Outro estudo relatou a inibição de biofilme formado por uropatógenos e leveduras em borracha de silicone por biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus acidophilus* (VELRAEDS et al., 1998; REID et al., 2000; FRACCHIA et al., 2010).

A atividade antibiótica é demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos (surfactina) e glicopeptídeos (ramnolipideos). Os ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* e a surfactina de *Bacillus subtilis* funcionam como antibióticos, alterando a integridade da membrana celular microbiana, por solubilizar os principais componentes, formando poros na membrana. Podem também penetrar nas membranas através de interações hidrofóbicas, influenciando a ordem da cadeia de hidrocarbonetos e alterando assim, a espessura da membrana (BONMATIN et al., 2003; CARRILLO et al., 2003, DELEU et al., 2008). Além da atividade antimicrobiana, a surfactina possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; e atividade antitumoral (ARIMA et al., 1968; PEYPOUX et al., 1999). Outros estudos têm mostrado biossurfactantes produzidos por *Rhodococcus erythropolis* com ação antiviral contra herpes simples e vírus parainfluenza (UCHIDA et al., 1989)**.** Iturina, um lipopeptídeo produzido também por *B. subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (THIMON et al., 1995).

Os efeitos antivirais e antibacterianos de vários ramnolipídeos têm sido estudados por Bal e colaboradores (1997) e Benincasa e colaboradores (2004).

Sete diferentes ramnolipídeos foram identificados em amostras de *P.aeruginosa* AT10 isoladas de resíduos de refinarias de óleo de soja e mostraram excelentes propriedades antifúngicas (ABALOS et al., 2001). Golubev e colaboradores (2001) relataram a produção de glicolipídeos, termoestáveis, fungicidas, resistentes a protease, extracelulares, de baixo peso molecular, pela levedura *Pseudozyma fusiformata* (Ustilaginales). Estes fungicidas foram ativos contra mais de 80 % das leveduras do gênero *Candida* e outras espécies não leveduriformes testadas em condições acídicas (pH 4,0) de 20 a 30 ºC (KULAKOVSKAUA et al., 2003). Outro estudo mostra que ramnolipídeos aumentaram a ação biocida de hipoclorito de sódio, ácido peracético e peróxido de hidrogênio em superfícies contaminadas com *Listeria monocytogenes* (MEYLHEUC et al., 2006).

Vários estudos têm demonstrado que a associação de biossurfactantes a antibióticos e biocidas pode prevenir a formação de biofilme, desta forma tornando-se como uma alternativa no tratamento de infecções por micro-organismos resistentes a múltiplas drogas (ESPOSITO & LEONE, 2007). Deste ponto de vista, os biossurfactantes podem ser úteis para aumentar a ação de conhecidos antibióticos e biocidas. Rivardo e colaboradores (2010) mostraram que a associação entre íons de prata e biossurfactante lipopeptídeo aumentou o efeito bactericida contra *E. coli* em biofilme, chegando à completa erradicação do biofilme. Acredita-se que a ação sinérgica dos biossurfactantes reside na sua capacidade de interação com as membranas celulares, formando poros, o que facilitaria a entrada de antimicrobianos e assim, aumentando a atividade destes agentes (TEXTER, et al., 2007).

2.7 Sinergismo entre os agentes microbianos

O advento dos antimicrobianos para tratar infecções é considerado como um dos maiores avanços na medicina moderna (ROSSOLINI & THALLER, 2010). Devido ao abuso no uso de antibióticos nas décadas passadas, as maiorias dos micro-organismos clinicamente importantes desenvolveram resistência a múltiplos

antimicrobianos. Tais infecções são severas, difíceis e requerem longos e complexos sistemas de tratamento (ALANIS, 2005, ZARB & GOSSEENS , 2012). Com isso, se faz necessário descobrir novos antibióticos ou estratégias de tratamento efetivas contra infecções por micro-organismos resistentes às drogas (AIYEGORO et al., 2011).

Novos métodos combinando diferentes antimicrobianos que vise aumentar sua eficácia têm sido explorados (HARRISON et al., 2008), como o uso combinado de compostos bioativos que pode resultar em sinergismo, antagonismo ou efeito indiferente (aditivo), em função de diversos fatores. Nies e Spielberg (1996) descreveram que o sinergismo é uma resposta farmacológica obtida a partir da associação de dois ou mais medicamentos, cuja resultante é maior do que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles. Por outro lado, o antagonismo é a supressão ou redução da resposta farmacológica de um medicamento na presença de outro, muitas vezes pela competição destes pelo mesmo sítio receptor. Partindo daí, o interesse deste estudo em se testar novos compostos de origem biológica, como os biossurfactantes, em associação com os compostos de origem sintética, com ação antimicrobiana com menor custo, menor toxicidade e que diminua as recidivas nestas infecções.

2.8 Compostos de Biginelli

A reação de Biginelli foi descoberta em 1893, pelo químico italiano Pietro Biginelli e baseia-se na reação multicomponente (MRC) envolvendo a ciclocondensação de ésteres acetoacéticos, aldeídos aromáticos e (tio) uréia (Figura 1).

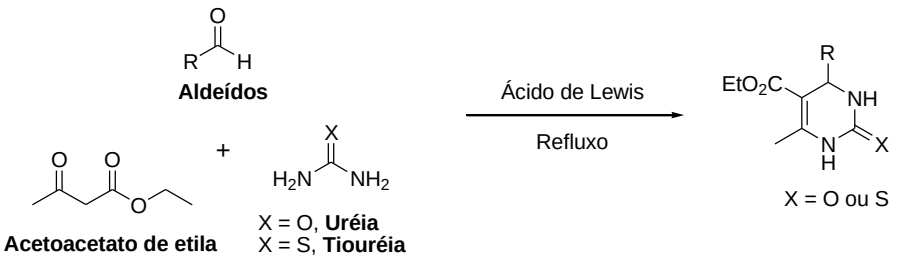
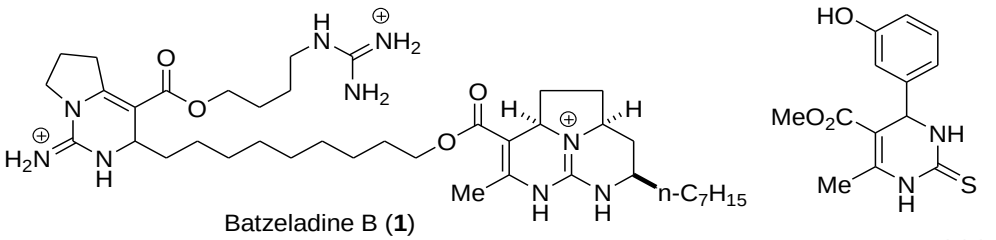


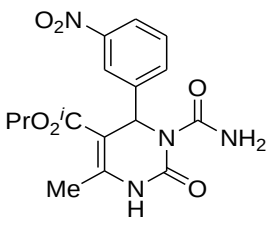
Figura 1: Esquema geral da reação de Biginelli. Os produtos da reação de Biginelli possuem um núcleo básico diidropirimidona (DHPM).

O interesse na reação de Biginelli aumentou dramaticamente nas últimas décadas, uma vez que os compostos possuindo o núcleo básico diidropirimidona (DHPM) têm apresentado atividades biológicas promissoras. O composto batzeladina B (**1**) (Figura 2), um produto natural marinho isolado da esponja *Batzella* sp., foi capaz de inibir a ligação do HIV ao envelope proteico gp-120 de células humanas CD4 (PATIL *et al*., 1995). Monastrol (**2**) (Figura 2) foi identificado como uma nova molécula de baixo peso molecular permeável à membrana celular, sendo desta forma considerada uma molécula promissora para desenvolvimento de novas drogas antitumorais (MAYER *et al.*, 1999). Este composto afeta especificamente a divisão celular (mitose) por um novo mecanismo, que não implica na ligação à tubulina em contraste com taxanos naturais, alcaloides da vinca e epotilonas. Foi estabelecido que a atividade de monastrol baseia-se na inibição específica e reversível da proteína Eg5, uma proteína motora necessária para a formação do eixo bipolar durante a mitose (HEALD, 2000; SAKOWICZ et al., 2004; BRIER et al., 2004; COCHRAN et al., 2005; PETERS et al., 2006). Os compostos SQ 32926 (**3**) e SQ 32547 (**4**) (Figura 2) apresentaram promissoras propriedades anti-hipertensivas (ATWAL, 1991; ROVNYAK, 1992).

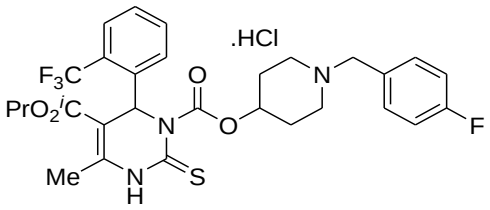


Batzeladine B (**1**)
(Anti-HIV)

Monastrol (**2**)
(Anticancer)



SQ 32926 (**3**)
(Anti-hipertensiva)



SQ 32547 (**4**)
(Anti-hipertensiva)

Figura 2: Compostos de Biginelli que apresentam importantes atividades biológicas

Em estudo realizado por Ladani e colaboradores (2009), utilizando HCl concentrado como catalisador, foi avaliada a atividade antimicrobiana *in vitro* de 20 compostos sintetizados (2 a-d e 5 a-p) contra culturas de três bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa), *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (Gram-positivas) e ainda dois fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae* pelo método da difusão em disco. Destes compostos, nove mostraram boa atividade antifúngica contra *Rhizopus oryzae*, enquanto, sete mostraram atividade antifúngica moderada contra *Rhizopus oryzae* e um contra *Aspergillus niger*. A avaliação antibacteriana dos compostos sintetizados revelou também que dentre todos os compostos, apenas um mostrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus.*

Compostos diidropirimidonas sintetizados usando cloreto cúprico como catalisador, foram avaliados quanto à atividade antifúngica e apresentaram resultados de inibição do crescimento de *Trichoderma hammatum*, *Trichoderma koningii* e *Aspergillus niger in vitro* concentrações (CIM) de 0,025 a 0,35 $\mu g.mL^{-1}$ (SINGH et al., 2008).

2.9 Compostos benzazóis

Os benzazóis são compostos heterocíclicos que apresentam um anel benzênico condensado a um anel azólico onde o radical X é composto por um heteroátomo que determina o tipo de benzazol, assim podemos ter benzoimidazóis (X=NH) e benzotiazóis (X=S) (Figura 3). Os heterocíclicos tem uma importância crucial em muitos processos biológicos, pois são constituintes de estrutura química de uma variedade de produtos naturais e são responsáveis pelas atividades biológicas destes produtos como antivirais, antibacterianas, antiprotozoárias, antiinflamatórias, antitumorais, antidepressivas, anti-HIV, antiulcerativas, anti-hipertensivas, antiparkinsonianas e inibidores de quinases (BACHHAV et al., 2011; KHOSRAVI & KAZEMI, 2012).

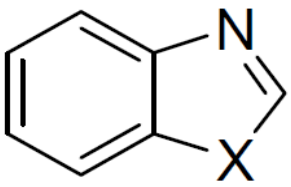


Figura 3: Estrutura geral dos benzoimidazóis, onde X = NH e benzotiazóis, onde X=S

Dados da literatura mostram que de 15 a 17 benzotiazóis têm sido testados contra câncer de mama, laringe e adenocarcinoma cervical, onde composto 2-(4-animofenil)-benzotiazol, derivado aromático de benzotiazóis, apresentou resultados bastante relevantes quando testados em células de carcinoma humano (CALETA et al., 2004). Outras propriedades como atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais também foram avaliadas, mostrando que esses compostos possuem ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, como *P. aeruginosa*, e ainda, leveduras incluindo *C. albicans* (ZITOUNI et al., 2003). Em outro estudo, o derivado 2-mercaptobenzotiazol demonstrou uma potente atividade antifúngica e tem sido usado como padrão nos testes biológicos contra *C. albicans*, sendo ainda usado como para tratamentos de infecções cutâneas (BUJDÁKOVÁ et al., 1993).

Özkay e colaboradores (2011) demonstraram que os compostos benzoimidazóis apresentaram atividade antimicrobiana assim como os benzotiazóis. Um exemplo é o derivado 2-mercaptobenzoimidazol que mostrou resultados promissores no tratamento da tuberculose com atividade antimicrobiana contra *Micobacterium tuberculosis* e outras micobactérias como *M. kansaii* e *M. avium* (KLIMESOVÁ et al., 1999, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e de inibição de adesão e formação de biofilme de compostos de origem biológica, biossurfactantes, e compostos sintéticos, sobre espécies de micro-organismos de importância clínica.

3.2. Objetivos Específicos

Selecionar linhagens de *Lactobacillus* spp. isoladas da microbiota vaginal, com potencial de produção de biossurfactantes;

Avaliar as condições de crescimento das linhagens de *Lactobacillus* spp. com potencial de produção de biossurfactantes;

Avaliar a produção de biossurfactantes pelas linhagens usando o extrato intracelular e extracelular;

Caracterizar os biossurfactantes produzidos quanto à capacidade de emulsificação e diminuição da tensão superficial;

Determinar a concentração micelar crítica e o efeito da concentração dos biossurfactantes na atividade emulsificante;

Caracterizar os biossurfactantes e os compostos químicos (diipirimidonas e benzotiazóis) quanto à atividade antimicrobiana e antiadesiva e influência na hidrofobicidade celular de micro-organismos patogênicos;

Avaliar a capacidade de autoagregação e coagregação a patógenos e de produção de peróxido de hidrogênio pelas *Lactobacillus* spp;

Avaliar a estabilidade das emulsões formadas pelos biossurfactantes frente a diferentes concentrações de eletrólitos, variação de pH, temperatura, e diferentes solventes hidrofóbicos;

Determinar a composição química dos biossurfactantes por cromatografia gasosa e espectroscopia no infravermelho;

Avaliar a interação sinérgica entre biossurfactantes e compostos químicos (diidropirimidonas e benzotiazóis);

Caracterizar os biossurfactantes e os compostos químicos quanto à atividade de antiproliferação de células tumorais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

No estudo foram utilizados 52 isolados de *Lactobacillus* das seguintes espécies: *L. crispatus* (n=18), *L. jensenii* (n=8), *L. gasseri* (n=9), *L. johnsonii* (n=6), *L. vaginalis* (n=4), *L. reuteri* (n=1), *L. acidophilus* (n=1), *L. delbrueckii* (n=1), *L. colehominis* (n=1), *L. fermentum* (n=3) isoladas da mucosa vaginal de pacientes com vaginose bacteriana cedidos pela Profª Regina Maria Nardi Drummond do departamento de Microbiologia, ICB/UFMG.

4.1.1 Avaliação das condições de cultivo dos isolados produtores de biossurfactantes

A fim de avaliar as melhores condições de cultivo dos *Lactobacillus* spp. inicialmente, 23 isolados selecionados aleatoriamente e cultivados em frascos de penicilina com tampa de borracha contendo 60 mL de meio MRS (sem tween, para não interferir na avaliação da atividade surfactante). O inóculo consistiu de 2 mL (0,02 DO $_{550nm}$) de uma cultura crescida por 12 horas. Os frascos foram incubados sob condições de aerobiose a 120 rpm e em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Inc., Marietta, USA) Após 72 h a 37 °C, foi feita a avaliação do crescimento medindo-se a densidade ótica a 550 nm utilizando espectrofotômetro Shimadzu UV120. As células foram separadas do meio de cultura por centrifugação (7200 x *g*, 20 min, 10°C) lavadas 2 vezes com água destilada estéril e ressuspendidas em 10mL de tampão fosfato (PBS: 10 mmol.L^{-1} KH_2PO_4/K_2HPO_4 e 150mmol.L^{-1} NaCl com pH ajustado para 7,0). As suspensões celulares foram deixadas à temperatura ambiente sob leve agitação por 24 h para liberação do bioemulsificante (RODRIGUES et al., 2006a, 2006b). Após 24 h, as células foram separadas por centrifugação. Os sobrenadantes (meio livre de células e tampão PBS) foram avaliados quanto à presença de compostos tensoativos pela medida da atividade emulsificante (*E24*), e surfactante pelo espalhamento da gota. As condições de crescimento que resultaram nos maiores

valores de biomassa celular (DO_{550}) e atividade emulsificante (*E24*) e surfactante foram usados nos experimentos seguintes.

4.1.2 Método do espalhamento da gota (Morita, 2007)

Para o método do espalhamento da gota, cinco alíquotas de 20 µL de cada sobrenadante do meio de cultivo livre de células e tampão PBS livre de células, foram aplicadas com auxílio de uma micropipeta em placas de poliestireno não tratada sobre uma folha de papel milimetrado e deixadas em repouso por 10 min. Após este período, a dispersão da gota foi avaliada. As gotas foram medidas com auxílio de um paquímetro e comparadas aos controles negativos, que consistiam de meio de cultura sem crescimento microbiano e tampão PBS.

4.1.3 Método da atividade emulsificante (CAMERON et al, 1988)

A atividade emulsificante (*E24*) foi realizada em tubos com tampa rosqueável contendo 1 mL do sobrenadante que foi adicionado a 1,5 mL de tolueno ou querosene a fim de avaliar o melhor solvente hidrofóbico para ser usado na determinação de (*E24*), sendo que cada tubo foi submetido à homogeneização em agitador de tubo (Tipo Vortex) em velocidade máxima por 2 min e deixado em repouso por 24 h. O índice *E24* foi determinado medindo-se a altura da camada emulsionada (cm) dividindo-a pela altura da camada total do líquido. O valor obtido foi multiplicado por 100.

$$E24 = \frac{\text{altura da camada emulsionada}}{\text{altura total do líquido}} \times 100\%$$

4.1.4 Extração dos biossurfactantes produzidos pelas bactérias lácticas

Após avaliação das condições de cultivo, que resultou em maior crescimento e produção de biossurfactantes, cinco isolados foram selecionados aleatoriamente a fim avaliar o melhor método de extração dos compostos. Nas extrações

utilizando etanol, o sobrenadante foi adicionado de 4 volumes de etanol gelado e mantido a -20 ^{o}C por 16 h. A seguir, o precipitado foi recuperado por centrifugação a 7200 x *g* por 15 min a 4 ºC e seco em estufa a 37 ºC, pesado e dissolvido em água destilada, em uma concentração de 100 mg.mL^{-1} (PARASZKIEWICZ et al., 2002, CAMARGO-DE-MORAIS et al., 2003)

Para extração com HCl, o pH dos sobrenadantes foi ajustado para um valor igual a 2,0, adicionando-se HCl a 1 mol.L^{-1}. As amostras acidificadas foram mantidas a 4 ºC por 2 h e o precipitado foi recuperado por centrifugação (7200 x *g*, 15 min, 4 ºC) e lavado por duas vezes com água acidificada (pH 2,0) (VAN HOOGMOED et al., 2000). A seguir, o precipitado foi deixado em estufa a 37 ºC. Após secagem foi pesado e dissolvido em água destilada, em uma concentração de 100 mg.mL^{-1}. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH a 1 mol.L^{-1}.

4.2. Prospecção de isolados de *Lactobacillus* spp produtores de biossurfactantes

4.2.1. Produção do inóculo

Para o preparo dos inóculos foram usados cinquenta e dois isolados de *Lactobacillus* spp. estocados a -80 ºC em caldo MRS (Difco), contendo 15% (v/v) de glicerol. Estes foram inoculados em meio MRS e incubados a 37 ºC em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Inc., Marietta, USA) contendo uma atmosfera de 85 % de N_2, 10 % de H_2 e 5 % de CO_2 para reativação celular. A seguir, 600 mL de caldo MRS (sem tween) foram inoculados com 6 mL dessa cultura de 12 h a uma concentração de 0,02 (OD_{550nm}). Após as 72 h de incubação a 37 °C, as células foram separadas por centrifugação (7200 x *g*, 15min, 10ºC) lavadas duas vezes com água destilada estéril, e ressuspendidas em 100 mL de tampão fosfato (10 mmol.L^{-1} KH_2PO_4/K_2HPO_4 e 150mmol.L^{-1} NaCl com pH ajustado para 7,0). As suspensões celulares foram mantidas à temperatura ambiente com leve agitação por 24h para liberação do biossurfactante extracelular e intracelular. Subsequentemente, as células foram

removidas por centrifugação e o sobrenadante submetido aos processos de extração por precipitação ácida.

4.2.2 Medida da tensão superficial

Avaliação da redução da tensão superficial dos sobrenadantes produzidos pelos isolados selecionados foi feita com auxílio de um tensiômetro de Kruss acoplado com placa de platina. O teste foi feito em duplicata a fim de aumentar a precisão das medidas. Todas as medidas foram feitas à temperatura ambiente e os valores expressos em $mN.m^{-1}$.

4.2.3 Halos de hemólise em placas de ágar-sangue

Para a realização dos ensaios de hemólise, os isolados foram reativados por meio do crescimento em placas de meio MRS. Amostras das colônias foram ressuspendidas em caldo MRS de modo a obter a concentração celular de 10^8 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). A seguir alíquotas de 3 µL foram depositadas na superfície de placas contendo Ágar-sangue, distanciadas entre si por pelo menos 2 cm, segundo método proposto por Carrilo e colaboradores (1996), com modificações. Após incubação por 24 h a 37 ºC, as placas foram analisadas quanto ao aparecimento de halos claros em torno das colônias, indicativos de ocorrência de hemólise e possível produção de biossurfactantes.

4.2.4 Atividade antimicrobiana dos biossurfactantes

A avaliação da sensibilidade das amostras de *Candida parapsilosis* ATCC 20019, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 20298 e *Candida tropicalis* ATCC 750, cedidas pelo Laboratório de Micologia do ICB-UFMG, isolados clínicos de *Staphylococcus saprophyticus, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* aos biossurfactantes foi realizada por meio da técnica microdiluição em caldo apresentada pelo documento M27-A2 do CLSI

(Clinical and Laboratory Standards Institute, anteriormente denominado NCCLS - National Committe for Clinical Laboratory Standards) (NCCLS, 2002) e por meio da técnica de microdiluição M7-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (NCCLS, 2002), respectivamente.

4.2.4.1 Diluição dos extratos

Para testar a ação antimicrobiana dos biossurfactantes, as soluções estoque foram preparadas em água em concentrações de 1000 $\mu g.mL^{-1}$. Para testes com bactérias, os compostos foram diluídos 1:2 em meio Mueller-Hinton de modo a obter uma concentração duas vezes maior que a máxima em análise. A partir dessa solução, foram feitas diluições seriadas no próprio meio, sendo mantido o volume constante de 1000 µl em cada tubo. Os compostos foram testados em concentrações, que variaram de 0,5 $\mu g .mL^{-1}$ a 128 $\mu g.mL^{-1}$. Como droga de referência foi usado o cloranfenicol. Para as leveduras foram usadas mesmas diluições em meio RPMI e como drogas de referência foram usados a anfotericina B e fluconazol.

4.2.4.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado pelo método espectrofotométrico proposto por Pfaller e colaboradores (1988). Amostras de leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 30 °C por 48 h. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente e suspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85 % esterilizada. Após homogeneização em Vortex, a transmitância foi medida em espectofotômetro a 530 nm, sendo ajustada para 75 % a 77 %, o que corresponde a uma suspensão de 1 a $5x10^6$ $células.mL^{-1}$. A suspensão obtida foi diluída a 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão padrão com meio líquido RPMI 1640, resultando em densidade celular duas vezes maior que a necessária para o inóculo ($1 X 10^3$ - $5 X 10^3$ células por mL).

Para os testes com bactérias, o inóculo foi preparado segundo o método de referência M7-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (NCCLS).

As bactérias foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37 °C por 24 h. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente e suspensa em tubos contendo 2 mL de solução salina 0,85 % esterilizada. Após homogeneização em Vortex, foram comparadas a uma escala MacFarland 0,5, o que corresponde a uma suspensão de 1 a $5x10^6$ células.mL^{-1}. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição de 1:10 da suspensão padrão em meio Mueller-Hinton, resultando em densidade celular duas vezes maior que a necessária para o inóculo ($1 X 10^3$ - $5 X 10^3$ células por mL).

4.2.4.3 Teste de microdiluição em placa

Os testes de sensibilidade foram realizados em placas com 96 poços de fundo chato, esterilizadas (Crall). Uma alíquota de 100 µL de cada diluição dos compostos em análise foi dispensada nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, foram dispensados 100 µL do inóculo duas vezes concentrado dos isolados das espécies citadas acima, resultando em um volume de 200 µL por poço. Em cada placa, foram feitos os seguintes controles: (1) crescimento (controle positivo), contendo RPMI 1640 ou MH isento do composto e inoculado com 100 µL do inóculo, (2) esterilidade (controle negativo), contendo apenas o meio isento dos compostos e do inóculo, e (3) toxicidade, contendo RPMI 1640 e DMSO na concentração utilizada para dissolver os compostos e inóculo. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h para leveduras e a 37 °C por 24 h para bactérias.

4.2.4.4 Leitura e interpretação

Para leitura foi adicionado em cada poço o corante TTC (cloreto de trimetiltetrazolium) e após 24 h, as placas foram transferidas para um Leitor de Elisa (Multskan) onde foram lidas as OD's. Para o fluconazol que é fungistático, ela foi definida como a concentração correspondente ao poço no qual houve redução de 80 % do crescimento fúngico em relação ao controle de crescimento. Para a anfotericina B e cloranfenicol, a leitura foi realizada da mesma maneira,

porém observando o poço no qual houve inibição de 100 % do crescimento (NCCLS, 2002; GUPTA *et al*., 2003).

4.2.5 Ensaios de autoagregação e coagregação

A extensão da autoagregação foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Vandevoorde e colaboradores (1992). 19 isolados de *Lactobacillus* foram selecionados para este teste e cultivados em frascos com 100 mL de caldo MRS por 24 h a 37 ºC e 120 rpm. Células foram centrifugadas (6000 x *g*, 15 min), lavadas duas vezes com água desmineralizada e ressuspendidas em tampão PBS ($g.l^{-1}$) (1; NaCl, 8; KH_2PO_4, 0,34; K_2HPO_4, 1,21; pH 7), a uma DO de 0,1 ± 0,05 a 600 nm. A variação da DO das suspensões celulares foi monitorada a cada 1 h durante 4 h, sem agitação, durante as determinações espectrofotométricas. A percentagem de autoagregação foi calculada pela seguinte expressão:

$$\text{Autoagregação (\%)} = \frac{\text{ODinitial} - \text{ODfinal}}{\text{ODinitial}} \times 100$$

onde *DOinicial* é a densidade óptica no tempo inicial (t = 0) do ensaio de autoagregação, e *DOfinal* é a densidade óptica a cada tempo após o início do ensaio (t = 1, 2, 3 ou 4 h).

Nos ensaios de coagregação foram usados isolados de bactérias lácticas *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} e micro-organismos patogênicos. Volumes iguais (2 mL) de cada suspensão celular dos isolados de lactobacilos e dos micro-organismos patogênicos: *Escherichia coli, Staphylococcus saprophyticus, Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Candida albicans, C. krusei, C. tropicalis* e *Aspergillus niger* foram agitados em Vortex por 15 s. Tubos controles, contendo 4 mL de cada suspensão bacteriana. As densidades óticas das suspensões foram medidas a 600 nm logo após serem preparadas e a cada uma por 4 h de incubação a 25°C. A porcentagem de coagregação foi calculada usando a equação descrita por Handley et al.(1987):

$$\text{Coagregação (\%)} = \frac{\left[\frac{(Ax + Ay)}{2} - A(x+y)\right]}{\frac{(Ax + Ay)}{2}} x100$$

onde x e y representam cada suspensão bacteriana nos tubos controles e (x+y) representa a mistura das suspensões bacterianas do patógeno com lactobacilo.

4.2.6 Caracterização parcial da composição química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes recuperados por precipitação ácida foram submetidos à determinação de proteína pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Os carboidratos totais foram determinados pelo método colorimétrico quantitativo descrito por Dubois (1951), utilizando glicose como padrão. O método de determinação de carboidratos totais se baseia na quebra das ligações glicosídicas pelo ácido sulfúrico e a formação de complexos coloridos de fenol com os subprodutos da hidrólise, que podem ser quantificados em espectrofotômetro. No método de Lowry, a determinação de concentração de proteínas das amostras é dada comparando-se a coloração da solução desconhecida com uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Para caracterizar os lipídeos foi usado o método de extração a frio descrito por Bligh & Dyer (1959), utilizando-se uma mistura de clorofórmio, metanol e água na proporção 1:2:0,8 (v/v). A amostra foi pesada e adicionou-se a mistura de metanol, clorofórmio e água, estabelecendo-se assim duas fases. As fases foram então separadas, ficando os lipídeos na fase orgânica. O clorofórmio foi evaporado e os resíduos restantes foram então pesados, correspondendo à quantidade de lipídeos.

4.3 Atividade biológica e caracterização físico-química de biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus jensenii* P_{6A} e *Lactobacillus gasseri* P_{65}

4.3.1 Avaliação da influência da camada S na capacidade de autoagregação e coagregação dos isolados de *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

Os lactobacilos possuem na parede celular uma camada proteica (camada S), composta de subunidades proteicas ou glicoproteicas, com função de adesão a diferentes superfícies, inclusive à superfície celular. Os isolados de *L. jensenii* P_{6A} *e L. gasseri* P_{65} foram cultivados em frascos com 100 mL de caldo MRS por 24 h a 37 ºC e 120 rpm. Células foram centrifugadas (6000 x *g*, 15 min), lavadas duas vezes com água desmineralizada e ressuspendidas em tampão PBS. Posteriormente foi adicionado LiCl a 5 mol.L^{-1} para retirada da camada S e incubadas por 30 min a temperatura ambiente. A partir daí seguiu-se a metodologia já descrita anteriormente para avaliação da capacidade de autoagregação e coagregação dos isolados de *L. jensenii* P_{6A} *e L. gasseri* P_{65} (item II 2.5).

4.3.2 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio pelos isolados de *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

Para avaliar a produção de peróxido de hidrogênio pelos lactobacilos foi usado ágar MRS adicionado do cromógeno TMB (tetrametilbenzidina). Sobre o ágar foram depositados 20 µL de cada inóculo, em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h a 37 ºC em câmara de anaerobiose. Após incubação as placas foram removidas da câmara e expostas ao ambiente por 30 min e então foram avaliadas quanto ao crescimento e aparecimento de uma coloração azul, indicativa da produção de peróxido de hidrogênio. Como controle foi usado ágar MRS sem TMB.

4.3.3 Determinação da concentração micelar crítica (cmc)

A tensão superficial dos sobrenadantes foi medida de acordo com o item a II.2.2. A cmc foi determinada representando graficamente a tensão superficial como uma função da concentração de biossurfactante e o ponto de intersecção entre as duas linhas representa o ponto em que se torna constante o valor da tensão superficial em relação ao aumento da concentração. Nos ensaios foram usadas

concentrações que variam de 0,1 a 50 mg.mL^{-1}. As medidas foram feitas em triplicata.

4.3.4 Determinação do efeito da concentração dos biossurfactantes produzidos pelos isolados *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} na atividade emulsificante

Para determinação do efeito da concentração dos biossurfactantes na atividade emulsificante, os compostos foram diluídos em água deionizada nas concentrações de 0,1 a 20 mg.mL^{-1}. Nestes ensaios, 1 mL de cada concentração dos biossurfactantes foi adicionado a tubos com tampa rosqueável contendo 1,5 mL de tolueno. Cada tubo foi submetido à homogeneização em agitador tipo Vortex em velocidade máxima por 2 min e deixado em repouso por 24 h. A atividade emulsificante foi determinada utilizando o método descrito por CAMERON *et al.* (1988). Os ensaios foram realizados em três repetições.

4.3.5 Estudo da estabilidade das emulsões e biossurfactantes a diferentes condições de pH, temperatura, solventes hidrofóbicos e adição de eletrólitos

4.3.5.1 Estudo da atividade emulsificante em diferentes valores de pH

Para estudar o efeito do pH na atividade emulsificante, o biossurfactante (5 mg.mL^{-1}) foi dissolvido nos tampões cloreto de potássio-HCl na concentração de 200 mmol.L^{-1}, para pH 1 e 2, acetato de sódio-ácido acético na concentração de 200 mmol.L^{-1} para pH 3, 4 e 5, fosfato de sódio na concentração de 100 mmol.L^{-1} para pH 6, 7 e 8, e glicina-NaOH na concentração de 200 mmol.L^{-1} para pH 9 e 10. A atividade emulsificante foi avaliada pelo método do índice de emulsificação (*E24).*

4.3.5.2 Estudo da estabilidade do biossurfactante após exposição a 100 ºC

Os ensaios de estabilidade após a exposição a 100° C foram realizados utilizando o biossurfactante na concentração de 5 mg.mL^{-1} em fase aquosa. Amostras de 1 mL foram transferidas para tubos de tampa rosqueável e incubados por 30, 40, 50 e 60 min à temperatura de 100 ºC. Após a incubação, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e adicionados de 1,5 mL de tolueno para a formação das emulsões. A atividade emulsificante foi avaliada pelo método do índice de emulsificação (*E24*).

4.3.5.3 Estudo da estabilidade das emulsões formadas pelos biossurfactantes após adição de eletrólitos

Os ensaios de estabilidade das emulsões após adição de eletrólitos foram realizados utilizando o biossurfactante na concentração de 5 mg.mL^{-1}. Amostras de 1 mL foram adicionadas a tubos de vidro (1,5 X 15 cm) de tampa rosqueável e acrescidas de 1,5 mL de tolueno, sendo as emulsões formadas como descrito no item I1.4. Após 24 h de repouso, três eletrólitos em diferentes quantidades foram adicionados às emulsões. Foram utilizados os sais cloreto de sódio, cloreto de potássio e bicarbonato de sódio nas quantidades de 800, 1200 e 2000 µg. Os tubos foram submetidos à agitação em agitador tipo Vortex por 2 min, e após 24 h, a atividade emulsificante foi avaliada pelo método do índice de emulsificação (*E24*).

4.3.5.4 Determinação da atividade emulsificante frente a diferentes substratos hidrofóbicos

Os ensaios de emulsificação di compostos hidrofóbicos foram realizados utilizando o biossurfactante na concentração de 5 mg.mL^{-1} em água deionizada. Amostras de 1 mL foram transferidas para tubos de tampa rosqueável e acrescidas de 1,5 mL dos seguintes substratos hidrofóbicos: hexadecano (VETEC), hexano (VETEC), óleo diesel (Petrobras, Brasil), gasolina (Petrobras, Brasil), querosene (Petrobras,Brasil) óleo de oliva (BUNGE-alimentos), óleo de algodão (BUNGE-alimentos), óleo de girassol (BUNGE-alimentos) e tolueno

(VETEC). Os tubos foram submetidos à agitação em Vortex por 2 min, e após 24 h, a atividade emulsificante foi avaliada pelo método do índice de emulsificação (*E24).*

4.3.6 Utilização de extratos contendo biossurfactante na redução de biofilme microbiano em placas de poliestireno

Nos ensaios de avaliação da remoção de biofilme, foi utilizada a técnica para a quantificação de formação de biofilme em placas de microdiluição descrita por Li e colaboradores (2003), com modificações. Foram avaliados os extratos intracelulares dos isolados de *Lactobacillus jensenii* P_{6A} e *Lactobacillus gasseri* P_{65}. Os micro-organismos patogênicos utilizados para este teste foram *E. coli, S. saprophyticus, E. aerogenes, K. pneumoniae, C. albicans, C. krusei* e *C. tropicalis.*

Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo BHI por 24 h a 37 °C e os isolados de leveduras, em meio RPMI por 48 h a 30 °C. Após incubação, as células foram centrifugadas a 7200 x *g* por 15 min, lavadas duas vezes com tampão PBS e utilizadas para o preparo de um inóculo com densidade celular equivalente a 0,5 da escala de McFarland.

Para a realização dos ensaios foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços de poliestireno não tratadas (Crall). Cada poço foi adicionado de 180 µL de meio BHI contendo 1 % de glicose (bactérias) ou RPMI (leveduras) e o extrato intracelular em concentrações que variaram de 22,5 $\mu L.mL^{-1}$ a 180 $\mu L.mL^{-1}$, acrescidos de 20 µL do inóculo padronizado. O ensaio foi realizado em quatro repetições do controle (meio sem extrato) e quatro repetições para cada uma das concentrações do extrato em estudo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e 30 ºC por 48 h, para bactérias e leveduras, respectivamente. As células não aderidas foram removidas com o auxílio de uma micropipeta multicanal e os poços foram lavados por três vezes com solução salina estéril. As células aderidas (biofilme) foram fixadas com 300 µL de metanol a 99 % por 15 min e

coradas com solução de cristal violeta a 1 % por 5 min. O corante ligado às células aderidas foi solubilizado com 400 µL de etanol a 95 % e as soluções obtidas foram transferidas para outra placa de poliestireno e submetidas à leitura de absorbância a 450 nm em leitor de Elisa Multiskan MMC/340. O percentual de redução do biofilme foi avaliado comparando as leituras de absorbância nos poços tratados com extrato em comparação com os poços controle (não tratados com extrato).

4.3.7 Avaliação da atividade antiadesiva dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

A atividade antiadesiva dos biossurfactantes foi testada contra os mesmos isolados de micro-organismos patogênicos usados nos ensaios de redução de biofilme. A avaliação da inibição de adesão foi feita de acordo com o procedimento descrito por Heinemann e colaboradores (2000). Resumidamente, às cavidades de uma placa de 96 poços de poliestireno, estéril e de fundo chato (Crall) foram adicionados 200 µL de uma solução dos biossurfactantes em PBS, em concentrações de 1,56 $\mu g.mL^{-1}$ a 12,5 $\mu g.mL^{-1}$. As placas foram incubadas durante 18 horas a 4 °C e subsequentemente lavadas duas vezes com PBS. Nos poços de controle foram adicionados apenas tampão PBS. Uma alíquota de 200 µL de uma suspensão padronizada (3×10^8 $CFU.mL^{-1}$ em PBS) de um inóculo bacteriano e de leveduras foi adicionada aos poços e as placas incubadas novamente durante 4 h a 4 °C. As placas foram lavadas por três vezes com PBS para remoção dos biofilmes não aderidos. Os micro-organismos aderentes foram fixados com 200 µL de metanol 99 %, as placas foram esvaziadas e deixadas secar por 15 min . Em seguida, as células aderidas foram coradas durante 5 min com 200 µL de violeta de cristal (2 %). O excesso de corante foi retirado lavando-se as placas em água corrente. Subsequentemente, as placas foram secas ao ar, o corante ligado aos micro-organismos sésseis foi ressolubilizado com 200 µL de ácido acético glacial 33 % (v/ v) por poço e as leituras de densidade óptica foram medidas a 595 nm. As porcentagens de adesão microbiana, em diferentes concentrações dos biossurfactantes foram calculadas através da medida de OD

em relação à adesão dos micro-organismos nos controles que não continham biossurfactantes.

4.3.8 Determinação da hidrofobicidade celular de micro-organismos patogênicos após exposição aos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

Para determinar as alterações na hidrofobicidade da superfície celular de bactérias e leveduras, após incubação na presença dos biossurfactantes (16 $\mu g.mL^{-1}$) foi usado a metodologia proposta por Rosenberg e colaboradores (1980), com modificações. Os micro-organismos foram inoculados em placas de meio BHI para bactéria e Sabouraud para leveduras. Após incubação a 30 ºC por 48 h para leveduras e 37 ºC para bactéria, por 24 h, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min a 4 ºC e lavadas duas vezes com 10 mL de tampão PBS e ressuspendidas neste tampão de forma a obter a concentração de 0,3 unidades de densidade ótica a 600 nm (DO inicial), em espectrofotômetro Shimadzu UV 120. Alíquotas de 2 mL da suspensão celular com biossurfactante e de 0,5 mL de hexadecano foram homogeneizadas em agitador tipo Vortex em velocidade máxima por 2 min. Após repouso de 10 min, retirou-se 1 mL da fase aquosa e estas amostras foram submetidas à determinação da densidade óptica a 600 nm (DO final). Os ensaios foram realizados em triplicata e a hidrofobicidade foi estimada pelo cálculo da porcentagem das células aderidas ao hexadecano, por meio da fórmula:

% células aderidas ao hexadecano = [(DO inicial – DO final)/ DO final] x 100.

4.3.9 Caracterização dos ácidos graxos e monossacarídeos por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa

As amostras foram hidrolisadas em 1 mL de água deionizada e 100 mL de TFA (ácido trifluoroacético) e sonicadas até completa dissolução. Em seguida foram aquecidas por 18 h a 100 ºC e separadas em duas porções para análise de

ácidos graxos e açúcares. Cada amostra foi adicionada de 1 mL de metanol P.A. e 50 µL de TFA (ácido trifluoroacético), e aquecida por quatro horas de 90 a 100 ºC. Após este período foram secas em speed-vac e extraídas com acetato de etila/água, onde a fase orgânica (acetato de etila) foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Para o estudo dos carboidratos, após serem completamente secas, as amostras foram reduzidas com $NaBH_4$ (borohidreto de sódio), transformando todos aldeídos dos respectivos açúcares em álcool. Desta forma os açúcares se transformaram em alditóis acetatos e foram extraídos com acetato de etila/água e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

A identificação e a quantidade relativa das moléculas de ambas as amostras foram detectadas a partir das áreas dos picos relativos, utilizando-se, respectivamente, os padrões internos de ésteres de ácidos graxos e de monossacarídeos (Supelco EUA).

4.3.10 Caracterização dos biossurfactantes por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

Esta técnica é particularmente usada para identificar tipos diferentes de grupos funcionais químicos e pode deste modo, ser usada para identificar componentes de mistura de compostos desconhecidos. Uma amostra do biossurfactante (< 1 mg) foi analisada em equipamento para espectroscopia no infravermelho Spectrum-One FT-IR, da Perkin-Elmer.

4.4 Avaliação da atividade biológica dos compostos de Biginelli e benzazóis e interação entre biossurfactantes e benzazóis

Os compostos de Biginelli e benzazóis foram sintetizados pelo Grupo de Estudos em Química Orgânica e Biológica coordenado pelo prof. Dr. Ângelo de Fátima do Instituto de Ciências Exatas, UFMG.

4.4.1 Determinação da atividade antimicrobiana dos compostos diidropirimidona e benzazóis

As soluções estoque dos compostos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentrações de 1000 µg.mL^{-1}. A partir dessa solução, foram feitas diluições seriadas nos próprios meios de cultura, sendo mantido o volume constante de 1000 µl em cada tubo. Os compostos foram testados em concentrações que variaram de 0,5 µg.ml^{-1} a 128 µg.ml^{-1}, para Biginelli e de 7,6 µg.ml^{-1} a 500 µg.ml^{-1}, para benzazóis; como drogas de referência foram usadas anfotericina B, fluconazol e cloranfenicol. Os inóculos foram preparados de acordo com a metodologia descrita no item II 2.4.3

4.4.1.1 Teste de microdiluição em placa

Os testes de sensibilidade foram realizados em placas de 96 poços esterilizadas (Crall). Uma alíquota de 100 µL de cada diluição seriada dos compostos em análise foi dispensada nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, foram adiocionados aos poços 100 µL do inóculo duas vezes concentrado dos isolados de leveduras, fungos e bactérias, resultando em um volume de 200 µL por poço. Em cada placa, foram feitos os seguintes controles: (1) crescimento (controle positivo), contendo RPMI 1640 ou MH sem composto e inoculado com 100 µL do inóculo duas vezes concentrado, (2) esterilidade (controle negativo), contendo apenas o meio isento dos compostos e do inóculo, e (3) toxicidade, contendo meio de cultura e DMSO na concentração utilizada para dissolver os compostos e inóculo. As placas foram incubadas a 37 °C para bactéria e 30 °C para leveduras e fungo as concentrações inibitórias mínimas (CIM) lidas após 24 h de incubação para bactérias e 48h para leveduras e fungos, respectivamente.

4.4.1.2 Leitura e interpretação

Para leitura foi adicionado em cada poço o corante TTC (cloreto de trimetiltetrazolium), as leituras foram feitas em Leitor de Elisa (Multiskan).

Considerando 80% de redução de crescimento para fluconazol e 100% de inibição de crescimento para anfotericina B e cloranfenicol (NCCLS, 2002; GUPTA *et al*., 2003).

4.4.2 Determinação da interação antimicrobiana dos biossurfactantes e benzazois I06, I16, I17, T04 e T17

Para determinar o efeito da interação antimicrobiana dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} e os compostos benzazois, foi utilizado o método de microdiluição Checkerboard como descrito por Schwalbe, Steele-moore e Goodwin (2007). A interação entre biossurfactantes e benzazois foi avaliada sobre os isolados de *Candida albicans* ATCC 18804 e *Escherichia coli*.

Neste teste foram preparadas combinações de diferentes concentrações dos compostos e determinou-se o ICIF (índice de concentração inibitória fracionada) a partir da menor combinação de concentrações em que houve inibição do crescimento microbiano.

4.4.2.1 Preparo das soluções

Foram preparadas soluções estoques de benzazóis a 500 $\mu g.mL^{-1}$ e solução estoque de biossurfactantes a 128 $\mu g.mL^{-1}$. As soluções foram filtradas em filtro 0,22 µm e testadas em concentrações que variaram de 1,95 $\mu g.mL^{-1}$ a 125 $\mu g.mL^{-1}$ para benzazóis e para biossurfactantes foram testadas em concentrações de 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ a 32 $\mu g.mL^{-1}$. Os inóculos de *E. coli* e *C. albicans* foram preparados de acordo com a metodologia descrita no item II 2.4.3

4.4.2.2 Preparo do painel Chekerboard

Para fazer as combinações dos antimicrobianos, as diluições foram preparadas em tubos e acrescentadas nos poços das placas de poliestireno seguindo o esquema do painel abaixo:

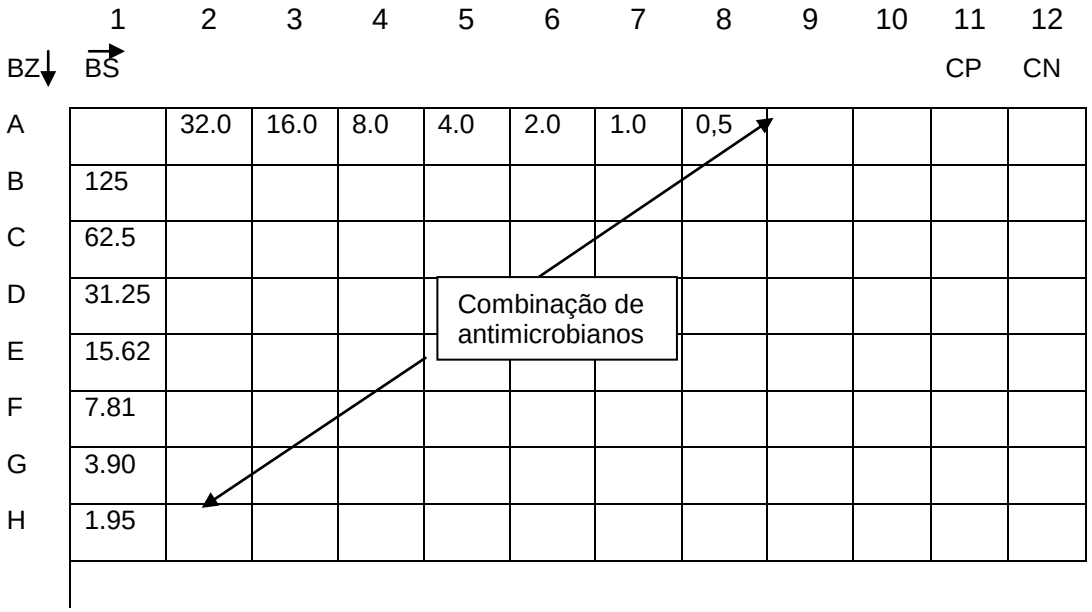


Figura 4: Painel Checkerboard com combinações dos antimicrobianos benzoimidazóis e benzotiazóis e biossurfactantes

Foram adicionados 100 µL de meio RPMI ou Muller Hinton (MH) às colunas 11 e 12, nas colunas 2 a 8 foram acrescentados 50 µL das diluições dos biossurfactantes preparadas em RPMI ou MH. Em seguida, foram acrescentados às linhas de A a H, 50 µL das diluições dos benzazóis. 10 µL de inóculo padronizado foi adicionado nas colunas de 1 a 8 e coluna 11 (controle positivo) e linhas de A a H. A coluna 12 foi usada como controle negativo.

As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h e a 30 °C por 48 h para *E. coli* e para *C. albicans*, respectivamente. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de TTC (cloreto de trimetiltetrazolium) e a leitura foi realizada em Leitor de Elisa Multiskan, após 24 h de incubação.

Para avaliar o tipo de interação entre os compostos foi determinado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) que é o somatório das concentrações de cada antimicrobiano.

$$ICIF = CIF_{BS} + CIF_{benzazol}$$

$$ICIF = \frac{CIM\ BS\ combinado}{CIM\ do\ BS} + \frac{CIM\ BZ\ combinado}{CIM\ do\ BZ}$$

Tabela 1: Classificação do índice ICIF para avaliar o tipo de interação

Interação	ICIF
Sinergismo	**ICIF ≤ 0,5**
Antagonismo	**0,5 < ICIF ≤ 4**
Indiferente	**ICIF > 4**

4.4.3 Curva de sobrevivência de *C. albicans* e *E. coli* após exposição aos biossurfactantes e benzazóis

Os ensaios da cinética de morte *E. coli* e *C. albicans* foram avaliados na presença das concentrações inibitórias mínimas e sinérgicas de biossurfactantes e benzazóis. Foram depositados 100 µL das concentrações dos compostos aos poços de placas de poliestireno e adicionados 100 µL das suspensões de *E. coli* e *C. albicans* preparadas em meio Miller-Hinton e RPMI, respectivamente. As placas de microdiluição foram incubadas a 37 °C e 30 °C por 0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas, após exposição aos biossurfactantes e benzazóis. A viabilidade celular foi avaliada usando MTT (Sigma-Aldrich) a 0,005 $g.L^{-1}$ que foi adicionada a cada poço. As leituras espectofotométricas a 490nm foram feitas após adição de DMSO. A porcentagem de atividade metabólica comparada ao controle (*E.coli* e *C.albicans*) foi determinada para cada micro-organismo e cada tempo de incubação.

4.4.4 Avaliação da atividade antiadesiva dos benzazóis

Para avaliação da atividade antiadesiva foi utilizada a mesma metodologia descrita no item IV4.2. Usando os seguintes compostos: benzoimidazóis (I06, I16 e I17) e benzotiazóis (T04 e T17) em concentrações de 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ a 500 $\mu g.mL^{-1}$.

4.4.5 Triagem de biossurfactantes e benzazóis quanto a sua atividade citotóxica em linhagens de células tumorais

As suspensões das amostras foram preparadas em DMSO de forma a obter a concentração de 20 $mg.mL^{-1}$. Uma sonda de ultrassom foi empregada para ajudar na dissolução ou suspensão da mesma. Para os ensaios com células, foi preparada uma solução de uso a 200 $\mu g.mL^{-1}$. Deste modo, as concentrações finais dos compostos nos ensaios de triagem foram de 20 $\mu g.mL^{-1}$, com uma concentração final de solvente menor que 0,5%. As linhagens celulares avaliadas incluíram: HL60 (leucemia mielóide), Jurkat (leucemia linfóide), MCF-7 e MDA-MB-231(carcinoma mamário), e HCT-116 (carcinoma colo-retal), e VERO (rim de macaco verde, usada como modelo de células não tumoral).

As suspensões de células tumorais Jurkat e HL60 foram utilizadas na concentração de 50.000 e 100.000 células/poço, respectivamente. Para outras linhagens, foram utilizadas concentrações de 10.000 celulas/poço. Todas foram incubadas por 24 h a 37 °C, 5 % CO_2 para estabilização. Após estabilização, todas as células foram incubadas com as substâncias por 48h em atmosfera de 5% CO_2 e 100% de umidade, 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se como controle positivo o etoposideo, composto já utilizado na terapia antitumoral. Foi realizado um controle do solvente (DMSO) na mesma concentração das amostras testes. A proliferação e viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio de MTT, descrito a seguir.

O ensaio para avaliação de viabilidade e proliferação celular é baseado na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a formazan (MONKS et al., 1991) e permite avaliar tanto a proliferação

quanto a viabilidade celular. Faltando 4 horas para o final do período de incubação das culturas, foram adicionados a cada poço (contendo 200 µL finais), 20 µL de uma solução de MTT (2,5 $mg.mL^{-1}$). Após as 4 horas de adição do corante e formação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado a vácuo. A cada poço foram adicionados 200 µL de uma solução de HCl 0,04$mol.L^{-1}$ em isopropanol. Após solubilização dos cristais de formazan formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram lidas em leitor de ELISA a 595 nm.

4.5. Análise estatística

Quando necessário os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de Tukey com o nível de significância entre 0,001 a 0,05 utilizando o programa SISVAR (UFLA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de biossurfactantes em condições de aerobiose e anaerobiose

O crescimento de *Lactobacillus* spp. tem sido reportado tanto em condições aeróbicas (GUDIÑA, 2010) quanto em anaerobiose (FRACHIA et al., 2010). As condições de cultivo foram avaliadas a fim de otimizar o crescimento e a produção dos compostos tensoativos pelos isolados em estudo.

Para a maioria dos isolados, não foram observadas diferenças significativas na densidade celular entre as condições de incubação (Tabela 1). Três isolados apresentaram maior crescimento em aerobiose, enquanto que apenas um apresentou maior densidade em anaerobiose. As análises estatísticas desses resultados estão apresentados em anexo.

Tabela 1 : Resultados de crescimento, atividade surfactante, atividade emulsificante e produção de hemólise dos 23 isolados de Lactobacillus spp.

Amostras	OD	E24 Tolueno (%)				Hemólise
		intracelular		extracelular		
Controle		**Aerob.**	**Anaerob.**	**Aerob.**	**Anaerob.**	0
***L.acidophilus* P_{11}**	0,55±0,3	3,75	3,75	3,75	3,75	0
***L.colehominis* P_2**	1,48±0,8	72,5	12,5	3,75	67,5	3,535534
***L.crispatus* P_1**	1,16±0,1	45	42,5	42,5	27,5	0
***L.crispatus* $P_{4.10-6}$**	0,57±0,9	5	3,75	3,75	42,5	3,535534
***L.crispatus* P_{8-1}**	1,16±0,7	72,5	3,75	3,75	3,75	3,535534
***L.crispatus* P_{10A}**	0,65±1,2	12,5	12,5	3,75	3,75	0
***L.crispatus* P_{14-1}**	1,60±0,3	5	5	77,5	2,5	0
***L.crispatus* P_{22-1}**	0,34±0,2	5	3,75	42,5	32,5	3,535534
***L.crispatus* P_{37}**	0,17±0,5	3,75	67,5	3,75	2,5	1,767767
***L.crispatus* P_{38}**	0,18±0,8	3,75	12,5	3,75	57,5	3,535534
***L.crispatus* P_{49A}**	0,72±0,9	5	5	3,75	3	0
***L.gasseri* P_{16-1}**	1,49±0,3	3,75	5	3,75	2,5	0
***L.gasseri* P_{18-1}**	0,24±0,2	3,75	12,5	3,75	3,75	1,767767
***L.gasseri* P_{20}**	1,16±0,4	22,5	32,5	62,5	3,75	3,535534
***L.gasseri* P_{27-1}**	0,30±0,7	52,5	5	17,5	3,75	1,767767
***L.jensenii* P_{6A}**	1,12±0,3	62,5	3,75	3,75	3,75	1,767767
***L.jensenii* P_{15-2}**	0,15±0,3	5	27,5	52,5	2,5	3,535534
***L.jensenii* P_{35A}**	0,32±0,4	52,5	3,75	3,75	32,5	0
***L.johnsonii* P_{9-3}**	1,39±0,6	5	5	3,75	32,5	3,535534
***L.johnsonii* P_{13-1}**	0,45±0,3	22,5	3,75	3,75	42,5	3,535534
***L.johnsonii* P_{19}**	1,59±0,4	3,75	5	22,5	52,5	1,767767
***L.reuteri* P_{9-1}**	1,12±0,3	5	5	3,75	62,5	1,767767
***L.vaginalis* P_{16-2}**	1,15±0,6	57,5	5	72,5	57,5	0

As atividades emulsificantes dos isolados *L. crispatus* P_1 e *L. gasseri* P_{20} foram significativamente diferentes dos demais isolados testados. De modo geral, quando se usou tolueno, não houve variação entre os extratos (intracelular e extracelular) e as condições de cultivo (aerobiose e anaerobiose) (Tabela 3). Quando se avaliou os isolados separadamente alguns apresentaram variações significativas em sua atividade emulsificante. Para as amostras *L. jensenii* P_{6A}, *L. crispatus* P_{8-1}, e *L. crispatus* P_{37} o extrato intracelular mostrou valores mais altos de atividade emulsificante, enquanto que para as amostras de *L. reuteri* P_{9-1}, *L. crispatus* $P_{14-1,}$ *L. vaginalis* P_{16-2}, *L. johnsonii* P_{19}, *L. crispatus* P_{22-1} e *L. crispatus* P_{38} o extrato extracelular apresentou maiores valores. Quanto às condições de cultivo os isolados *L. jensenii* P_{6A}*, L. crispatus* P_{8-1}, *L. crispatus* P_{14-1}, *L. vaginalis*

P_{16-2}, *L. gasseri* $P_{20,}$ e *L. gasseri* P_{27-1} apresentaram maiores valores de *E24* quando incubados em aerobiose, enquanto que a amostras de *L. vaginalis* P_{16-2}, *L. crispatus* P_{37} e *L. crispatus* P_{38} apresentaram maiores valores de atividade emulsificante em anaerobiose.

Quando se usou o querosene como solvente hidrofóbico, de modo geral, houve variação na atividade emulsificante com relação à expressão e não quanto às condições de cultivo. Os isolados de *L. jensenii* P_{6A} , *L. johnsonii* $P_{9-3,}$ *L. crispatus* $P_{14-1,}$ *L. vaginalis* P_{16-2} , *L. gasseri* P_{20}, *L. crispatus* P_{22-1}, e *L. crispatus* P_{38} apresentaram maiores valores de *E24* para os extratos intracelulares, enquanto que *L. crispatus* P_{37} e *L. crispatus* P_{49-A}, mostraram maiores valores de atividade emulsificante para extratos extracelulares. Quanto às condições de cultivo as amostras de *L. jensenii* P_{6A}, *L. crispatus* $P_{14-1,}$ *L. gasseri* P_{20} e *L. crispatus* P_{22-1} apresentaram maiores valores de *E24* quando incubados em aerobiose. Enquanto que *L. johnsonii* P_{9-3}, *L. vaginalis* P_{16-2}, *L. crispatus* P_{37}, *L. crispatus* P_{38} e *L. crispatus* P_{49A} mostraram maiores valores de atividade emulsificante em condições de anaerobiose.

Para atividade surfactante, de forma geral, foi observado efeito significativo do isolado, condição de cultivo e do tipo de extrato avaliado (Tabela 5). As maiores atividades surfactantes foram observadas para os compostos obtidos dos isolados crescidos em anaerobiose, e para os extratos intracelulares (Figura 8).

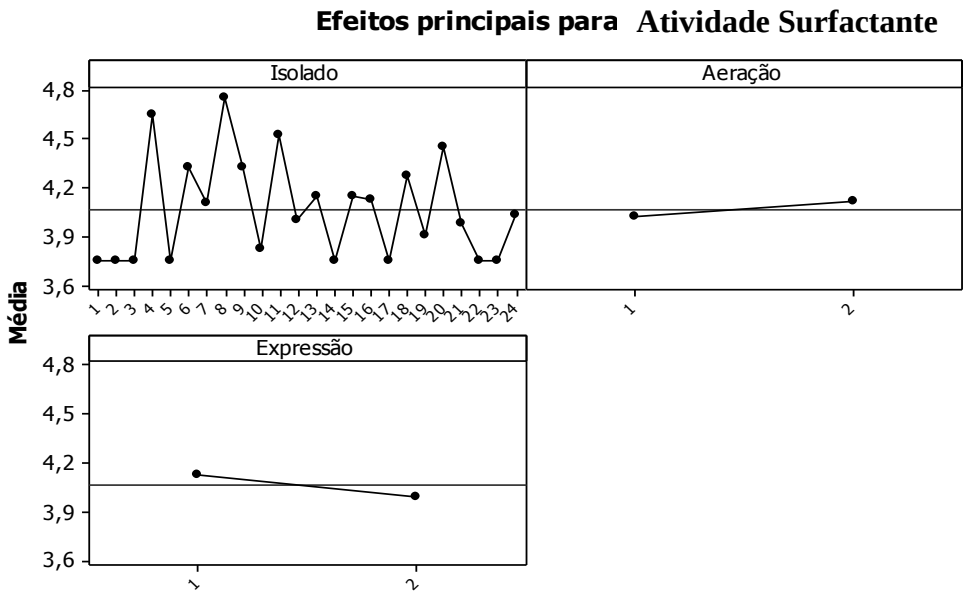


Figura 8: Efeito para atividade surfactante avaliando as condições de cultivo (aerobiose e anaerobiose) e os diferentes extratos (intracelular e extracelular)

As maiores atividades surfactantes foram observadas para os isolados $P_{4.10}^{6}$, $P_{8\text{-}1}$ e P_{10A} de *L. crispatus*, $P_{18\text{-}1,}$ P_{20}, $P_{27\text{-}1}$ de *L. gasseri* e $P_{15\text{-}2}$ de *L. jensenii*, P_2 de *L. colehominis*, $P_{13\text{-}1}$ de *L. jonhsonii* e $P_{9\text{-}1}$ de *L.reuteri.*

Os resultados apresentados por estes micro-organismos mostraram valores maiores para os testes de emulsificação quando usados os extratos intracelulares. Estes resultados sugerem que os *Lactobacillus* das espécies testadas produzem compostos ativos de superfície que podem estar ligados à parede celular, tais CAS são denominados particulados. (DESAI & BANAT, 1997).

5.1.2. Extração dos biossurfactantes produzidos pelas bactérias lácticas

O método utilizado na extração de compostos tensoativos de culturas microbianas é escolhido em função da composição química e da massa das biomoléculas produzidas. De forma geral, para a extração de moléculas poliméricas são utilizados solventes orgânicos como álcool, acetona entre outros, e para moléculas de baixo peso molecular usa-se precipitação com ácido

(GUDIÑA et al., 2010). Como há pouco conhecimento a respeito da composição química e massa dos biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus* spp.*,* neste estudo foram avaliados os métodos de extração alcoólica e de precipitação ácida para serem posteriormente selecionados como método de extração. Foram utilizados 40 mL dos extratos (intracelulares e extracelulares) das seguintes amostras: *L. crispatus* $P_{1,}$ *L. colehominis* P_2, *L. jensenii* $P_{6A,}$ *L. reuteri* P_{9-1} e *L. johnsonii* P_{9-3}.

De forma geral, foram obtidos maiores rendimentos nas extrações feitas por extração alcoólica, a partir do meio de cultivo livre de células e extrato intracelular. Já a precipitação ácida apresentou menores rendimentos (Tabela 6).

Outros trabalhos têm mostrado uma produção efetivamente baixa de biossurfactantes por lactobacilos, ficando em torno de 20 a 100 $mg.L^{-1}$, enquanto que para outros micro-organismos, como *Pseudomonas* e *Bacillus*, o rendimento varia de 2 a 10 $g.L^{-1}$ (VELREADS et al. 1996, BUSSCHER et al. 1997, RODRIGUES et al. 2006c).

Os maiores valores de atividade emulsificante (*E24*) foram encontrados quando os biossurfactantes foram extraídos por precipitação ácida cujos valores corresponderam a 47,72 % a 72,70 %, para os cinco isolados testados. Os dados apresentados neste experimento sugerem a precipitação ácida como método de extração a partir do extrato intracelular, para a produção de biossurfactantes produzidos por bactérias lácticas.

Tabela 2: Atividade emulsificante de biossurfactantes extraídos por precipitação ácida ou extração alcoólica

	OD	*Extração alcóolica*						*Precipitação ácida*					
		Intracelular			*Extracelular*			*Intracelular*			*Extracelular*		
		Peso (G)	*E24* (%)	AS	Peso (G)	*E24* (%)	AS	Peso (G)	*E24* (%)	AS	Peso (G)	*E24* (%)	AS
Controle		_	_	4.0	_	_	3.5	_	_	3.5	_	_	3.5
L.crispatus **P_1**	0.32± 0.00	1.68	50.00	4.0	7.88	_	3.5	0.14	72.70	4.0	0.18	_	3.5
L. colehominis **P_2**	0.31± 0,01	0.28	66.67	4.0	2.95	33.33	4.6	0.12	60.00	4.0	0.22	_	4.0
L.jensenii **P_{6A}**	0.42± 0.14	0.34	_	4.5	0.92	28.33	3.5	0.09	50.00	4.0	0.34	_	4.0
L. reuteri **P_{9-1}**	0,52± 0,00	3.99	_	4.0	0.02	29.16	3.5	0.14	62.49	6.0	0.20	_	4.0
L.johnsonii **P_{9-3}**	0,38± 0,00	0.74	_	3.75	1.07	25.87	3.4	0.35	47.72	4.0	0.21	_	4.0

E24: **atividade emulsificante As: atividade surfactante**

5.2. Prospecção de isolados de *Lactobacillus* spp. produtores de biossurfactantes

5.2.1 Avaliação das condições de crescimento, atividade surfactante, emulsificante e hemolítica dos diferentes isolados

Após definição das condições de crescimento e métodos de extração 52 isolados de bactérias lácticas de espécies variadas foram avaliados quanto à produção de biossurfactantes. Ao avaliar a atividade emulsificante observou-se que 21 isolados apresentaram valores acima de 60% considerando tanto o extrato intracelular como extracelular. De forma geral, a atividade emulsificante variou com a espécie em estudo e entre isolados de uma mesma espécie.

Dos 18 isolados da espécie *L. crispatus*, seis apresentaram atividade emulsificante em torno de 70,0 % (Tabela 3). Dos nove isolados de *L. gasseri,* cinco apresentaram atividade emulsificante acima de 60,0 %.

Entre os oito isolados de *L. jensenii,* quatro mostraram atividade emulsificante acima de 60,0% para o extrato extracelular e intracelular. Entre os três isolados de *L. vaginalis* apenas dois apresentaram atividade emulsificante acima de 60,0%, porém o isolado de *L. vaginalis* P_{74C} apresentou este resultado somente quando se usou o extrato extracelular.

Os isolados de *L. colehominis* e *L. reuteri* estudados apresentaram atividade emulsificante acima de 60,0% e foram selecionados para estudos posteriores, já os únicos representantes das espécies *L. acidophilus* e *L. delbruecki* apresentaram valores de *E24* inferiores a 55%.

A medida da tensão superficial foi feita usando o tensiômetro de Krüss. Os isolados *L. crispatus* $P_{66,}$ *L. jonsonii* $P_{9\text{-}3}$, *L. jonsonii* P_{19} e *L. jensenii* P_{6A} apresentaram os menores valores de tensão superficial de 44,93, 45,65, 45,68 e 45,98 $mN.m^{-1}$, respectivamente. Os demais isolados apresentaram valores de tensão superficial variando de 45,65 $mN.m^{-1}$ a 65,98 $mN.m^{-1}$. Para o meio livre de células os valores de tensão superficial variaram de 38,81 $mN.m^{-1}$ a 62,08 $mN.m^{-1}$. De modo geral, a análise estatística dos dados pelo teste de Tukey (P<0,05) mostrou não haver diferença significativa entre os valores de redução da tensão superficial usando tanto PBS quanto o meio livre de células.

A eficácia de um biossurfactante é medida pela capacidade do mesmo em diminuir a tensão superficial. Por exemplo, um bom surfactante pode diminuir a tensão superficial da água (interface ar-água) de 72 $mN.m^{-1}$ a 35 $mN.m^{-1}$, sendo que os níveis de redução da tensão superficial são dependentes do tipo de biossurfactante e de sua estrutura (BOGNOLO, 1999). Estudos têm mostrado que biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* e *B. subtilis* foram capazes de reduzir a tensão superficial da água para 29 $mN.m^{-1}$ e 27 $mN.m^{-1}$, respectivamente. Para bactérias lácticas, o isolado *L. paracasei* apresentou um biossurfactante que reduziu a tensão superficial da água de 72 $mN.m^{-1}$ para 39,5 $mN.m^{-1}$ (GUDIÑA et al., 2010).

Os resultados de atividade emulsificante não correlacionam com diminuição da tensão superficial. De acordo com Willumsen & Karlson (1997) a atividade surfactante não está relacionada com altos valores de atividade emulsificante, devido às variações nas estruturas e propriedades tensoativas dos compostos ativos de superfície. Os biossurfactantes, geralmente representados por lipopeptídeos e glicopeptideos, que são de baixo peso molecular são efetivos na redução da tensão superficial (DESAI & BANNAT, 1997). Por outro lado, os bioemulsificantes poliméricos e aqueles compostos por polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexos destas substâncias (HAMME et al., 2006) são eficazes na estabilização de emulsões de óleo em água.

Com relação à atividade hemolítica, dos 52 isolados avaliados, 22 isolados (42,3 %) apresentaram atividade hemolítica, e destes, apenas 6 isolados apresentaram atividade emulsificante estável após 24 horas, sugerindo que nem sempre a atividade hemolítica presente corresponde à produção de composto emulsificante, pois as bactérias lácticas produzem outras substâncias que podem também lisar os eritrócitos.

Tabela 3: Resultados do crescimento, atividade surfactante, atividade emulsificante e hemolítica de diferentes espécies de *Lactobacillus* spp.

Amostras	*Tensão superficial (mN.m^{-1})*		*Crescimento (OD)*	*(%) E24 / Tolueno*		*Hemólise*
	PBS*	Meio**		PBS*	Meio**	
(tween 20)				**80,0**±0,1	**75,0**±0,2	
***L. acidophilus* P_{11}**	53,05±0,0	59,56±0,1	0,55±0,3	3,75±0,0	3,75±0,0	-
***L. colehominis* P_{2}**	47,22±0,5	51,52±0,3	1,48±0,8	72,5±0,0	67,5±0,0	+
***L. crispatus* P_{1}**	57,57±0,2	38,81±0,6	1,16±0,1	65,0±0,5	62,5±0,1	-
***L.crispatus* $P_{4.10-6}$**	57,65±0,0	52,63±0,0	0,57±0,9	42,5±0,5	3,75±0,0	+
***L. crispatus* P_{8-1}**	50,73±0,0	53,36±0,0	1,16±0,7	72,5±0,0	21,0±0,5	-
***L. crispatus* P_{10A}**	54,99±0,0	51,83±0,0	0,65±1,2	36,8±0,1	12,5±0,0	-
***L. crispatus* P_{14-1}**	61,06±0,1	53,36±0,9	1,60±0,3	47,5±0,1	40,0±0,0	+
***L. crispatus* P_{22-1}**	66,08±0,3	58,78±0,4	0,34±0,2	42,5±0,5	40,0±0,0	-
***L. crispatus* P_{30B}**	50,33±0,0	47,39±0,7	0,67±1,3	-	20,0±0,2	-
***L. crispatus* P_{34A}**	49,98±0,0	50,06±0,2	0,23±0,4	-	-	-
***L. crispatus* P_{37}**	55,94±0,0	55,02±0,0	0,17±0,5	37,5±0,7	45,0±1,3	-
***L. crispatus* P_{38}**	52,33±0,0	59,44±0,0	0,18±0,8	12,5±0,5	57,5±0,3	-
***L. crispatus* P_{49A}**	48,53±0,3	46,38±0,0	0,72±0,9	42,5±0,6	25,0±0,7	-
***L. crispatus* P_{53A}**	53,02±0,5	58,35±0,0	0,16±1,0	-	27,5±0,2	+
***L. crispatus* P_{57B}**	46,49±0,0	61,69±0,1	1,01±0,3	70,0±0,0	65.0±0,0	-
***L. crispatus* P_{61A}**	52,00±0,0	55,07±1,0	1,09±0,1	70,0±0,0	20,0±0,0	-
***L. crispatus* P_{66}**	44,93±0,0	57,56±0,6	1,57±0,7	77,5±0,5	25,0±0,0	-
***L. crispatus* P_{72A}**	48,30±1,0	43,11±0,4	0,17±0,4	-	22,5±0,5	+
***L. crispatus* P_{73C}**	56,51±0,6	51,38±0,4	1,06±0,1	-	35,0±0,0	+
***L. crispatus* P_{75A}**	56,95±0,8	62,08±0,0	2,18±0,7	78,9±1,1	70,0±0,7	+
***L. delbruecki* P_{68B}**	51,81±0,9	57,84±0,0	0,98±0,2	20,0±0,0	32,3±0,1	-
***L. fermentum* P_{57A}**	65,95±0,0	60,98±0,0	0,26±0,8	-	-	+
***L. fermentum* P_{62C}**	57,43±0,0	49,97±0,1	1,37±0,1	-	47,5±0,2	+
***L. fermentum* P_{74A}**	49,62±0,0	49,72±0,4	1,24±0	47,4±0,0	10,0±0,0	+
***L. gasseri* P_{16-1}**	57,07±0,0	53,69±0,5	1,49±0,3	80,0±0,0	67,5±0,3	+
***L. gasseri* P_{18-1}**	56,88±0,2	54,51±0,6	0,24±0,2	37,5±0,0	40,0±0,0	-
***L. gasseri* P_{20}**	56,77±0,3	58,89±0,0	1,16±0,4	42,5±0,0	42,5±0,3	-
***L. gasseri* P_{27-1}**	53,87±0,0	56,02±0,0	0,30±0,7	52,5±0,5	17,5±0,5	-
***L. gasseri* P_{60A}**	56,29±0,0	54,61±0,1	1,04±0,8	52,6±0,4	60,0±0,0	-
***L. gasseri* P_{65}**	65,98±0,0	59,69±0,2	1,12±0,3	78,9±1,1	70,0±0,7	-
***L. gasseri* P_{68A}**	50,66±0,1	47,98±0,6	1,22±0,3	62,6±0,3	65,0±0,0	-
***L. gasseri* P_{70B}**	64,07±0,3	56,07±0,0	0,58±0,6	52,5±0,0	47,5±0,5	-
***L. gasseri* P_{74D}**	45,93±0,5	52,30±0,0	2,20±0,5	68,4±0,2	72,9±0,3	+
***L. jensenii* P_{6A}**	59,78±0,7	54,66±0,9	1,12±0,3	62,5±0,0	63,75±0	-
***L. jensenii* P_{15-2}**	62,93±0,0	61,55±0,8	0,15±0,3	52,5±0,3	50,6±0,3	-
***L.jensenii* P_{35A}**	60,70±0,0	59,95±0,5	0,32±0,4	52,5±0,0	37,5±0,5	+
***L. jensenii* P_{56}**	55,60±0,3	60,08±0,3	1,36±1,2	-	37,5±0,0	+
***L. jensenii* P_{69D}**	55,26±0,4	48,90±0,2	1,25±0,3	77,5±0,6	67,5±0,3	+
***L. jensenii* P_{70A}**	56,79±0,1	51,22±0,0	0,54±0,4	30,0±0,1	-	+
***L. jensenii* P_{72B}**	56,77±0,0	55,09±0,0	1,03±0,9	-	64,7±0,3	+
***L. jensenii* P_{73A}**	45,68±0,0	50,95±0,0	2,19±0,8	77,4±0,4	60,0±0,0	+
***L. johnsonii* P_{9-3}**	58,48±0,6	55,92±0,1	1,39±0,6	77,5±0,3	75,0±0,0	-

Tabela 3: Resultados do crescimento, atividade surfactante, atividade emulsificante e hemolítica de hemólise de diferentes espécies de *Lactobacillus* spp. (Continuação)

Amostras	*Tensão superficial ($mN.m^{-1}$)*		*Crescimento (OD)*	*(%) E24 / Tolueno*		*Hemólise*
	PBS*	Meio**		PBS*	Meio**	
***L. johnsonii* P_{13-1}**	45,65±0,8	54,61±0,2	0,45±0,3	42,5±0,0	22,5±0,3	+
***L. jonhsonii* P_{19}**	47,02±0,3	59,19±0,2	1,59±0,4	65,0±0,0	67,5±0,0	+
***L. johnsonii* P_{52B}**	57,08±0,3	53,61±0,5	1,04±0,3	25,0±1,1	-	-
***L. johnsonii* P_{62A}**	47,76±0,4	53,61±0,0	0,79±0,3	60,0±0,0	42,5±0,5	-
***L. johnsonii* P_{63A}**	63,57±0,4	58,26±0,6	1,00±0,2	73,7±0,3	50,0±0,0	-
***L. reuteri* P_{9-1}**	48,42±0,6	52,90±0,0	1,12±0,3	62,5±0,4	60,0±0,0	-
***L. vaginalis* P_{16-2}**	51,00±0,5	60,67±0,3	1,15±0,6	57,9±0,3	72,5±0,0	-
***L. vaginalis* P_{58}**	48,00±0,1	55,78±0,7	0,57±0,5	-	-	+
***L. vaginalis* P_{64A}**	51,98±0,8	63,00±0,5	1,37±0,3	-	30,0±0,0	+
***L. vaginalis* P_{74C}**	55,56±0,6	56,87±0,5	0,28±0,2	62,6±0,4	-	+

Nota: Isolados crescidos em aerobiose por 72 h. * PBS= tampão Meio** = meio MRS livre de células

A atividade hemolítica dos biossurfactantes foi relatada pela primeira vez por Bernheimer e Avigad (1970) ao observarem que a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis,* lisou células do sangue. Desde então, o teste de hemólise tem sido utilizado para avaliar a produção de surfactina (MORAN et al., 2002) e ramnolipídeos (JOHNSON et al., 1980) e também como método de seleção de novos isolados produtores de biossurfactantes (BANAT 1993, CARRILO et al., 1996). Considerando que outras biomoléculas, que não biossurfactantes, também podem lisar as células sanguíneas e que os biossurfactantes podem não difundir no meio (CARRILO et al., 1996), os ensaios podem resultar em resultados falso positivos ou falso negativos. Assim, os resultados devem ser confirmados por outros métodos, como os usados neste estudo.

5.2.2 Atividade antimicrobiana dos compostos selecionados

Dentre as 19 linhagens de *Lactobacillus* avaliados, sendo seis *L. crispatus*, cinco de *L. gasseri*, três de *L. jensenii*, dois de *L. johnsonii* e um isolado de *L. colehominis, L. vaginalis* e *L. reuteri,* somente os extratos intracelulares de *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}, inibiram o crescimento das seguintes espécies *S. saprophyticus*, *E. coli*, *E. aerogenes* e *K. pneumoniae* a uma concentração de 16 $\mu g.mL^{-1}$, para *C. albicans* houve inibição na concentração de 128 $\mu g.mL^{-1}$. A

atividade antimicrobiana de diversos biossurfactantes contra micro-organismos de importância clínica já foi relatada, incluindo a surfactina e iturina produzidos por *Bacillus subtilis* (AHIMOU et al., 2000), ramnolipídeos produzidos por espécies de *Pseudomonas* spp. (ABALOS al et. 2001, BENINCASA et al, 2004), e biossurfactantes produzidos por *Aspergillus ustus* MsF3 (KIRAN et al., 2009). Outros estudos demonstraram a atividade antimicrobiana de biossurfactantes produzidos por *S. thermophilus* e *L. lactis* 53 contra várias bactérias e leveduras isoladas de prótese de voz (RODRIGUES et al., 2006a, 2006b). A atividade antimicrobiana de biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus* spp. tem apresentado resultados promissores quanto às suas propriedades biológicas. Os compostos produzidos por *L. paracasei, L. agilis* e *L. animalis* foram ativos contra *S. aureus, S. agalatiae e P. aeruginosa* (FERNANDES, 2013). Gudiña e colaboradores (2010) descreveram também a atividade antimicrobiana de um biossurfactante produzido por *L. paracasei* contra *E. coli, S. agalactiae* e *S. pyogenes* em percentuais que variaram entre 83,5 a 96.7 % a uma concentração de 25 $mg.mL^{-1}$. Para os biossurfactantes testados neste trabalho foi obtido uma inibição microbiana que variou de 90 a 95 % em uma concentração 16 $\mu g.mL^{-1}$, que corresponde a uma concentração dentro dos valores praticados pela indústria farmacêutica para atividade antimicrobiana de composotos e ainda abaixo da concentração apresentada por *L. paracasei.*

5.2.3 Ensaio de autoagregação e coagregação

Os isolados com resultados positivos para atividade emulsificante (n=19) foram avaliados quanto à capacidade de autoagregação (Figura 10) e coagregação a patógenos. Dentre os 19 avaliados, *L. gasseri* $P_{16\text{-}1}$, *L. jonhsonii* P_{19} e *L. reuteri* $P_{9\text{-}1}$, apresentaram maiores percentuais de autoagregação, 18,0 %, 20,8 % e 36,6 %, respectivamente, a partir de uma hora de sedimentação, chegando a 28,3 %, 37,9 % e 55,1 % respectivamente, após 4 horas (Figura 10). Os demais isolados apresentaram índices entre 4,28 % e 29,57 % após 4 horas de sedimentação (dados não mostrados).

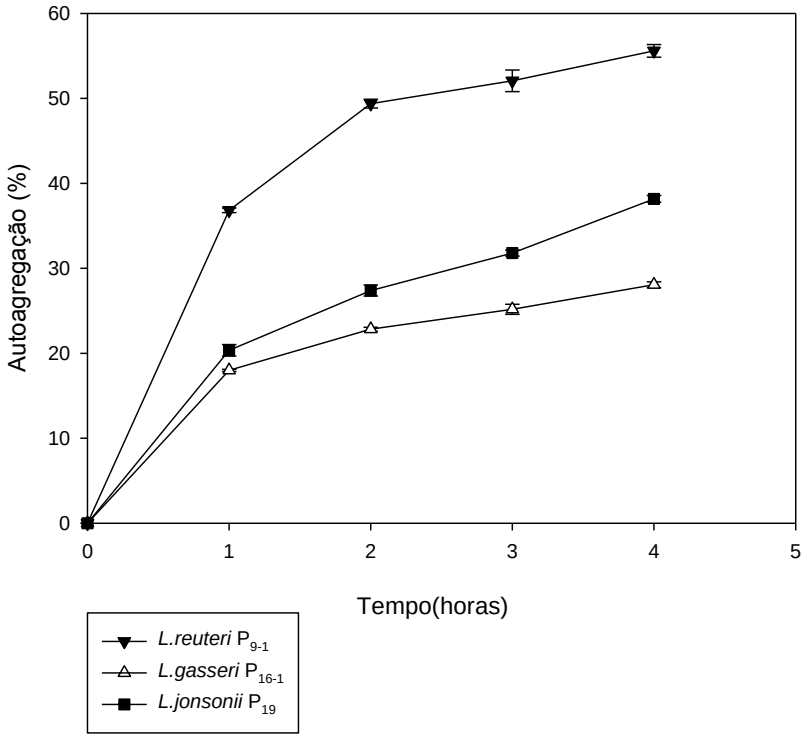


Figura 10: Valores de porcentagem de autoagregação dos isolados de *L. jensenii* P_{9-1}, *L. gasseri* P_{16-1} e *L. jonsonii* P_{19} durante 4 horas de sedimentação

Alguns trabalhos veem sendo realizados a fim de avaliar a habilidade de autoagregação de micro-organismos com poder probiótico. Uma vez, que a autoagregação é uma importante característica destes isolados, fazendo com que estes micro-organismos colonizem mais rapidamente seu ambiente, e com diminuindo ou impedindo a agregação de outras espécies de micro-organismos como, patógenos (VOLTAN et al.; PASCUAL et al., 2008). Vários estudos tem mostrado a capacidade de autoagregação de micro-organismos. Pan e colaboradores (2008) cultivaram *Cl. Butyricum* em caldo MRS e o mesmo apresentou alto poder de autoagregação. Outros autores mostraram que o isolado de *L. paracasei* produziu grânulos macroscópicos claramente observáveis e visíveis em microscópio ótico, sugerindo que a autoagregação pode estar relacionada a componentes presentes na superfície celular e à diminuição na agregação de patógenos à superfície (GUDIÑA et al., 2010). O isolado *L. reuteri* P_{9-1} apresentou 54 % de autoagregação semelhante ao citado no trabalho realizado com *L. paracasei,* em torno de 55.1 %, mostrando

semelhança na capacidade de autoagregação entre espécies diferentes de *Lactobacillus* spp.

Além dos mecanismos de inibição da adesão de micro-organismos patogênicos pela produção de moléculas tensoativas, que formam filmes condicionantes, os lactobacilos, podem se coagregar a estes micro-organismos impedindo que os mesmos colonizem o hospedeiro. Deste modo, a coagregação entre bactérias da microbiota normal e patógeno tem sido considerada como uma estratégia de exclusão de bactérias patogênicas (REID et al., 1988; SPENCER & CHESSON, 1994). Entre os 19 isolados de lactobacilos avaliados, *L.crispatus* $P_{8\text{-}1}$ e *L. crispatus* P_{75A} apresentaram índices de coagregação de 20 % e 38,8 % respectivamente, para *E. coli*, enquanto que os isolados de *L. crispatus* P_{61A} e *L. jensenii* P_{6A} apresentaram índices de coagregação de 20 % e 25,9 %, respectivamente, para *C. albicans*. Para os demais micro-organismos e isolados de *Lactobacillus* os índices não ultrapassaram 15 % de coagregação. Com os resultados obtidos, pode-se perceber que a espécie de *L. crispatus* $P_{8\text{-}1}$ apresentou uma maior afinidade para se coagregar aos micro-organimos patogênicos.

Em estudo realizado por Boris e colaboradores (1998) foi relatado a coagregação entre *C. albicans* e *L. acidophilus*, esta afinidade entre os micro-organismos foi confirmada por microscopia de varredurra, com formação de grandes agregados entre os micro-organismos (ETGETON et al., 2011). Recentemente, Gomaa (2013) observou que *L. delbruecki* foi capaz de se coagregar com *S. aureus* 1351 e *C. albicans* ATCC 70014, com percentuais de 48,88 % e 59,37 %, respectivamente. Em contrapartida, Pan e colaboradores relataram que a capacidade de coagregação entre *L. acidophilus* e *L. delbruecki* com *Clostridium butirycum* foi de apenas 5,76 % ± 1,2 e 6,32 ± 1,6 (PAN et al., 2008). Estes dados mostram que a capacidade de coagregação é variável entre os diferentes gêneros e espécies e ainda, entre isolados da mesma espécie de bactérias lácticas.

5.2.4. Caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos por 19 isolados

Os extratos obtidos de culturas de 19 isolados de *Lactobacillus* e que apresentaram atividade emulsificante foram caracterizados quanto à concentração de carboidratos, proteínas e lipídeos (Tabela 8). As análises indicam uma variação na presença de carboidratos totais, de 0,24 % a 96,35 %, de proteínas de 0,06 % a 61,76 % e de lipídeos de 0,06 % a 80,68%. Pode-se observar que 4 isolados de *L. crispatus* apresentaram mesmo perfil estrutural com maior porcentagem de lipídeos. As outras espécies apresentaram perfis variados entre os isolados. Estes percentuais diferenciados sugerem uma diversidade nas estruturas dos compostos ativos de superfície pelos diferentes isolados de *Lactobacillus* estudados.

Outros biossurfactantes com esta composição já foram descritos, incluindo o Yansan, bioemulsificante produzido por *Yarrowia lipolytica*, constituído de um complexo de lipídeos, carboidratos e proteínas (AMARAL et al., 2006). Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 apresenta constituintes hidrofóbicos (ácidos graxos de 10 a 18 carbonos) e proteínas em sua estrutura que estão relacionados a sua alta atividade emulsificante e ao seu poder de estabilizar emulsões (GUTNICK & SHABTAL, 1987; KAPLAN et al., 1987). Os números variáveis de carbonos em sua cadeia lipídica podem ser obtidos dependendo do tipo e das combinações de ácidos graxos hidroxilados e não hidroxilados utilizados para o crescimento do micro-organismo (ZHANG et al., 1999).

Tabela 8: Caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos por 19 isolados de *Lactobacillus* spp. positivos para atividade emulsificante e/ou surfactante

Isolados	*Composição(%)*		
	Carboidratos	**Proteínas**	**Lipídeos**
***L.colehominis* P_2**	26,17	30,67	40,78
***L.crispatus* P_1**	14,87	10,58	10,35
P_{57B}	11,54	17,06	50,98
P_{61A}	4,00	8,59	55,67
P_{66}	2,67	1,79	65,78
P_{75A}	5,12	25,92	69,75
P_{8-1}	83,74	12,04	0,08
***L.gasseri* P_{16-1}**	78,65	6,35	7,65
P_{60A}	6,45	61,76	5,87
P_{65}	38,61	9,81	49,53
P_{68A}	0,34	0,14	80,68
P_{74D}	0,77	14,15	60,12
***L.jensenii* P_{69D}**	4,80	0,05	70,34
P_{6A}	51,49	15,17	29,45
P_{73A}	13,97	16,59	70,33
***L.johnsonii* P_{19}**	0,24	12,17	78,94
P_{9-3}	38,28	53,78	5,85
***L.reuteri* P_{9-1}**	27,45	60,54	9,89
***L.vaginalis* P_{16-2}**	96,35	0,64	0,06

5.3 Atividade biológica e caracterização físico-química de biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus jensenii* P_{6A} e *Lactobacillus gasseri* P_{65},

Estes isolados foram selecionados por apresentarem os melhores resultados nos experimentos anteriormente realizados.

5.3.1 Avaliação da capacidade de autoagregação e coagregação dos isolados *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} e influência da Camada S na agregação

A velocidade de sedimentação dos isolados de *Lactobacillus* foi medida ao longo de um período de 4 h, utilizando células lavadas ressuspensas em PBS (pH 7,0). Os isolados de *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} mostraram níveis de sedimentação depois de 4 h de incubação à temperatura ambiente, com valores correspondentes a 7,38 % e 10,74 %, respectivamente.

Após remoção da proteína da superfície celular de lactobacilos (camada S) pode-se observar que o índice de autoagregação dos isolados foi mais baixo que antes do tratamento, apresentando percentuais de até 5,0% e 6,8% para *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* $P_{65,}$ respectivamente. Do mesmo modo, foi observada uma diminuição na capacidade de coagregação dos isolados aos patógenos (Tabela 9 e 10). O maior percentual de redução foi apresentado entre o isolado *L. jensenii* P_{6A} e *E. coli,* com valores que variaram de 27,4 % para 1,4 %, após retirada da camada S. Alguns autores já tem revelado a importância dessa camada proteica na adesão de *Lactobacillus* spp. como foi revelado por Kos e colaboradores (2003) onde a remoção da camada proteica diminuiu a capacidade de autoagregação entre isolados de *L. acidophilus* M92. Em outro estudo, Golowczyc e colaboradores (2009) mostraram que o isolado de *L. kefir* teve uma diminuição na sua capacidade de adesão a leveduras do gênero *Candida*, após remoção da camada S.

Tabela 9: Habilidade de coagregação de patógenos por *L. jensenii* P6A após 4 horas de incubação em PBS

Micro-organismos patogênicos	***(%) coagregação Período de incubação (h)***				
	0	1	2	3	4
Escherichia coli	3,4±0,7	26,8±0,2	27,5±0,5	27,8±0,0	27,4±0,1
Staphylococcus saprophyticus	5,9±0,6	7,8±0,2	8,6±0,3	7,9±0,0	7,4±0,3
Enterobacter aerogenes	6,6±0,7	9,9±4,4	9,7±2,8	10,6±5,2	10,3±4,8
Klebsiella pneumoniae	17,3±0,6	10,2±0,2	7,3±0,4	10,4±0,1	7,2±0,4
Candida albicans	10,3±0,6	13,5±0,2	18,5±0,3	25,6±0,1	25,9±0,4
Candida krusei	6,9±0,7	16,7±0,9	1,5±0,5	4,5±0,1	6,9±0,5
Candida tropicalis	7,6±0,7	20,2±0,2	13,7±0,6	8,8±0,2	3,1±0,6
Aspergillus niger	2,0±0,7	0,3±0,2	0,3±0,3	0,9±0,1	1,7±0,1
		(%) coagregação após remoção da camada de proteína (camada S)			
Escherichia coli	1,4±0,5	2,8±0,6	1,5±0,2	1,2±0,0	1,4±0,4
Staphylococcus saprophyticus	0,7±0,2	3,5±0,0	2,8±0,0	8,9±0,0	2,4±0,2
Enterobacter aerogenes	2,8±0,1	1,5±0,4	0,1 ±0,8	2,7±5,2	3,3±0,4
Klebsiella pneumoniae	14,8±0,2	8,7±0,2	6,2±0,5	11,1±0,2	5,2±0,1
Candida albicans	8,7±0,3	10,5±0,1	15,2±0,2	17,1±0,0	15,2±0,6
Candida krusei	6,03±0,4	10,1±0,3	12,2±0,4	13,6±0,6	9,4±0,7
Candida tropicalis	4,9±0,0	10,3±0,0	11,8±0,0	6,4±0,1	0,1±0,5
Aspergillus niger	1,2±0,1	0,2±0,5	0,1±0,0	0,4±0,5	0,7±0,0

Média dos resultados de dois experimentos separados ± desvios padrões

Tabela 10: Habilidade de coagregação de patógenos por *L. gasseri* P65 após 4 horas de incubação em PBS

Micro-organismos patogênicos	***(%) coagregação*** *Período de incubação (h)*				
	0	1	2	3	4
Escherichia coli	5,5±2,8	3,3±2,6	3,1±3,6	2,6±3,4	4,5±11
Staphylococcus saprophyticus	6,5±2,6	4,6±2,4	6,0±3,2	7,8±3,0	6,6±5,2
Enterobacter aerogenes	2,6±2,9	5,9±2,7	5,9±3,6	7,8±3,6	9,7±6,2
Klebsiella pneumoniae	4,2±2,9	3,6±2,7	3,4±3,7	2,6±3,1	4,4±1,5
Candida albicans	8,9±2,7	2,3±0,9	8,4±5,6	10,7±5,9	7,5±4,1
Candida krusei	2,2±1,3	6,2±2,8	3,1±4,2	6,1±3,9	6,2±0,4
Candida tropicalis	9,0±2,6	10,9±2,4	25,4±6,9	9,6±5,9	11,9±1,0
Aspergillus niger	2.3±2,8	1,8±2,3	3,6±3,6	3,3±3,5	4,2±0,8
		(%) coagregação após remoção da camada de proteína (camada S)			
Escherichia coli	0,5±0,2	1,3±0,2	2,1±0,8	1,7±0,5	2,5±0,1
Staphylococcus saprophyticus	1,2±0,6	13,8±0,4	0,2±0,3	6,4±0,6	4,8±0,5
Enterobacter aerogenes	3,6±0,2	2,5±2,7	0,5±0,6	3,5±0,7	6,8±0,6
Klebsiella pneumoniae	5,8±0,8	6,3±0,2	9,9±0,7	3,4±0,3	2,6±0,1
Candida albicans	5,6±0,6	1,9±0,6	6,0±0,6	7,2±0,5	4,7±0,6
Candida krusei	2,5±0,1	6,6±0,7	1,8±0,2	4,6±0,6	2,1±0,6
Candida tropicalis	8,5±2,6	9,9±0,6	15,2±0,7	7,8±0,4	10,1±0,5
Aspergillus niger	0,6±2,8	0,3±0,2	1,4±0,5	2,7±0,3	4,5±0,6

Média dos resultados de dois experimentos separados ± desvios padrões

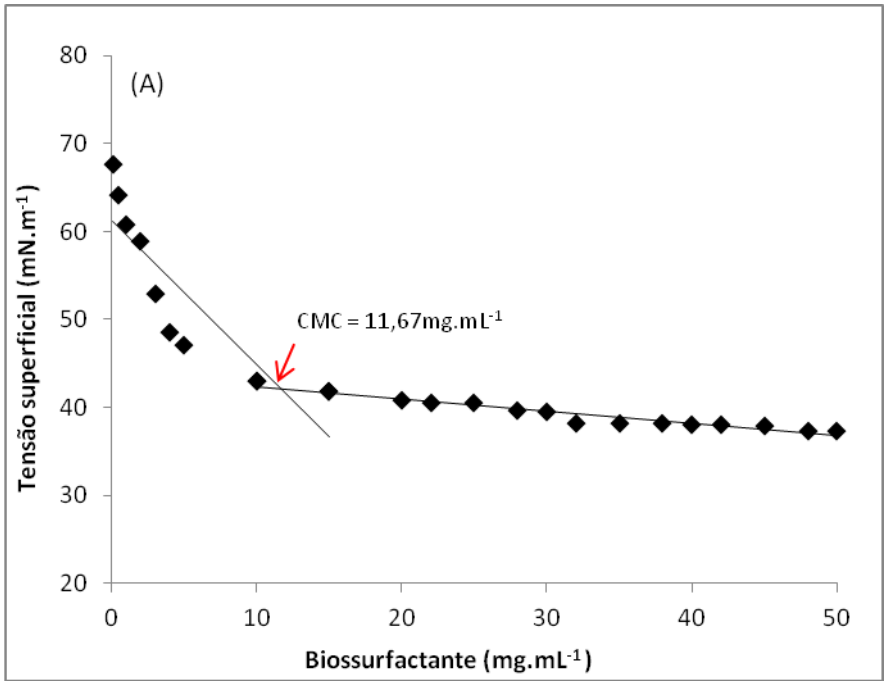
5.3.2 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio pelos isolados de *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

Após exposição das placas de MRS adicionadas de TMB inoculadas com *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} ao ambiente, não houve o aparecimento de coloração azul, indicativa da produção de peróxido de hidrogênio. Estudos têm mostrado a importância da microbiota vaginal como barreira para o desenvolvimento de infecções e da produção de peróxido de hidrogênio por lactobacilos na manutenção da saúde do trato geniturinário (RABE & HILLIER, 2003). A ausência ou redução na produção de peróxido de hidrogênio favorece o crescimento de anaeróbios, que em condições normais estão em menor número no canal vaginal (ODUYEBO et al., 2013). Embora alguns autores afirmem que deve haver relação entre a espécie e a capacidade de produção de H_2O_2 mas, não entre a origem da linhagem (proveniente de mulheres com ou sem VB) e a produção de H_2O_2

(JUAREZ et al., 2005), os dados encontrados neste estudo podem reforçar a mostram que estas espécies não são produtoras de peróxido de hidrogênio, consequentemente diminuindo a proteção da mucosa vaginal.

5.3.3 Determinação da concentração micelar crítica

Um importante parâmetro para avaliar a efetividade de um biossurfactante é a medida concentração micelar crítica. Este índice é usado para estimar a concentração mínima de um biossurfactante necessária para atingir o menor valor de tensão superficial, nesta concentração começam a se formar os agregados de micelas (RON & ROSEMBERG, 2001; MULLIGAN, 2005). Uma diminuição nos valores de tensão superficial foi observada com o aumento da concentração de biossurfactantes (Figuras 11). Os valores de concentração micelar crítica correspondem a 11,34 $mg.mL^{-1}$ (±0,03) e 11,67 $mg.mL^{-1}$ (±0,05) para *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}, respectivamente. Esses dados mostram que acima destas concentrações a tensão superficial permanece estável, não havendo nenhuma redução significativa com o aumento da concentração. Os valores de CMC se encontram dentro da faixa já descrita para diferentes moléculas tensoativas produzidas por micro-organismos que variam entre 1,0 $mg.mL^{-1}$ a 20,0 $mg.mL^{-1}$(RODRIGUES et al., 2006) e abaixo dos valores encontrados para a surfactina, lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis*, que apresentou CMC de 19 $mg.ml^{-1}$ (BARROS et al., 2008). Por outro lado, o biossurfactante produzido *L. paracasei* apresentou CMC de 2,5 $mg.mL^{-1}$ (GUDIÑA et al., 2010), *L. fermentum* (RC-14 e B54) apresentaram CMC de 1,0 $mg.L^{-1}$ e 2,5 $mg.mL^{-1}$, respectivamente (VELREADS et al., 1996a) valores bem próximos do surfactante sintético, dodecilsulfato de sódio (SDS) que apresenta CMC de 2,1 $mg.mL^{-1}$ (CHEN et al., 2006).



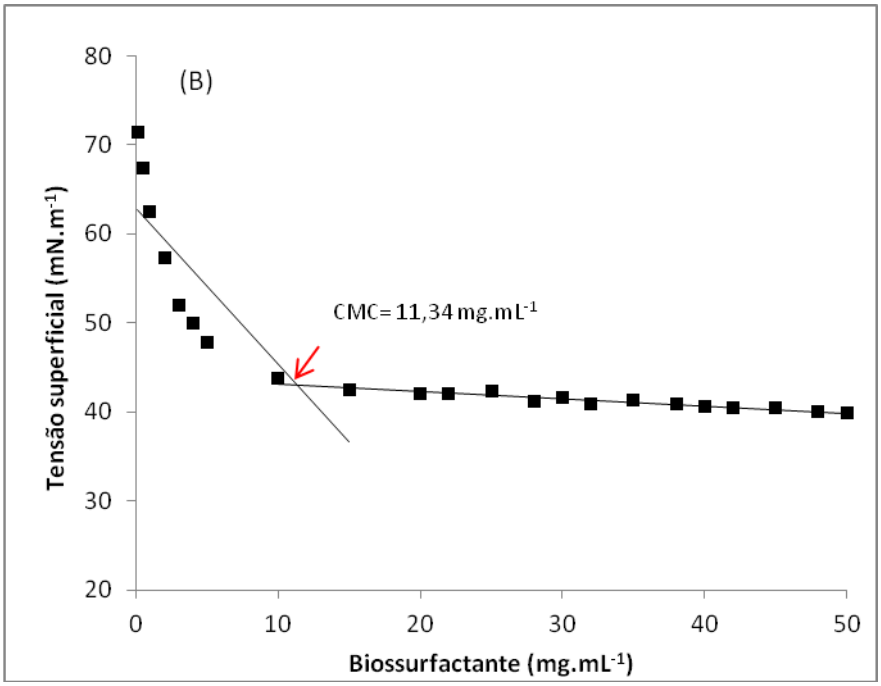


Figura 11: Efeito da concentração do biossurfactante na tensão superficial. A CMC foi determinada pela intercessão da linha de regressão que melhor descreve as duas partes da curva, acima e abaixo da CMC. (A) CMC do biossurfactante produzido por *L. jensenii* P_{6A}. (B) CMC do biossurfactante produzido por *L. gasseri* P_{65}

5.3.4 Determinação do efeito da concentração dos biossurfactantes sobre a atividade emulsificante

A relação entre a concentração dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} e a atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (*E24*) foi avaliada utilizando uma fase orgânica de tolueno (Figura 12).

De forma geral, os valores de índice de emulsificação foram crescentes com o aumento da concentração do biossurfactante até a concentração de 20 $mg.mL^{-1}$. Para o biossurfactante produzido por *L. jensenii* $P_{6A,}$ os valores variaram de 21 % nos ensaios contendo 0,5 $mg.mL^{-1}$ do biossurfactante para 88,7 % nos ensaios com 20,0 $mg.mL^{-1}$. A partir de 1 $mg.mL^{-1}$ não houve aumento significativo na atividade emulsificante ($P>0,05$). Nenhuma atividade emulsificante foi observada nos ensaios com concentrações abaixo de 0,25 $mg.mL^{-1}$. Já para o biossurfactante produzido por *L. gasseri* $P_{65,}$ o índice de emulsificação variou de 10,0 % nos ensaios com 1,0 $mg.mL^{-1}$ para 77,0 % nos ensaios com 20,0 $mg.mL^{-1}$. Após a concentração de 5 $mg.mL^{-1}$ não houve aumento significativo na atividade emulsificante ($P>0,05$). A estrutura química destes compostos pode levar a variações na saturação da atividade emulsificante. Um bioemulsificante produzido por *Penicillium* sp., apresentou o aumento na atividade emulsificante até a concentração 66,7 $mg.mL^{-1}$, este composto apresenta em sua estrutura uma alta concentração de compostos orgânicos como: ácido mirístico e ácido oleico (LUNA-VELASCO et al., 2007). Em contrapartida, outros bioemulsificantes apresentaram valores similares , com atividade emulsificante máxima em concentrações de 2 $mg.mL^{-1}$ e de 4 $mg.mL^{-1}$, podendo apresentar estrutura química semelhante (LUNA-VELASCO et al., 2007; CAMARGO-DE-MORAIS et al., 2003).

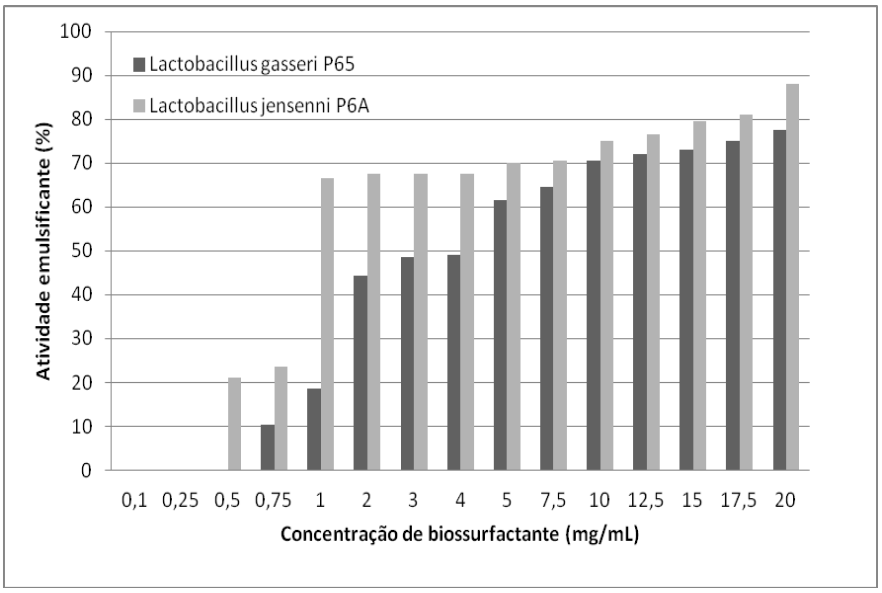


Figura 12: Efeito da concentração dos biossurfactantes produzido por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} na atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (*E24*), usando tolueno como composto hidrofóbico

5.3.5 Avaliação da estabilidade dos biossurfactantes

Considerando que a atividade emulsificante de compostos tensoativos microbianos pode ser explorada em diversos setores industriais, e que a aplicabilidade destas biomoléculas em vários setores depende de sua estabilidade a diferentes valores de pH e temperaturas, presença de eletrólitos e ainda, da capacidade de emulsificação de diferentes fases orgânicas, estes parâmetros foram avaliados para biomoléculas produzidas por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}.

5.3.5.1 Estudo da atividade emulsificante em diferentes valores de pH

A estabilidade das emulsões formadas pelos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} não variaram nos testes com valores de pH entre 2 a 10, ficando os índices de emulsificação em torno de 66,34 % (±1,1).

Embora as atividades emulsificantes dos compostos produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} não tenham sido alteradas pela faixa de pH avaliada, a perda de atividade dos compostos produzidos por outros lactobacilos em condições

ácidas já foi descrita. Os autores atribuíram a perda de atividade à presença de grupos de carga negativa à parte polar das moléculas (PORTILLA-RIVERA et al., 2008), levando à neutralização dos compostos nesta faixa de pH (VELRAEDS et al., 1996, HOWARD et al., 2000; RODRIGUES et al. 2006b).

5.3.5.2 Estudo de estabilidade dos biossurfactantes após exposição a 100 ºC

A exposição dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} à temperatura de 100°C por até 60 min não afetou a atividade emulsificante. Os índices de emulsificação para estes ensaios foram calculados em 66 % (± 2,82) e 64 %, respectivamente. Gudiña e colaboradores (2010) também relataram a estabilidade do biossurfactante produzido por *L. paracasei* após exposição por 120h a 60°C. Em outro estudo, Desai e Banat (1997) observaram que o tratamento térmico (autoclavagem a 120° C por 15 min) de biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* e *Bacillus* spp., provocou mudanças na atividade emulsificante. A estabilidade do biossurfactante quando submetido a elevadas temperaturas, sugere sua utilização em indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos, principalmente onde se faz necessário a esterilização nos processos industriais (KHOPADE et al., 2011).

5.3.5.3 Influência da adição de eletrólitos na atividade emulsificante

Os testes de adição de cloreto de potássio e bicarbonato de sódio às emulsões formadas com tolueno pelos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} mostraram que a alteração da concentração de íons não afetou as emulsões formadas. Os índices de emulsificação dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} permaneceram entre 62% e 65,3%, respectivamente, quando se adicionou cloreto de potássio mesmo em concentrações de sais acima dos limites de saturação. Ao adicionar bicarbonato de sódio também não houve alteração nos índices de emulsificação, permanecendo entre 58,43 % e 65,54 % para o biossurfactante produzido por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* $P_{65,}$ respectivamente. Por outro lado, a adição de 800 µg

a 2000 µg de cloreto de sódio às emulsões resultou na diminuição da altura da camada emulsionada em torno de 30 % quando se avaliou o biossurfactante produzido por *L. jensenii* P_{6A} e 31 % para o biossurfactante produzido por *L. gasseri* $P_{65.}$ podendo considerar que uma alteração da carga pode levar à floculação. Trabalhos anteriores demonstraram que a atividade emulsificante dos surfactantes comerciais como, Tween 80 e dodecil sulfato de sódio (SDS) tendem a diminuir com o acréscimo de NaCl, caindo cerca de 10 % em uma concentração de 12 % do sal (PHETRONG et al., 2008). Apesar de os tensoativos biológicos serem menos sensíveis à ação dos eletrólitos (LUNA-VELASCO et al., 2007, SINGH et al., 2007), alguns deles também podem perder muito de sua atividade emulsificante quando expostos a altas concentrações de NaCl (ILORI et al., 2005). Alguns autores têm demonstrado que a adição de sal pode levar a uma redução da estabilidade de emulsões óleo/água, nas quais o agente emulsionante possua proteína em sua estrutura. Nessas emulsões, as gotículas de gordura possuem carga elétrica resultante dos grupamentos proteicos e da água, com a adição de sal há uma redução das forças de repulsão entre as gotículas de gordura que, então, tendem a se aproximar levando à floculação e à perda de estabilidade (DAS & KINSELLA, 1990). A estabilidade a altas concentrações de sais é muito importante na indústria, principalmente coméstica, uma vez que os biossurfactantes têm sido muito utilizados na formulação de produtos de beleza como shampoos e condicionadores, onde se usam bases galênicas com altas concentrações de sais (GHARAEI-FATHABAD, 2010), também na recuperação de petróleo de ambientes marinhos, onde a salinidade chega a 3 %.

5.3.5.4 Determinação da atividade emulsificante em diferentes fases orgânicas

Os biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} apresentaram capacidade de emulsificação diferenciada frente aos diferentes substratos hidrofóbicos avaliados. O composto ativo de superfície produzido por *L. jensenii* P_{6A} emulsificou os substratos querosene, tolueno, hexano, xileno. Para os óleos vegetais (algodão, oliva girassol) os valores de *E24* variaram de 61 % a 70 %,

emulsificou o óleo diesel (28,3 %), mas apresentou baixos índices de emulsificação para a gasolina e hexadecano (Figura 13).

Avaliando a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *L. gasseri* P_{65} (Figura 14), observaram-se maiores índices de emulsificação quando foram usados óleos vegetais (algodão, oliva e girassol) como substrato hidrofóbico, apresentando menores índices de emulsificação quando se utilizou os solventes: gasolina, óleo diesel, hexano, xileno e hexadecano. Para os solventes querosene e tolueno os índices foram de 28,0 % e 64,6 %, respectivamente.

A estabilidade das emulsões produzidas pelos biossurfactantes estudados neste trabalho sugere o possível uso destes na indústria alimentícia, onde é desejável que os compostos ativos de superfície de origem microbiana sejam capazes de produzir emulsões estáveis, de melhorar a textura de produtos alimentícios, de retardar o endurecimento de cremes e pastas, e ainda, de emulsificar flavorizantes oleosos (NISTSCHKE & COSTA, 2007). Estes compostos podem também ser interessantes para indústria cosmética, onde um biossurfactante com poder de emulsificar vários óleos vegetais pode ser usado como agente emulsificante e espumante (GHARAEI-FATHABAD, 2010).

Vários estudos têm mostrado que biossurfactantes poliméricos de alta massa molecular podem variar quanto a sua capacidade de emulsificar diferentes compostos hidrofóbicos (BENINCASA et al., 2002). Os diferentes resultados apresentados pelo biossurfactante de *L. jensenii* P_{6A} quando se usou óleo diesel e gasolina pode ser explicado pelo fato destes substratos serem constituídos por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, entretanto os componentes da gasolina possuem cadeias carbônicas menores, o óleo diesel possui uma densidade maior (CAMARGO-DE-MORAIS et al. 2003; LUNA-VELASCO et al. 2007). Os óleos vegetais por sua vez, possuem uma composição diferente dos hidrocarbonetos, sendo compostos, sobretudo, por triglicerídeos. No entanto estes compostos já demonstraram bons índices de emulsificação quando se usou

óleo de oliva produzido por *Penicillium citrinum* (CAMARGO-DE-MORAIS et al. 2003; DASTGHEIB et al., 2008).

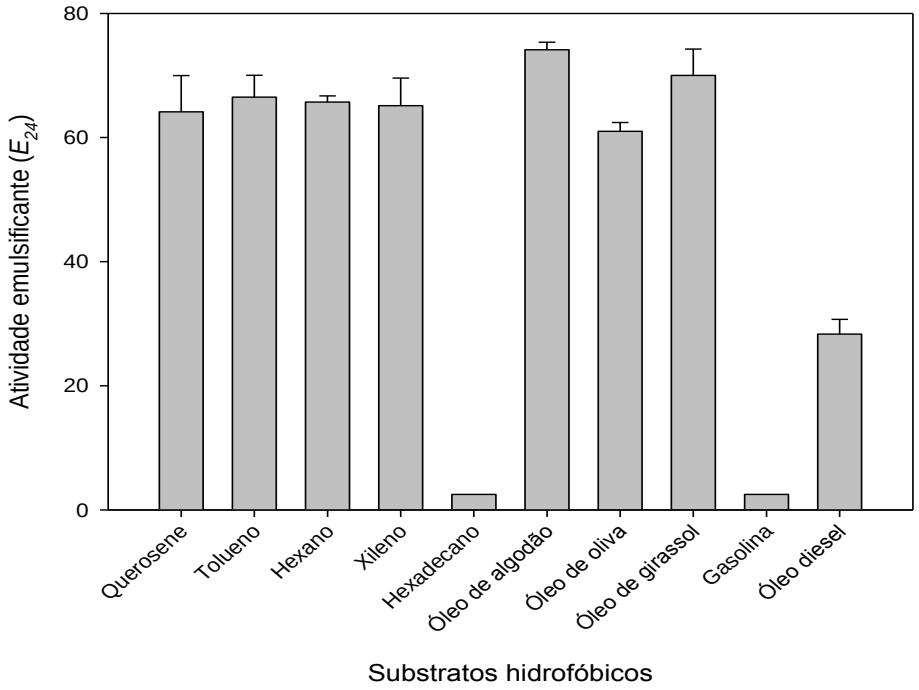


Figura 13: Atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *L. jensenii* P_{6A} na concentração de 5 mg.mL-1 na fase aquosa, utilizando diferentes substratos hidrofóbicos. Atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (*E24*)

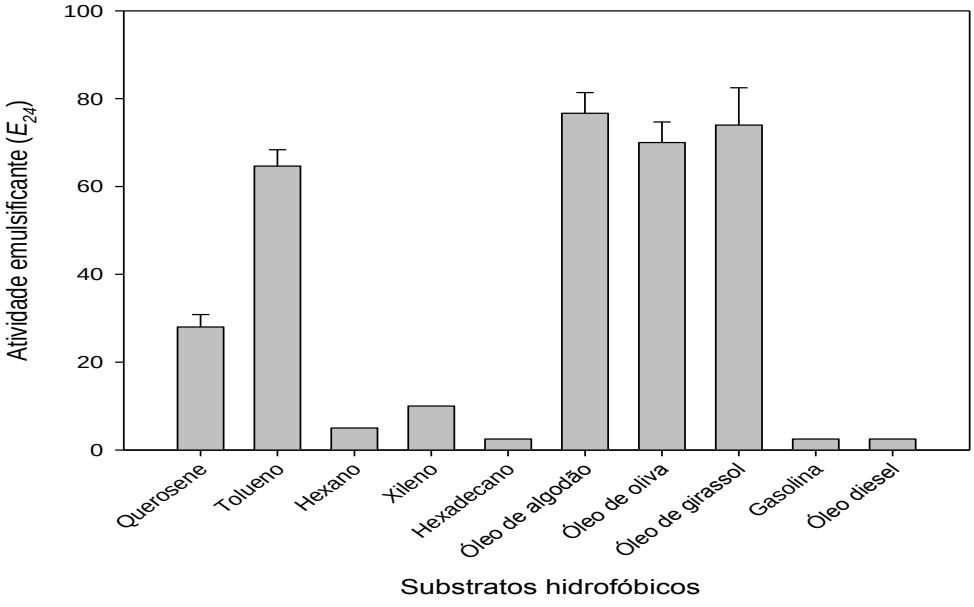


Figura 14: Atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *L. gasseri* P_{65} na concentração de 5 mg.mL^{-1} na fase aquosa, utilizando diferentes substratos hidrofóbicos. Atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (*E24*)

5.3.6 Utilização dos biossurfactantes na redução de biofilmes de micro-organismos patogênicos formados em superfícies de placas de poliestireno

Para avaliar a capacidade de redução de biofilmes por dois isolados de lactobacilos, *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}, foram usados os seguintes micro-organismos: *E. coli*, *S. saprophyticus*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *C. krusei* e C*. tropicalis.* O isolado de *L. jensenii* P_{6A} apresentou percentuais de 64 % de redução de biofilme formado por *E. aerogenes* a uma concentração de 180 $\mu L.mL^{-1}$ de extrato intracelular. Para os outros micro-organismos, a redução não passou de 36 % na mesma concentração (Figura 15).

Avaliando os resultados obtidos para extrato intracelular do isolado *L. gasseri* P_{65}, pode-se observar que os maiores percentuais de redução de biofilme foram apresentados para *C. krusei* (36,3 %) *E. coli* (46,4 %) *S. saprophyticus* (39,1 %) e para os demais micro-organismos os valores de redução de biofilme foram de até 33 % (Figura 16).

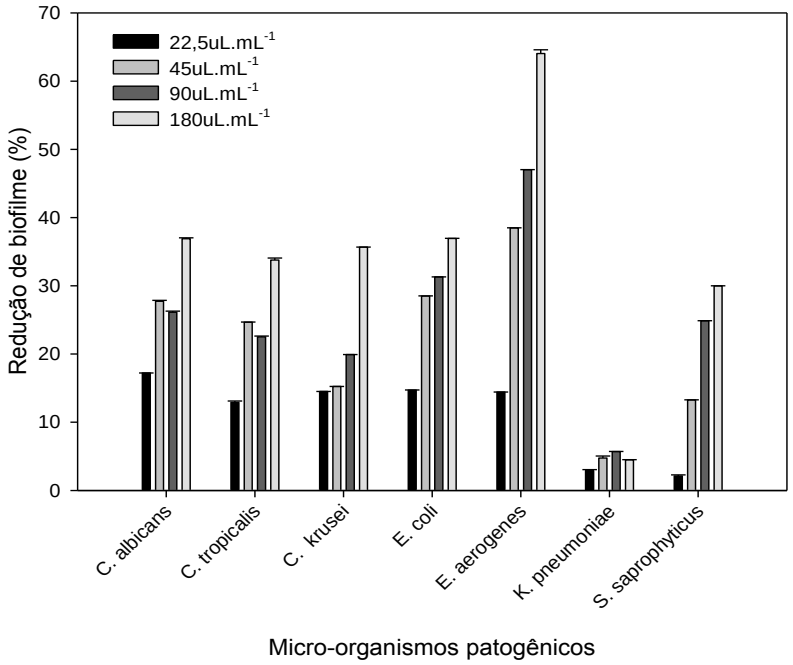


Figura 15: Percentual de redução de biofilmes de micro-organismos patogênicos formados na superfície de placas de poliestireno, na presença de diferentes concentrações de extrato intracelular produzidos por *Lactobacillus jensenii* P_{6A}. Ensaio realizado após 24 h de incubação e em quatro repetições

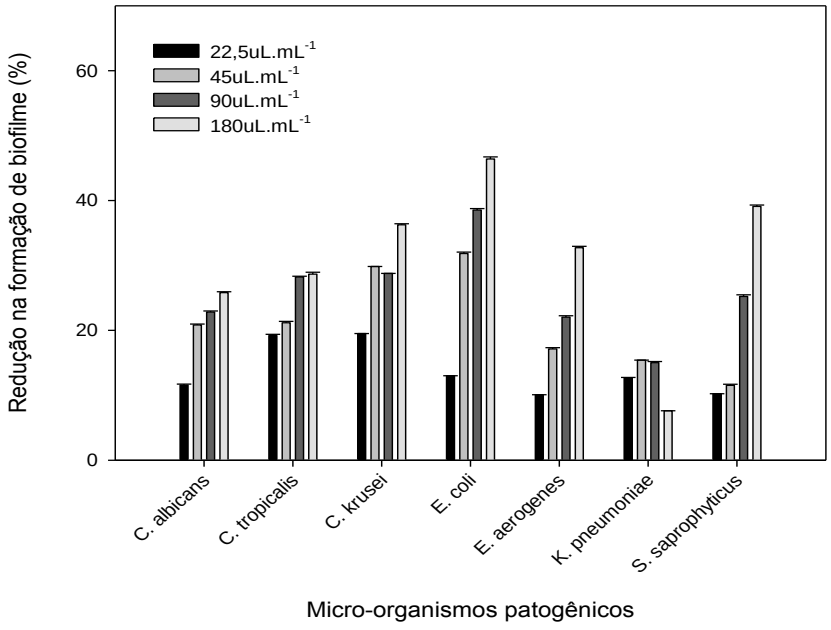


Figura 16: Percentual de redução de biofilme de micro-organismos patogênicos formados na superfície de placas de poliestireno, na presença de diferentes concentrações de extrato intracelular produzidos por *Lactobacillus gasseri* P_{65}. Ensaio realizado após 24 h de incubação e em quatro repetições.

Assim como neste trabalho outros autores vem elucidando a capacidade de inibição de formação de biofilme por biossurfactantes produzidos por diferentes micro-organismos, incluindo espécies de *Lactobacillus*. Gudiña e colaboradores (2010) observaram que o biossurfactante produzido por *L. paracasei* foi capaz de inibir a adesão de *S. aureus* em torno de 70 % a uma concentração definida de 25 $mg.mL^{-1}$. Em outro estudo, já foi observado que biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus* inibiram a formação de biofilme de *C. albicans* entre 81 % a 82 % a concentrações de 312,5 $\mu g.mL^{-1}$ e 625 $\mu g.mL^{-1}$ (GUDIÑA et al., 2013).

5.3.7 Avaliação da atividade antiadesiva dos compostos produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

Devido à afinidade por superfícies, os biossurfactantes têm sido usados como uma nova estratégia para inibir a adesão microbiana em superfícies abióticas e mucosas. Esta atividade antiadesiva dos biossurfactantes parece estar relacionada às mudanças nas características iniciais hidrofílicas ou hidrofóbicas das superfícies dos materiais expostos a estes compostos (NEU, 1996). Diante disso, foi avaliada a capacidade de inibição da adesão de micro-organismos patogênicos após acondicionamento das placas de poliestireno com soluções de biossurfactantes. O biossurfactante produzido por *L. jensenii* P_{6A} apresentou maior inibição de adesão para *C. krusei,* seguida de *S. saprophyticus* e *E. aerogenes* com valores de 47 %, 44 % e 40 %, respectivamente. Enquanto que o composto produzido por *L. gasseri* P_{65} apresentou maior inibição para *E. coli* e *K. pneumoniae,* com valores 38 % e 32 %, respectivamente (Figuras 17 e 18). Provavelmente a inibição de adesão ocorreu devido a formação de um filme condicionante na superfície da placa, após o tratamento com os biossurfactantes.

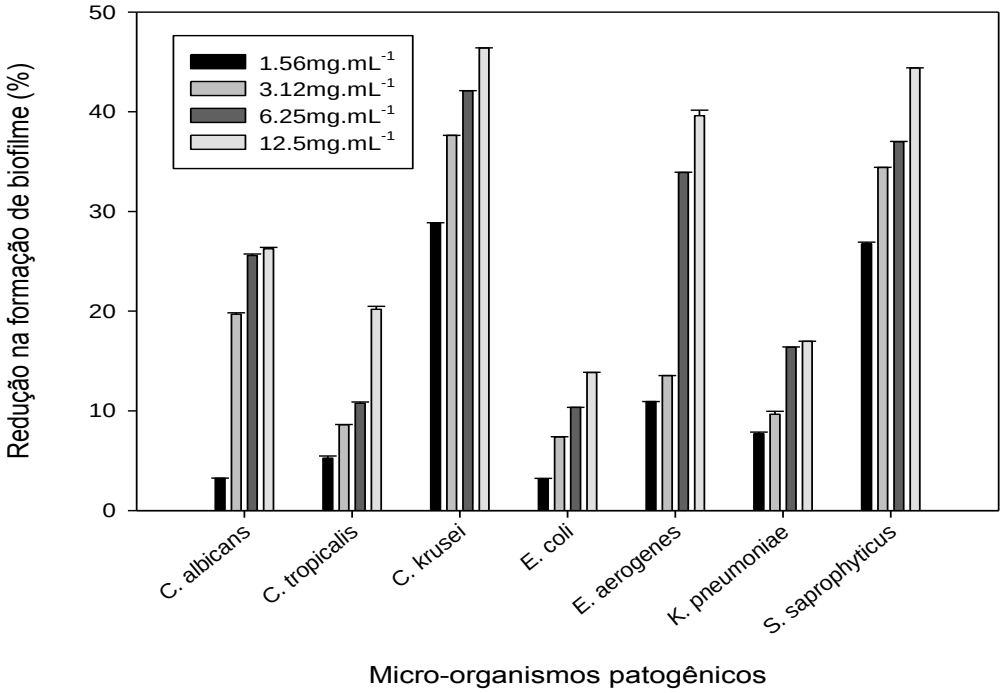


Figura 17: Porcentagem de redução adesão de micro-organismos patogênicos à superfície de placas de poliestireno condicionadas com biossurfactante produzido por *Lactobacillus jensenii* P_{6A}

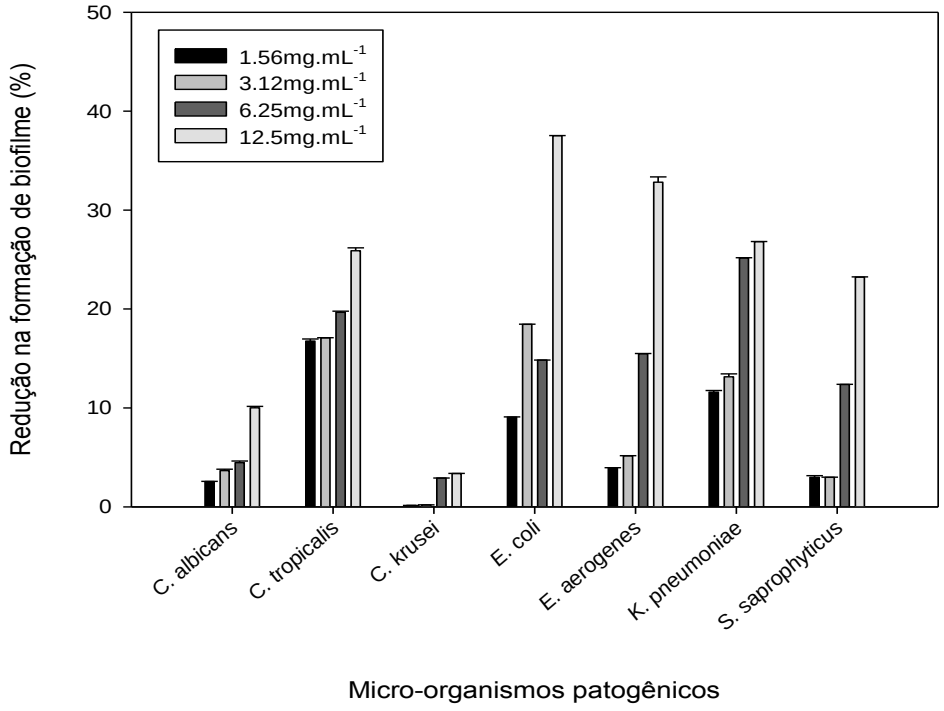


Figura 18: Porcentagem de redução da adesão de micro-organismos patogênicos á superfície de placas de poliestireno condicionadas com biossurfactante produzido por *Lactobacillus gasseri* P_{65}

Estudos têm mostrado que o pré-condicionamento de superfícies com biossurfactantes podem inibir ou diminuir a formação subsequente de biofilmes (MEYLHEUC et al., 2006; FALAGAS et al., 2009). Mirelles e colaboradores (2001) observou que o tratamento de cateteres uretrais com surfactina inibiu totalmente a formação de biofilmes de *Salmonella entérica*, *E. coli* e *Proteus mirabilis*. Em outro estudo foi relatada a inibição da adesão de bactéria entérica patogênica *E. faecalis* por biossurfactante produzido por *Lactobacillus acidophyllus* (VELRAEDS et al., 1996). Recentemente, Colchis e colaboradores (2012) demonstraram que biossurfactantes produzidos por bactérias endofíticas foram capazes de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* em resinas e materiais siliconados de dispositivos médicos. Resultados como estes têm sugerido o uso de biossurfactantes com propriedades antiadesivas no controle de biofilmes em superfícies diversas.

5.3.8 Determinação da hidrofobicidade celular dos micro-organismos patogênicos após incubação com os biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

A hidrofobicidade celular dos micro-organismos foi quantificada a fim de relacionar a alteração na superfície celular ocorrida após exposição dos micro-organismos aos biossurfactantes. Os percentuais de células aderidas ao hexadecano foram de 27 %, 11 % e 2 % para *C. krusei*, *S. saprophyticus* e *E. aerogenes,* após 24 h de incubação com o biossurfactante produzido por *L. jensenii* $P_{6A.}$ Para o biossurfactante produzido por *L. gasseri* P_{65} os percentuais de células aderidas ao hexadecano foram de 17 % e 1,5 % para *E. coli* e *E. aerogenes* (Figura 19). Segundo Chae e colaboradores (2006), os micro-organismos avaliados neste estudo podem ser classificados como fortemente hidrofóbicos, por apresentarem percentuais acima de 30 % de adesão celular ao hexadecano. Autores sugerem que a hidrofobicidade das células microbianas pode influenciar a adesão a superfícies inertes. Em superfícies hidrofóbicas, as interações hidrofóbicas são consideradas as principais forças envolvidas e, portanto a hidrofobicidade da parede celular exerce forte influência na adesão (SOMMER, et al., 1999).

Alterações na hidrofobicidade da superfície celular podem impedir a adesão ou mesmo desprender biofilmes pré-formados. As alterações na hidrofobicidade celular destes micro-organismos após a exposição aos biossurfactantes reforçam os resultados obtidos na redução de biofilme e inibição de adesão microbiana, mostrados anteriormente.

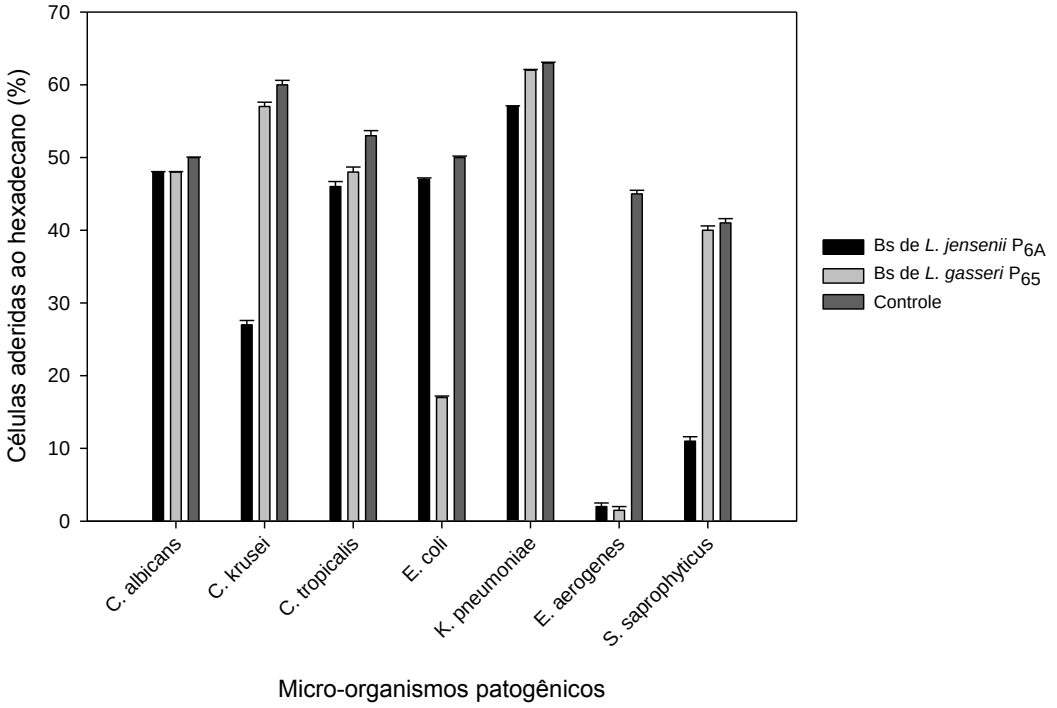


Figura 19: Hidrofobicidade celular de micro-organismos patogênicos após exposição de 24h aos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}, expressa em percentuais de células aderidas ao hexadecano

5.3.9 Caracterização dos ácidos graxos e monossacarídeos por cromatografia gasosa dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

As análises de ésteres de ácidos graxos da porção lipídica dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} indicaram a presença de 5 tipos de ácidos graxos com diferentes tipos de saturações, e com cadeias contendo de 12 a 20 carbonos. As análises indicaram uma maior concentração de ácidos graxos

de 15 carbonos (éter metílico do 9 metil-pentadecanoato) para o biossurfactante produzido por *L. jensenii* $P_{6A,}$ constituindo 69 % da fração lipídica do biossurfactante. Para o biossurfactante produzido por *L. gasseri* P_{65} houve uma maior concentração de ácidos graxos de 20 carbonos (éter metílico do ácido eicosanoico) constituindo 47,43 % da fração lipídica do biossurfactante (Tabela 11).

Os dois compostos apresentaram os mesmos açúcares, com exceção da ramnose, que não foi detectada no biossurfactante produzido por *L. gasseri* $P_{65.}$ No entanto as porcentagens variaram entre os isolados (Tabela 12).

Tabela 11: Composição de ácidos graxos dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

Ésteres de ácido graxos	Concentração (%)	
	***L. jensenii* P_{6A}**	***L. gasseri* P_{65}**
9 metil éster do ácido dodecanoico	69,00	------
12 metil éster do tetradecanoato	31,00	------
14 metil éster do pentadecanoato	9,88	9,70
9-metil éster do ácido octadecanoico	------	16,91
Metil éster do ácido octadecanoico	------	16,08
Metil éster do ácido eicosanoico	------	47,43

Tabela 12: Composição de monossacarídeos dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65}

Monossacarídeos	Concentração (%)	
	***L. jensenii* P_{6A}**	***L. gasseri* P_{65}**
galactose	38,12	25,50
glicose	47,99	40,67
ramnose	10,44	------
ribose	3,46	33,80

Estes resultados indicam que a composição química é similar aos descritos anteriormente para biossurfactantes de alto peso molecular, produzidos por bactérias e leveduras caracterizados pela presença de ácidos graxos, em sua maioria, de 16 e 18 carbonos.

Esta composição também já foi encontrada em outros biossurfactantes, como o Yansan produzido por *Yarrowia lipolytica,* apresentou uma fração lipídica composta principalmente por ácido hexadecanoico (35.8 %), ácido octadecanoico (21,4 %) e ácido 9-octadecanoico (Z) (6,9 %) (AMARAL et al., 2006). E ainda, Emulsan, um biossurfactante produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG -1 possui em sua molécula 5 a 15 % de lipídeos e ácidos graxos de 12, 14, 16 e 18 carbonos (KOSARIC et al., 1987).

Com relação a composição de biossurfactantes produzidos por bactérias lácticas estudos tem mostrado que *Lactococcus lactis* 53 produziu um biossurfactante composto por glicoproteínas com os açúcares glicose, ramnose, fucose e manose (RODRIGUES et al. 2006a). Outros biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus* spp. também têm sido caracterizados como uma mistura de vários grupos estruturais. A caracterização do biossurfactante produzido por *L. fermentum* B54 demonstrou uma grande quantidade de proteínas, contendo menor quantidade de polissacarídeos e grupos fosfatos (VELREADS et al., 1996).

5.3.10 Caracterização dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O método FTIR é amplamente usado para caracterizar grupos de compostos, uma vez que o espectro de absorção de compostos orgânicos no infravermelho apresenta bandas de absorção características de grupos químicos específicos. A presença de uma banda larga a 3500-3200 cm^{-1} nos espectros dos

biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} indica a presença de grupos OH (e, possivelmente, NH) presentes em glicoproteínas. Observa-se, também, uma banda a cerca de 1650 cm^{-1}, correspondente ao estiramento de ligação C=O de ligações peptídicas. A banda de absorção observada na região próxima a 1700 cm^{-1}, parcialmente sobreposta à banda de 1650 cm^{-1}, pode ser atribuída ao estiramento de ligação C=O de ésteres de lipídeos. Bandas intensas são observadas a 1100-1300 cm^{-1}, indicativas da presença de ligações C-O de açúcares (Tabela 13 e Figura 20).

Vários estudos têm mostrados estruturas semelhantes para bactérias lácticas. Os espectros de biossurfactantes produzidos por *L. lactis, L. paracasei* e *L. pentosus* apresentaram bandas a cerca de 3200-3500 cm^{-1}, características de ligações glicoproteicas (GUDIÑA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2006; MOLDES et al., 2013). Uma banda a cerca de 1675 e 1725 cm^{-1} correspondendo a ligações C=O (grupos carbonila) e NH (peptídeos) também foram encontradas no biossurfactante de *L. pentosus* e ainda, bandas em 2900 cm^{-1} e 1000-1200 cm^{-1} (MOLDES et al., 2013), indicando a presença de glicoproteínas. Os biossurfactantes produzidos por *L. fermentum* 126 e *L. rhamnosus* CCM 1825 também foram avaliados. E os resultados mostraram bandas a cerca 3285, 1635 e 1549 cm^{-1} para *L. fermentum* 126, que são típicas de ligações N-H, CO-N de proteínas. Espectros semelhantes foram apresentados para *L. rhamnosus.* Outras bandas mostradas a cerca de 2964, 2929 e 1458 cm^{-1} e de 2961, 2936 e 1453 cm^{-1} para os biossurfactantes produzidos por *L. fermentum* 126 e *L. rhamnosus* CCM1825, respectivamente, correspondem a ligações CH de grupos alifáticos e ainda, picos em 1200 a 1000cm^{-1}, confirmam a presença de frações de polissacarídeo (BRZOZOWSKI et al, 2011). Comparando os dados de espectroscopia no infravermelho dos compostos produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} com os reportados para outros biossurfactantes produzidos por bactérias lácticas pode-se concluir que estes compostos estão relacionados com aqueles produzidos por *L. lactis* e *L. paracasei* sugerindo que os mesmos possuem uma estrutura complexa composta por glicolipoproteínas. As bandas principais e os grupos químicos correspondentes são mostrados abaixo.

Tabela 13: Correspondência entre espectro IR e grupos funcionais detectados em biossurfactantes produzidos por bactérias lácticas

Absorvância (cm^{-1})	Grupos funcionais
3200-3600	grupamentos OH e NH
1725-1675	grupamentos C=O
1520	grupamentos N-H em proteínas
1400-1460	C-H vibrações dos grupos CH_2 e CH_3
1000-1300	C-O grupamentos de açúcares
Abaixo de 1000	OH deformações vibrações/CN

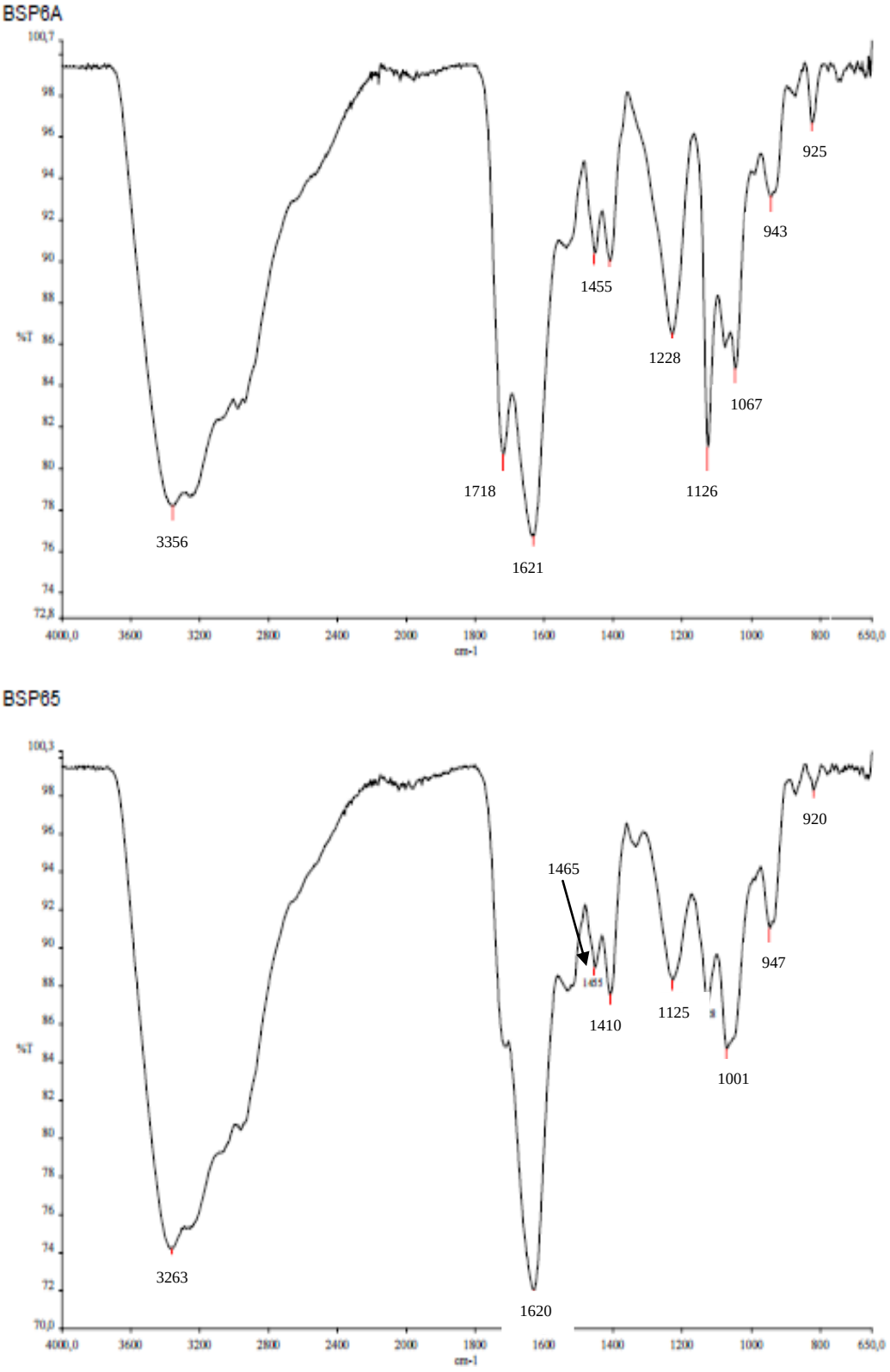


Figura 20: Espectros de FT-IR dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} (BS P6A) e *L. gasseri* P_{65} (BS P65)

5.4 Avaliação das atividades biológicas dos compostos químicos Biginelli e benzazóis e interação entre biossurfactantes e benzazóis

5.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos diidropirimidona

Trinta e um compostos de Biginelli (diidropirimidona) foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana contra leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, e bactérias *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. saprophyticus*. De modo geral, os compostos diidropirimidona apresentaram valores de inibição de crescimento em concentrações acima de 64 $\mu g.mL^{-1}$, concentrações consideradas altas para esta classe de compostos. Baseado em outros trabalhos, como citado por Pothiraj e colaboradores (2008) foram demonstrados quatro compostos diidropirimidona com atividade inibitória de crescimento contra *A. niger, A. flavus, Trichoderma viride, T. harzianum* e *Sclerotium rolfsii* em concentrações que variaram de 244 a 289 $\mu g.mL^{-1}$. No entanto, outro trabalho revelou um composto com atividade antimicrobiana, contra *Trichoderma hammatum, T. koningii* e *A. niger* em concentrações na faixa de 0,025 a 0,035 $\mu g.mL^{-1}$ (SINGH et al., 2008). Essa variação na concentração do composto com atividade antifúngica pode ser explicada pelo fato de a ação antifúngica ser dependente da estrutura dos compostos bioativos. O aumento de grupos heterocíclicos no composto aumentam a atividade por proporcionar estabilidade aos mesmos e também por aumentar a permeabilidade celular a materiais lipossolúveis, controlando ou amentando a atividade antifúngica (POTHIRAJ, 2008).

5.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos benzazóis

Quarenta e quatro compostos benzazóis (benzoimidazóis e benzotiazóis) foram avaliados quanto à capacidade de inibição do crescimento microbiano (Tabela 15). Para as bactérias, a inibição de crescimento, quando ocorreu, foi a concentrações de 500 $\mu g.mL^{-1}$. Para leveduras e para o *A. niger* a inibição

ocorreu em concentrações que variaram 31,2 $\mu g.mL^{-1}$ a 500 $\mu g.mL^{-1}$. Os compostos benzoimidazóis I06, I13, I16 e I17 e os benzotiazóis T04, T15 e T17 apresentaram as menores concentrações inibitórias.

Tabela 14: Determinação da concentração inibitória mínima de compostos benzoimidazóis e benzotiazóis contra bactérias, leveduras e fungos patogênicos do trato geniturinário

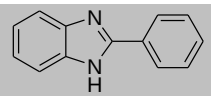
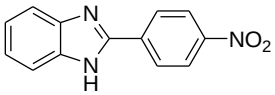
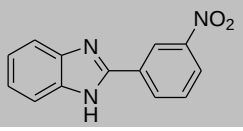
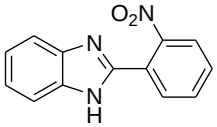
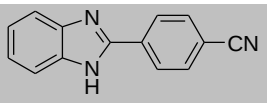
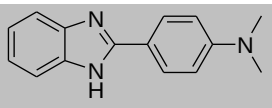
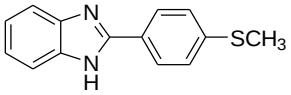
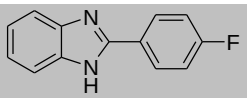
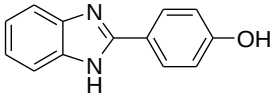
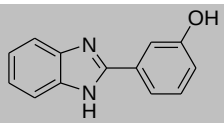
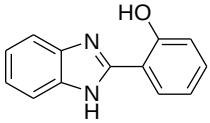
Compostos			MIC ug/mL (IC 100)							
	Estrutura	MM (g.mol)	*E. c*	*K. p*	*E. a*	*S. s*	*C.a*	*C. k*	*C. t*	*A. n*
I 01		194,77	500	500	500	--	500	500	500	250
I 02		239,24	500	--	--	--	250	250	500	250
I 03		239,26	500	--	500	--	--	500	500	500
I 04		239,26	500	--	--	--	500	250	500	500
I 05		219,24	--	--	--	--	--	--	--	--
I 06		237,13	250	--	500	--	250	500	31,2	62,5
I 07		240,28	500	500	--	--	500	500	500	250
I 08		212,76	500	500	500	500	250	500	500	125
I 09		210,23	500	500	500	500	250	250	250	125
I 10		210,23	500	--	--	--	250	250	500	250
I 11		210,23	500	500	500	--	500	500	--	500

Tabela 14: Determinação da concentração inibitória mínima de compostos benzoimidazóis e benzotiazóis contra bactérias, leveduras e fungos patogênicos do trato geniturinário (continuação)

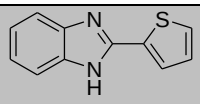
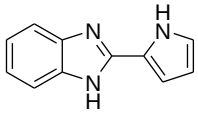
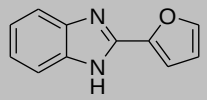
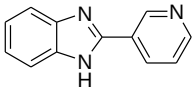
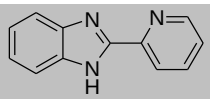
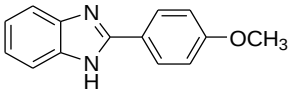
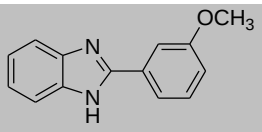
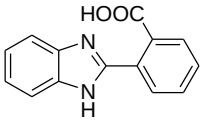
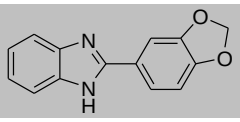
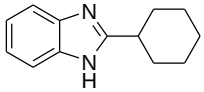
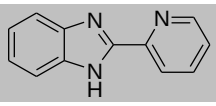
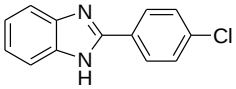
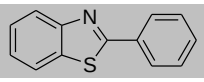
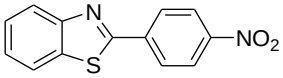
I 12		200,28	--	--	--	--	500	500	500	125
I 13		183,21	500	500	500	500	250	125	125	31,2
I 14		184,22	--	--	--	--	--	--	--	--
I 15		195,24	500	500	500	500	250	250	500	125
I 16		195,24	250	500	500	500	62,5	125	125	62,5
I 17		224,28	250	--	--	500	125	62,5	500	62,5
I 18		224,26	500	--	--	--	--	--	--	--
I 19		238,24	--	--	--	--	500	500	500	250
I 20		238,24	--	--	--	--	500	500	500	125
I 21		200,28	--	--	--	--	--	--	--	--
I 22		195,24	500	500	500	500	125	125	125	62,5
I 23		228,70	500	--	500	--	500	250	500	500
T 01		213,815	500	500	500	--	500	250	500	250
T 02		256,29	500	--	500	500	250	250	500	500

Tabela 14: Determinação da concentração inibitória mínima de compostos benzoimidazóis e benzotiazóis contra bactérias, leveduras e fungos patogênicos do trato geniturinário (continuação)

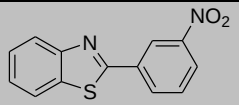
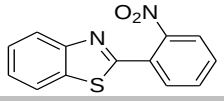
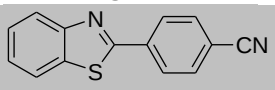
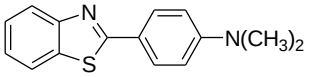
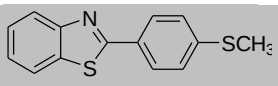
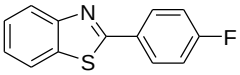
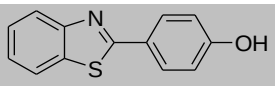
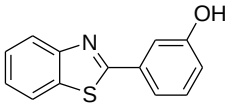
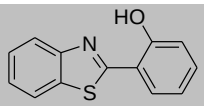
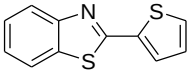
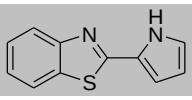
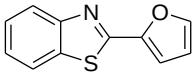
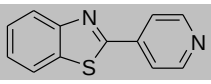
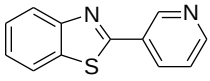
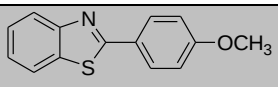
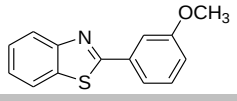
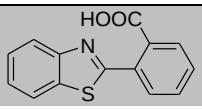
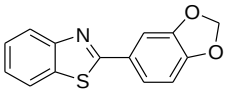
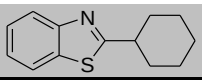
03		256,29	--	--	--	--	--	--	--	--
T 04		256,29	250	--	--	--	62,5	125	62,5	125
T 05		236,31	--	--	--	--	500	500	500	500
T 06		254,38	--	--	--	--	--	--	--	--
T 07		257,37	--	--	--	--	--	--	--	--
T 08		229,27	--	--	--	--	500	250	500	250
T 09		227,28	--	--	--	--	500	500	500	500
T 10		227,28	--	--	--	--	--	--	--	--
T 11		227,28	--	--	--	--	500	250	250	250
T 12		217,31	--	--	--	--	--	--	--	--
T 13		200,26	--	--	--	--	--	--	--	--
T 14		201,24	--	--	--	--	500	250	500	250
T 15		212,27	--	--	--	--	250	125	500	62,5
T 16		212,27	500	--	--	--	500	125	500	125
T 17		241,31	250	--	--	--	62,5	62,5	62,5	--
T 18		241,31	--	--	--	--	500	125	500	500

Tabela 14: Determinação da concentração inibitória mínima de compostos benzoimidazóis e benzotiazóis contra bactérias, leveduras e fungos patogênicos do trato geniturinário (continuação)

T19		255,29	--	--	--	--	--	--	--	--
T20		255,29	--	--	--	--	--	--	--	--
T21		217,33	--	--	--	--	--	--	--	--

**E.c. Escherichia coli; K.p. Klebsiella pneumoniae; E.a. Enterobacter aerogenes; S.s. Staphylococcus saprophyticus; C.a. Candida albicans, C.k. Candida krusei, C.t. Candida tropicalis, A.n. Aspergillus Níger* * I: benzoimidazóis e T: benzotiazóis * -- crescimento em 500µg.mL^{-1}

O grande progresso da química orgânica a partir do final do século passado, e a necessidade de alternativas terapêuticas mais eficazes no combate às varias doenças, estimulou a busca por fármacos de origem sintética, com consequente incremento do seu arsenal terapêutico. Vários são os métodos de estudo e obtenção de novos compostos, um deles é a variação ou modificação molecular (KOROLKOVAS, 1982). Esta modificação realiza mudanças estruturais na molécula original, criando uma série de derivados análogos, permitindo avaliar a influência exercida pela modificação de um átomo ou grupo de átomos, sobre a atividade biológica, que a droga original apresenta. Resultados semelhantes têm sido demonstrados por outros autores que têm se empenhado na busca de novos compostos benzoimidazóis com atividade antimicrobiana. Kumar e colaboradores (2006), mostraram que o derivado 2-(6 fluorocroman-2-il)-1-aquil/acil/aroil-1H-benzoimidazol apresentou atividade antibacteriana contra *Salmonella typhimurium*. Por outro lado, Zhang e colaboradores (2009) demonstraram que os derivados de actinonina ligado a um anel heterocíclico benzoimidazol apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus, K. pneumoniae* e *Sarcina lútea*. Outros autores demonstraram que os compostos tiazolidinona e azetidinona apresentaram atividade antimicrobiana contra vários micro-organismos patogênicos como, *S. aureus* ATCC9144, *S. epidermidis* ATCC 155, *K. pneumoniae* ATCC 29665 and *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 2091 e *A. niger* ATCC 9029 (SELVAN et al., 2011). Em outro estudo realizado por Sheng e colaboradores (2003), o medicamento lansoprazol mostrou-se como um potente

antimicrobiano contra *Fusobacterium nucleatum*, micro-organismo associado à gengivite, que serve como âncora para colonizadores secundários da placa dentária.

5.4.3 Avaliação da interação antimicrobiana dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} e benzoimidazóis I06, I16 e I17 e benzotiazóis T04 e T17

Para este ensaio foram selecionados os compostos benzazóis I06, I16, I17, T16 e T17 que se destacaram na inibição de crescimento de *C. albicans* apresentando MIC de 250 $\mu g.mL^{-1}$, 62,5 $\mu g.mL^{-1}$, 125 $\mu g.mL^{-1}$, 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ e 62,5 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente. Estes compostos foram associados aos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* $P_{65,}$ que apresentaram CIM's de 128 $\mu g.mL^{-1}$ e 16 $\mu g.mL^{-1}$, para *C. albicans* e *E. coli,* respectivamente. Nos ensaios, os compostos benzazóis foram usados nas concentrações correspondentes às concentrações inibitórias mínimas. Nos experimentos com *C. albicans*, houve sinergismo nas associações entre o biossurfactante produzido pelos isolados *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} com o composto benzoimidazol I06 e benzotiazol T17. Quando testados contra *E. coli*, houve sinergismo (IFIC ≤ 0,5) entre os compostos I06, I16, I17, T17, incluindo o cloranfenicol, associados ao biossurfactante produzido por *L. jensenii* P_{6A}. Para o biossurfactante produzido por *L. gasseri* $P_{65,}$ somente houve sinergismo (IFIC ≤ 0,5) na associação entre o biossurfactante e o benzoimidazol I06. A avaliação da interação entre o composto benzotiazol T16 e biossurfactante produzido por *L. gasseri* P_{65} se caracterizou como antagonista apresentando (IFIC > 4) e as demais se caracterizaram como indiferentes (0,5 < IFIC ≤ 4).(tabela 15). Estes dados sugerem que o biossurfactante pode favorecer a entrada e penetração através da membrana celular aumentando a atividade dos compostos benzazóis e cloranfenicol.

Autores têm mostrado que a associação de dois ou mais fármacos podem ser administrados visando principalmente aumentar a eficácia, reduzir as dosagens individuais e os possíveis efeitos colaterais de cada fármaco. Estas associações

podem resultar em efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos. (ADWAN & MHANNA, 2008).

Tabela 15: Valores de ICIF correspondentes a diferentes interações entre biossurfactantes, antimicrobianos convencionais e benzazóis

Compostos	*L. jensenii* P_{6A}		*L. gasseri* P_{65}	
	Concentração BsP_{6A}/BZ ($\mu g.mL^{-1}$)	**ICIF**	**Concentração BsP_{65}/BZ ($\mu g.mL^{-1}$)**	**ICIF**
	Candida albicans			
I06	4/62,5	0,5	2/62,5	0,37
I16	32/125	4	4/31,25	0,75
I17	32/125	4	32/125	4
T04	2/31,25	0,62	4/125	2,25
T17	2/7,81	0,24	1/7,81	0,18
Cetoconazol	4/16	1,25	64/32	4
	Escherichia coli			
I06	2/62,5	0,37	1/62,5	0,56
I16	1/7,81	0,062	16/62,5	2
I17	1/125	0,184	16/125	2
T04	32/125	4	64/500	12
T17	1/7,6	0,184	1/125	2
Cloranfenicol	6,25/8	0,375	12,5/16	1,25

Sinergismo ICIF ≤ 0,5, indiferente 0,5 < ICIF ≤ 4 e antagonismo ICIF > 4.

Em outro estudo foi reportado que o uso de surfactina pode aumentar o efeito de enrofloxacina contra *Mycoplasma pulmonis* (FEHRI et al., 2007). Rivardo e colaboradores (2011) testaram a eficácia da ação de inibição de crescimento do biossurfactante lipopeptídico V9T14 associado a outros antibióticos contra *E. coli* uropatogênica. Estes autores demonstraram que o lipopeptídeo sozinho não foi capaz de diminuir a população de *E. coli* no biofilme pré-formado, mas associado à ampicilina teve um efeito sinérgico de atividade biocida, incluindo outros antibióticos como cefazolina, ciprofloxacina e ceftriaxone. Outros estudos têm mostrado que o uso da terapia combinada pode favorecer a entrada de antibióticos pouco solúveis na célula microbiana, como é o caso do uso de um biossurfactante. Consequentemente, o efeito inibitório desejado é obtido a uma menor dose administrada dos antibióticos (VAN BOGAERT et al., 2011). Alguns autores têm sugerido que o biossurfactante interage com a membrana da célula microbiana formando poros, e deste modo, facilitando a absorção do

medicamento. Poe outro lado, acredita-se que esta ação também possa facilitar a introdução do composto através da camada de exopolissacarídeo de bactérias em biofilme (RIVARDO et al., 2011). Portanto, devido a possibilidade de maior influxo da substância com ação farmacológica, pode-se esperar que os resultados obtidos para os biossurfactantes produzidos por lactobacilos, possam contribuir para a descoberta de uma nova estratégia de tratamento de infecções causadas por *E. coli* e *C. albicans* uma vez que se observou uma ação sinérgica entre os compostos benzazóis e biossurfactantes.

5.4.4 Curva de sobrevivência de *C. albicans* e *E. coli* em exposição aos biossurfactantes e benzazóis

Para avaliar o efeito da ação dos agentes antimicrobianos em concentrações mínimas de inibição e em combinação sobre *E. coli* e *C. albicans*, os ensaios de viabilidade celular foram feitos usando MTT. Foram selecionados compostos biossurfactantes e benzazóis que apresentaram atividade antimicrobiana sobre os *E. coli* e *C. albicans*. Avaliando separadamente cada composto pode-se observar que para *C. albicans* os biossurfactantes atingiram o máximo de redução de atividade metábolica em 24 h porém com pouca variação até 48 h. Os benzazóis também atingem o máximo de redução após 48 horas, chegando a 95.5% de redução na atividade metabólica. Em combinação, os compostos apresentaram maior porcentagem de redução da atividade metabólica a 24 h, variando de 80% a 93% de redução da atividade metabólica. Chegando a 99 % de redução na atividade metabólica, após 48 h de incubação (Figuras 21 e 22).

Para *E. coli*, observou-se que quando avaliados separadamente houve crescimento até 8 horas de exposição aos compostos biossurfactantes e benzazóis. Após esse período nota-se que há a diminuição na atividade metabólica para todos os compostos, porém para biossurfactante produzido por *L. gasseri* P_{65} a diminuição da ativiade metabólica ocorreu após 12 h de exposição. Em combinação pode-se observar que houve variação no crescimento da bactéria após exposição aos compostos associados. De modo geral, todas as associações

atingiram perfis mais altos de redução após 24 h de exposição, atingindo 99% de redução na atividade metabólica (Figuras 23 e 24).

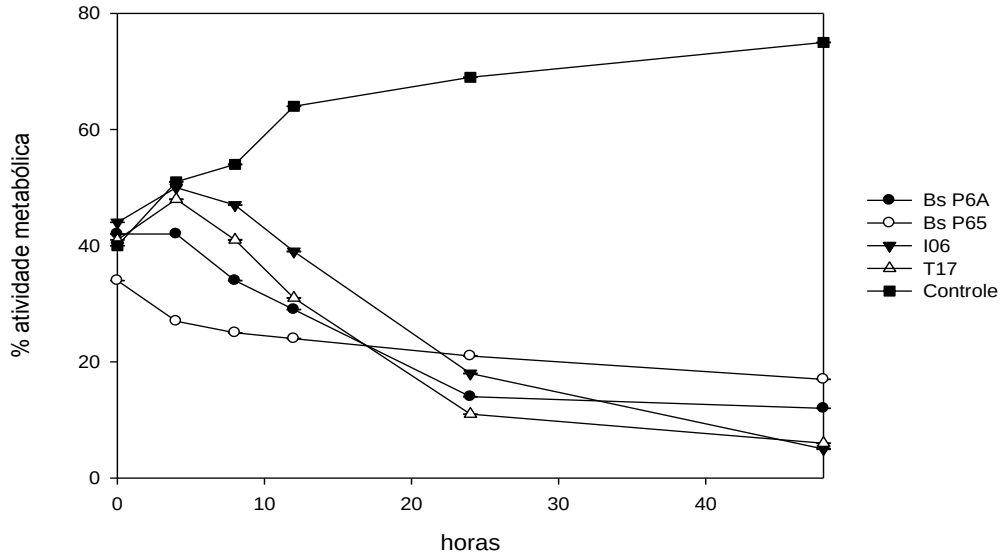


Figura 21: Curva de sobrevivência mostrando a redução da viabilidade celular de *C. albicans* após exposição aos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} e compostos benzazóis

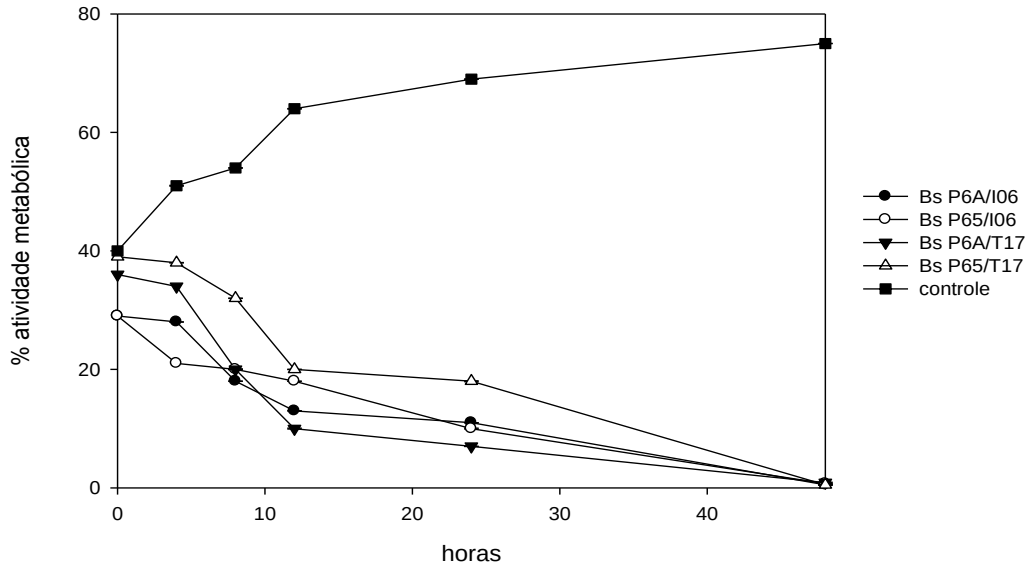


Figura 22: Curva de sobrevivência mostrando a redução da viabilidade celular de *C. albicans* após exposição aos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} associados aos compostos benzazóis

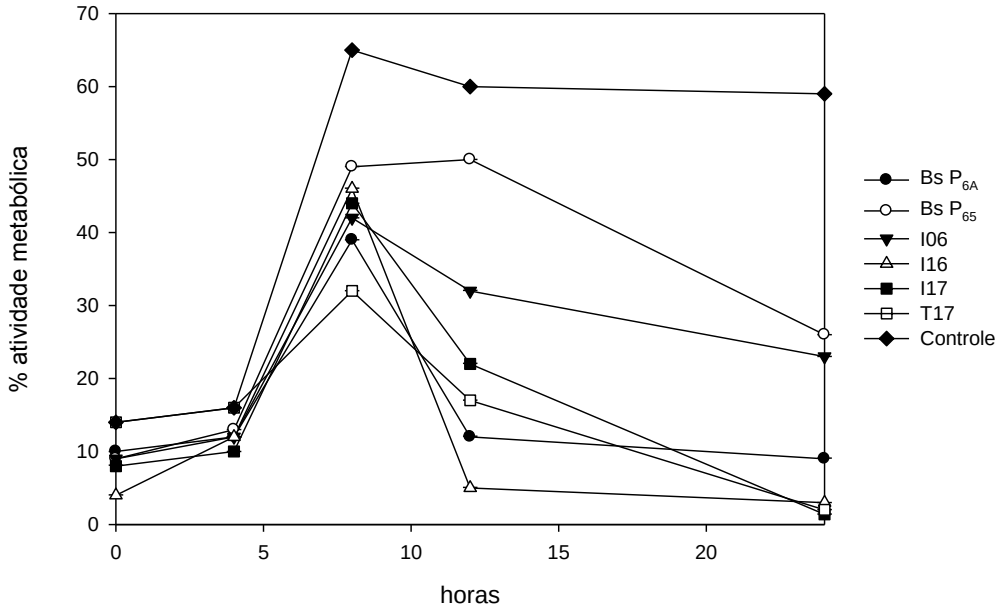


Figura 23: Curva de sobrevivência mostrando a redução da viabilidade celular de *E. coli* após exposição aos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} e compostos benzazóis

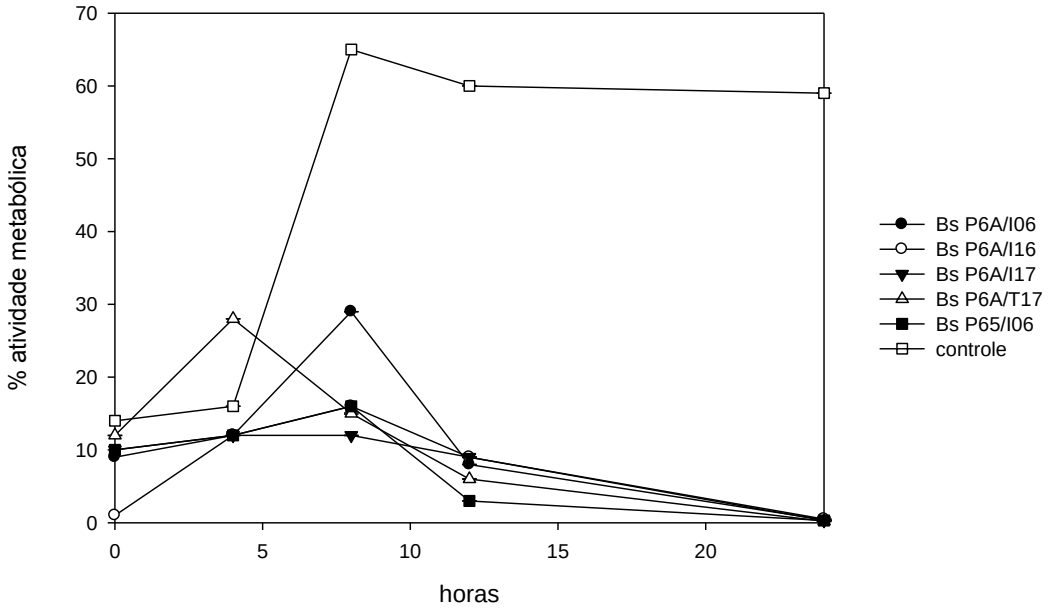


Figura 24: Curva de sobrevivência mostrando a redução da viabilidade celular de *E. coli* após exposição aos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} associados aos compostos benzazóis

A curva de sobrevivência vem reforçar a dinâmica de ação dos biossurfactantes separadamente e em combinação. Foi observado maior percentagem de redução da atividade metabólica quando os compostos foram combinados, com perfis em torno de 99 % de redução da atividade metabólica. Diante disso, podemos sugerir que o uso combinado dos benzazóis com biossurfactantes pode melhorar a atividade destes compostos e diminuir as concentrações de inibição de crescimento celular.

5.4.5 Avaliação da atividade antiadesiva dos compostos benzazóis

Os compostos benzazóis I06, I16, I17, T04 e T17 foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir a adesão microbiana de *E. coli, E. aerogenes, K. pneumoniae, S. saprophyticus, C. albicans, C. krusei* e *C. tropicalis* em placas de poliestireno após lavagem com tampão PBS e os resultados estão apresentados nas figuras 25, 26 e 27. O benzoimidazol I06 apresentou capacidade de redução de adesão em perfis que variaram entre 45 % e 73 % na concentração de 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ para todos os micro-organismos testados, aumentando esse perfil na concentração de 500 $\mu g.mL^{-1.}$ Para *S. saprophyticus*, os valores encontrados variaram entre 73 % a 75 % nas concentrações de 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ e 500 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente. O composto benzoimidazol (I16) apresentou perfis de redução entre 50 % e 74 % na menor concentração, os maiores perfis foram atingidos ao se testar a concentração de 500 $\mu g.mL^{-1}$, chegando a um perfil de 80 % de redução para *C. albicans* e *C. krusei*. O composto benzoimidazol (I17) apresentou uma variação de 48 % a 74 % de redução na adesão de *C. albicans* com 62,5 $\mu g.mL^{-1}$, atingindo 82 % de redução com 500 $\mu g.mL^{-1}$.

Os compostos benzazois T04 e T17 apresentaram valores de redução de adesão abaixo de 20 % para todos os micro-organismos testados em todas as concentrações avaliadas (dados não mostrados).

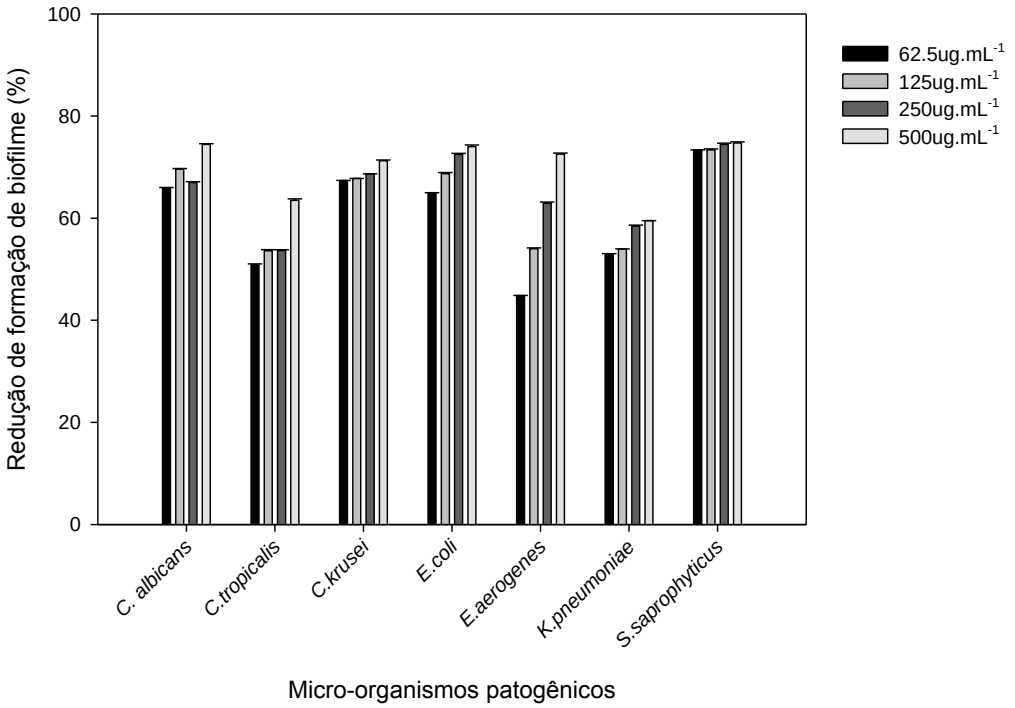


Figura 25: Porcentagem de redução na adesão micro-organismos patogênicos em placas de poliestireno usando o composto benzoimidazol I06

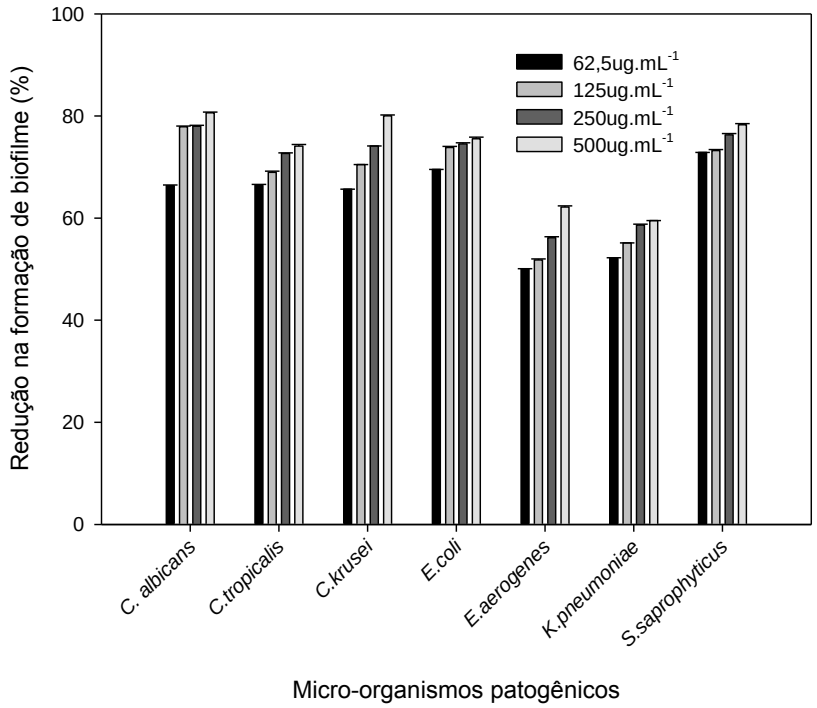


Figura 26: Porcentagem de redução na adesão de micro-organismos patogênicos em placas de poliestireno usando o composto benzoimidazol I16

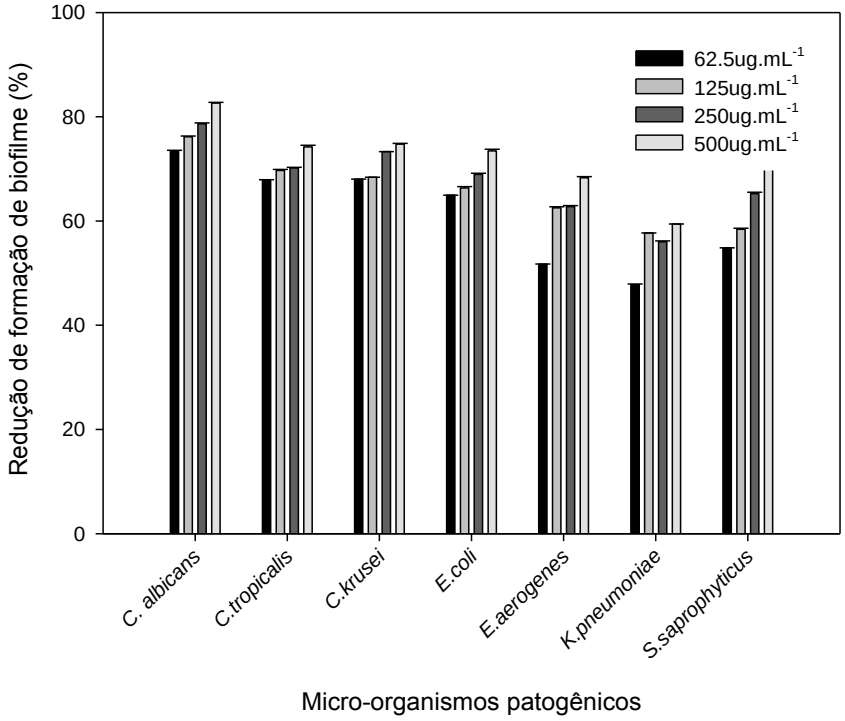


Figura 27: Porcentagem de redução da adesão de micro-organismos patogênicos em placas de poliestireno usando o composto benzoimidazol I17

Micro-organismos em biofilmes são um desafio para classe médica, por apresentarem tolerância a antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro (JOHN et al., 2011; LEITE, et al., 2011). Por esta razão, é urgente a necessidade de desenvolver tratamentos antimicrobianos para prevenir ou tratar infecções associadas a biofilmes (KUEHN, 2011). Além do que, dispositivos médicos têm gerado uma grande preocupação pela facilidade da instalação de biofilmes microbianos. Pesquisas têm sido realizadas envolvendo cateteres empregnados com antibióticos, ou revestidos, o que impediria a adesão de microrganimos e consequentemente a formação de biofilme, uma vez que estes dispositivos médicos estão relacionados a infecções nosocomiais devido à colonização por bactérias (DAROUICHE, 2004).

Os benzoimidazóis, como omeprazol, são compostos usados como inibidores de sódio para controle de acidez estomacal, quando avaliados quanto à atividade antimicrobiana, se mostraram ativos contra *Helicobacter pylori* e estreptococos orais e atualmente têm-se avaliado sua capacidade de inibição de formação de

biofilme. Em estudo realizado por Singh e colaboradores (2012) foi demonstrado que esomeprazol diminuiu a biomassa microbiana aderida, além de promover alterações morfológicas no biofilme de dois patógenos associados à formação de cárie. Também, Sambanthamoorthy e colaboradores (2011) identificaram um novo benzoimidazol que preveniu a formação de biofilme de patógenos bacterianos, incluindo *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os benzoimidazóis avaliados neste estudo apresentaram atividade de inibição de adesão em perfis que chegaram a 80 % na redução para *S. saprophyticus* e *C. krusei* e a 82 % para *C. albicans*, mostrando-se como compostos promissores no combate ao biofilme microbiano em dispositivos médicos.

5.4.6 Determinação da hidrofobicidade celular dos micro-organismos patogênicos após incubação com os compostos benzazóis I06, I16, I17

A hidrofobicidade celular dos micro-organismos foi relacionada à alteração na superfície celular ocorrida após exposição dos micro-organismos aos compostos benzazóis. Os maiores percentuais de células aderidas ao hexadecano variaram de 63 % (±0,06) a 80 % (±0,03), após exposição de *K. pneumoniae, C. krusei e C. albicans*, aos compostos I06, I16 e I17. Para *E. coli* os percentuais ficaram em torno de 43 % (±0,05)a 47 %(±0,02) para os três compostos. Os demais micro-organismos apresentaram baixos índices de adesão celular ao hexadecano com percentuais variando entre 2 e 11 %. (Figura 28). *C. tropicalis. E. aerogenes*, *E. coli* e *S. saprophyticus* mostraram sofrer alterações na superfície celular após exposição aos compostos.

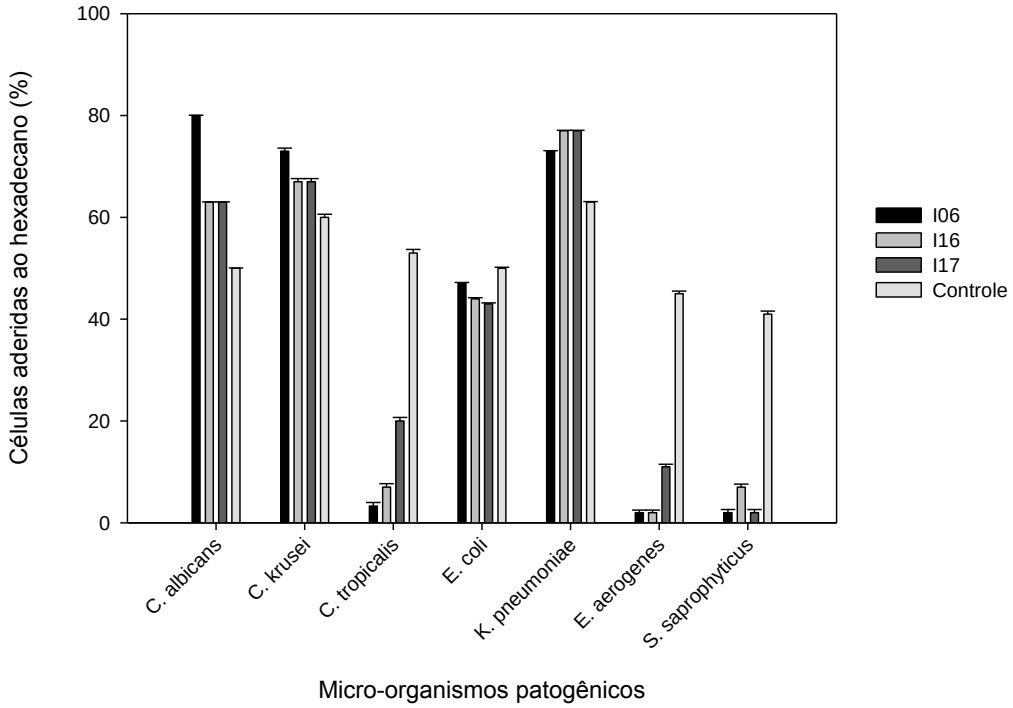


Figura 28: Hidrofobicidade celular de micro-organismos patogênicos após exposição de 24h aos compostos benzazóis (I06, I16 e I17), expressa em percentuais de células aderidas ao hexadecano

Estudos têm sugerido que a carga da superfície celular e a hidrofobicidade podem afetar a capacidade dos micro-organismos aderirem ás superfícies, estas duas propriedades possuem um papel importante nos estágios iniciais da adesão (PARIZZI et al., 2004). A importância do carácter hidrofóbico da superfície das células na adesão foi explicada por Busscher e colaboradores (1990) e van Looschecht e colaboradores (1990). Porém, acredita-se haver uma diferença na hidrofobicidade e carga superficial de bactérias, podendo variar entre espécies, sorotipos ou linhagens. Estas alterações podem ser influenciadas por variações no estado fisiológico das células e composição do meio de suspensão ou pode envolver expressão de diferentes proteínas entre as linhagens (NWANYANWU et al., 2012).Outros autores sugerem que os diferentes graus de hidrofobicidade da superfície celular de distintos isolados de *Candida* spp. estariam relacionados com uma maior ou menor capacidade das leveduras se aderirem a materiais inertes e asseguram que as espécies *C. tropicalis*, *C. glabratta* e *C. krusei* são

mais hidrofóbicas que *C. albicans C. stellatoidea* e *C. parapsilosis* (KLOTZ 1985; SARAMANAYAKE et al., 1995).

5.4.7 Triagem de biossurfactantes e benzazóis quanto a sua atividade citotóxica em células tumorais

Os compostos biossurfactantes e benzazóis foram testados quanto à capacidade de inibir a proliferação de células tumorais. Nos experimentos foram avaliadas cinco linhagens de células tumorais, e uma linhagem de células normais (VERO) (Figura 28). As células tumorais HL60 foram mais susceptíveis aos compostos como T16, I06, I17, com uma atividade semelhante ao controle etoposideo (eto a 10uM), fármaco usado na terapia antitumoral. O composto I06 foi ativo em todas as linhagens testadas, e ainda apresentou baixa (<20 %) toxicidade para células VERO. Os biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} não inibiram o crescimento de células tumorais, porém não apresentaram atividade citotóxica contra células normais. As substâncias com inibição da proliferação celular maior que 50% tiveram suas IC50 determinadas a fim de avaliar a potência e seletividade para células VERO. Os compostos benzazóis (I06 e I17) apresentaram concentrações de IC50 acima do controle etoposídeo para a célula HL60. Para as células MDA e para células VERO as concentrações foram comparáveis com o controle etoposídeo (>100) (Tabela 16).

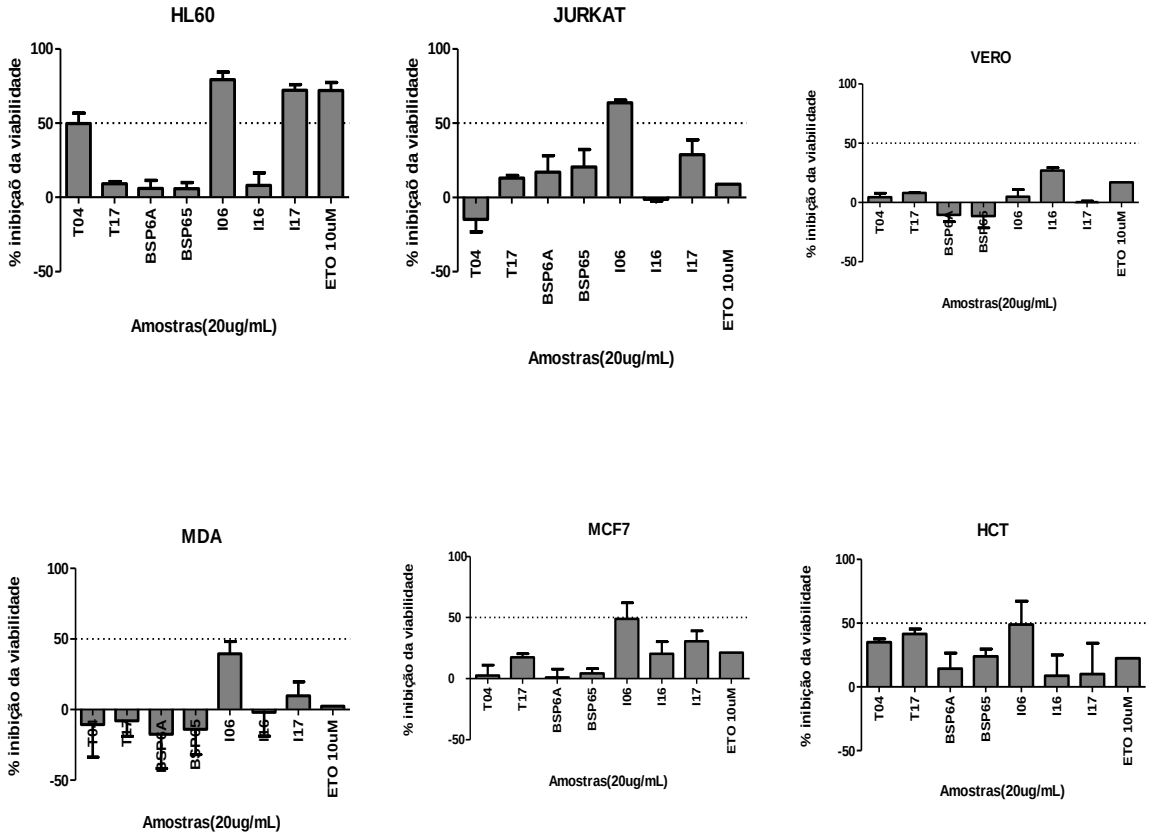


Figura 29: Avaliação da atividade citotóxica das substâncias em células tumorais e células Vero

Tabela 16: Valores de IC50 (µM) dos compostos benzazóis I06 e I17 nas respectivas linhagens de células

	I06	I17	Etoposídeo
HL60	56,12 ± 12	43,89 ± 2,3	1,8 ± 0,72
MDA-MB-231	>100	>100	>100
Vero	>100	>100	>100

Dados representativos de experimentos feitos em triplicata

De modo geral, estudos têm mostrado a baixa toxicidade celular de biossurfactantes. Em um estudo realizado por Deghan-Noudeh e colaboradores (2005) foi demonstrado que o lipoptídeo (surfactina) produzido por *B. subtilis* ATCC6633 apresentou baixa toxicidade sobre eritrócitos quando comparada aos surfactantes sintéticos SDS, BC, TTAB e CTAB. Em outro estudo, este biossurfactante produzido por *P. fluorescens* apresentou baixa toxicidade sobre fibroblastos, em contrapartida, este composto foi capaz de induzir apoptose de

células de melanoma A375, pela interação das micelas com a membrana celular, aumentando assim, sua permeabilidade (JANEK et al., 2013). Em outros estudos, o lipopeptídeo produzido por *B. subtilis* apresentou atividade antitumoral em células LoVo (KIM et al., 2007) e o lipopeptídeo cíclico de *Bacillus natto* T-2 induziu apoptose nas células de leucemia K562 em humanos, por um aumento da fosforilação extracelular regulada por quinases (WANG et al., 2009). Os glicolipídeos extraídos e purificados a partir da cultura de células de *Candida antarctica* T-34, mostraram-se efetivos na inibição de células da linhagem B16 de melanoma de rato e humano, causada pela condensação da cromatina e fragmentação da molécula de DNA, levando à apoptose celular (ZHAO, et al, 2000; SUDO et al., 2000).

Vários estudos têm mostrado o efeito citotóxico de compostos heterocíclicos da classe dos benzazóis. Arulmughan e colaboradores (2013) demonstraram três compostos benzoimidazóis com atividade citotóxica em células tumorais MCF-7 (câncer de mama) e HT-29 (câncer de cólon). Também, estudos sobre síntese e atividade biológica de novos benzazóis mostraram cinco compostos com atividade antitumoral contra células MCF-7, HepG2 (hepatocarcinona) e PC3 (câncer de próstata) (SHEHAB, et al., 2010). Diante do exposto, o composto benzoimidazol I06 avaliado neste trabalho se mostrou como uma alternativa no tratamento de câncer humano, mostrando baixa toxicidade para células normais.

6. CONCLUSÕES

Diversas bactérias lácticas apresentaram potencial para a produção de biossurfactantes, mostrando que de 52 isolados de *Lactobacillus* spp. seis isolados de *L. crispatus*, cinco *L. gasseri*, três de *L. jensenii*, dois de *L. johnsonii* e um isolado de *L. colehominis, L. vaginalis* e *L. reuteri,* apresentaram atividade surfactante ou emulsificante indicativo de produção de biossurfactantes;

De modo geral, as condições de aerobiose favoreceram o crescimento e a produção de biossurfactantes pelos lactobacilos;

Seis compostos de Biginelli inibiram o crescimento de *C. albicans* e *E. coli* em concentrações de 64 $\mu g.mL^{-1}$ e 128 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente. Os compostos benzazóis I06, I16, I17, T04 e T17 apresentaram atividade antimicrobiana contra leveduras do gênero *Candida* e *A. niger;*

A concentração inibitória mínima apresentada pelos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} contra *E. coli, E. aerogenes, K. pneumoniae* e *S. saprophyticus* foi de 16 $\mu g.mL^{-1}$;

A atividade emulsificante dos biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} permaneceu estável em variações de pH de 2 a 10 e após tratamento a 100 °C por 60 min e adição de cloreto de potássio e bicarbonato de sódio. Mas se desestabilizaram após adição de cloreto de sódio;

Os biossurfactantes produzidos por *L. jensenni* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} foram capazes de emulsificar diferentes substratos, tais como: querosene, tolueno e xileno. O biossurfactante produzido pelo isolado *L. gasseri* P_{65} apresentou melhores índices de emulsificação para querosene e tolueno. Para os óleos vegetais os compostos se comportaram de maneira parecida emulsificando o óleo de algodão, óleo de girassol e óleo de oliva;

Os biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} apresentaram atividade antiadesiva contra micro-organismos patogênicos, pela alteração da hidrofobicidade celular e ainda, foram capazes de remover o biofilme formado em placas de poliestireno;

A caracterização química parcial dos biossurfactantes produzidos por 19 isolados de *Lactobacillus* spp. sugere que os mesmos são compostos por concentrações variadas de proteínas, carboidratos e lipídeos;

A caracterização de ácidos graxos e monossacarídeos dos biossurfactantes produzidos pelos isolados de *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} indicou o predomínio de ácidos graxos de 12, 15, 18 e 20 carbonos e dos açúcares: galactose, glicose, ramnose e ribose. Estes compostos apresentaram em sua estrutura maior porcentagem de glicose 47,99 % e 40,97 %, respectivamente.

A espectroscopia no infravermelho mostrou uma estrutura de glicolipoproteína para os biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65};

Os compostos benzazóis I06 e T17 apresentaram sinergismo entre os biossurfactantes produzidos pelos isolados *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} contra *C. albicans* e sendo que para *E.coli* os compostos benzazois I06, I17 e T17 apresentaram sinergismo quando associados ao biossurfactante produzido por *L.jensenii* P_{6A};

Os compostos I06, I16, I17 apresentaram atividade antiadesiva contra micro-organimos patogênicos;

Os compostos benzazóis I06, I17 apresentaram atividade citotóxica contra as células tumorais HL60 acima de 50 % de inibição da viabilidade celular. Sendo o composto I06, ativo em todas as linhagens, com um perfil de menos de 20% de inibição da proliferação celular para células VERO, sugerindo baixa toxicidade.

Os biossurfactantes produzidos por *L. jensenii* P_{6A} e *L. gasseri* P_{65} não apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais e apresentaram baixa toxicidade para células normais (VERO).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCIA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinary wastes. **Langmuir.**, v.17, p.1367-1371, 2001.

ABDEL- MEGEED, A.; AL-RAHMA, A.N.; MOSTAFA, A.A. AND BASER K.H.C. Biochemical characterization of anti-microbial activity of glycolipids produced by *Rhodococcus erythropolis*. **Pakist. J. of Bot.,** v.43, p.1323-1334, 2011

ABDULLA, A.A.; ABED, T.A.; SAEED, A.M. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of Six Lactobacillus strains. **J. Brit. Microbiol. Res**. v.4,p.381-391,2014.

ADWAN, G. and MHANNA.M. "Synergistic effects of plant extract and antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens," **Middle-East J. of Scient. Res.**, v. 3, p. 134–139, 2008.

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DEIEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. Enz. Micorbiol. and Technol., v.27, p. 749-754, 2000.

AIYEGORO,O.; A. ADEWUSI, A.; S. OYEDEMI. Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Afzelia Africana* (Smith.) against drug resistance bacterial isolates. **Intern. J. of Mol. Sc.,** v. 12, p. 4477-4487, 2011.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the postantibioticera? **Arch. of Med. Res.,** v. 36, p.697-705, 2005.

ALLSWORTH, J. E; PEIPERT, J. F. Prevalence of bacterial vaginosis: 2001–2004 national health and nutrition examination survey data. **Obstet. Gynecol.**, v.109**,** p.114–120, 2007.

ALVES , S. H.; CURY A. E. Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com câncer , à antifungicos poliênicos. **Rev. Inst. Med. Trp.**, **São Paulo**, v.34, p.251-254, 1992.

AMARAL, P. F. F.; SILVA, J. M.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Proc. Biochemistry**, v.41, p. 1894-1898, 2006.

AMSEL, R., P. A.; TOTTEN P.A., C. A.; SPIEGEL C.A.; CHEN, D.; K. K. HOLMES, K.K. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiological association. **Am. J. Med.**, v.74, p.14-22, 1983.

AN, Y. H.; FRIEDMAN, R. J. Consise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. **J. Biom. Mat. Res.**, v.43, p.338-348, 1988.

ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **J. Antimic. Chem.,** v.44, p.151-162, 1999.

ARIMA, K.; KAHINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactnt produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.31, p.488-494, 1968.

AROUTCHEVA, A. A.; SIMÕES, J. A.; FARO, S. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v.9, p.33-39, 2001.

ARULMURUGAN, S.; KAVITHA, H.P. Synthesis and potential cytotoxic activity of some new benzoxazoles, imidazoles, benzoimidazoles and tetrazoles, **Acta Pharm***.,* v.63, p.253-264, 2013.

ATWAL, K. S.; SWANSON, B. N.; UNGER, S. E.; MALLEY, D. M. F.; MORELAND, S.; HEDBERG, A.; O'REILLY, B. C. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 3.3-Carbamoyl-4-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as orally effective antihypertendive agents. **J. Med.Chem.,** v.34, p.806-811, 1991.

BACHHAV**,** H. M.; BHAGAT**,** S. B.; TELVEKAR**,** V. N. Efficient propylphosphonic anhydride mediated synthesis of benzothiazoles, benzoxazoles and benzimidazoles. **Tetrah. Lett**., v.52, p.5575–5580, 2011.

BAILLIE G. S., DOUGLAS L. J. Effect of Growth Rate on Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents. **Antimic.Ag.Chem.,** v.42, p.1900-1905, 1998.

BAILLIE G. S., DOUGLAS L. J. Matrix polymers of *Candida albicans* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **J. Antimic. Chem.,** v.46, p.397-403, 2000.

BAL, G.; BRUSSEAU, M. L.; MILLER, R. M. Influence of a rhamnolipid biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil. **Appl. Envir. Microb.**, v.63, p.1866-1873, 1997.

BALISH, E.; WAGNER, R. D. Probiotic bacteria for prophylaxis and therapy of candidiasis. **Rev. Iberoam. Micol.,** v.15, p.261-264, 1998.

BANNAT, I. M. Isolation of a thermophilic biosurfactant-producing Bacillus species. Biotechnol. Lett., v. 15, p. 591-594, 1993.

BANNAT, I. M. Biosurfactants production and use in microbial enhanced oil recovery and pollution remediation: A review. **Biores. Techn.**, v.51, p.1-12, 1995a.

BANNAT, I. M. Biosurfactants characterization and use in pollution removal: State of the art. A review. **Act. Biotec.,** v.15, p.251-267, 1995b.

BANNAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbial. Biotechn.**, v.53, p.495-508, 2000.

BANNAT, I. M.; FRANZETI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl. Microbiol. Biotechn.**, v. 87, p. 427-444, 2010.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. London: **Camb. Univers.,** p.811, 1983.

BARROS, F. F. C.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. Production of biosurfactant by Bacillus subtilis LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **J. of Ind. Microbiol. and Biotechn.,** v. 35, p.1071-1078, 2008.

BERHEIMER, A.; AVIGAD, L. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis***. J. Gen. of Microbiol**., v.61, p. 361-369, 1970.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **J. Food Engineer**., v. 54, p. 283-288, 2002.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biologiacal actives of the biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Ant. van Leeuw.,** v.85, p.1-8, 2004.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. Um método rápido para a extração total de lipídeos e de purificação. **Can. J. Biochem. Physiol.**. v. 37, p. 911-917, 1959.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. Application of modified drop-collapse technique for surfactante quantitation and screening of biosurfactant-producing. **J. Microb. Meth.,** v.32, p.237-280, 1998.

BOFF, E.; LOPES, P. G. M.; SPADER, T.[I]; SCHEID, L. A.; LORETO E.; DAL FORNO, N. F.; AQUINO, V.; SEVERO, L. C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v.41, 36-40, 2008.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Coll. Surf. A.,** v.152, p.41-52, 1999.

BOHBOT, J. M.; LEPARGNEUR, J.P. Bacterial vaginosis in 2011: a lot of questions remain. **Gynecol. Obstet. Fertil**., v.40, p.31–36, 2012,

BONMATIN, J.M.; LAPREVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cycliclip opeptides: iturins and surfactins. Activity–structure relationships to design new bioactive agents. **Comb. Chem. High Through put Screen**. v.6, p. 541–556, 2003

BORIS, S.; SUAREZ, J. E.; VASQUEZ, F.; BARBES, C. Adherence of human vaginal *Lactobacilli* to vaginal epitelial cells and interaction with uropathogens. **Infect. Immun.,** v.66, p.1985-1989, 1998.

BOSKEY, E. R.; TELSCH, K. M.; WHALEY, K. J. ; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. Acid production by vaginal flora *in vitro* is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. **Infect Immun.** v.67, p.5170-5175, 1999.

BUJDÁKOVÁ, H.; KUCHTA, T.; SIDÓOVA, E.; GVOZDJAKOVÁ, A.; Anti-Candida activity of four antifungal benzothiazoles. **Microb. Lett**., v.112, p.329-333,1993.

BRANCO, K. M. G. R. Bactérias do gênero *Lactobacillus* recuperadas de pacientes com e sem vaginose bacteriana: identificação molecular e produção de substâncias antagonistas. **Inst. Ciênc. Biológ. UFMG,** (Tese de Doutorado), 2005.

BRAJTBURG, J., BOLARD, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. **Clin. Microb. Ver.,** v.9, p.512-531, 2003.

BRIER, S.; LEMAIRE, D.; DE BONIS, S.; FOREST, E.; KOZIELSKI, F. Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. **Biochemi.,** v.43, p.13072-13082, 2004.

BRZOZOWSKI, B.; BEDNARSKI, W.; GOLEK. P. Physicochemical properties of *Lactobacillus* biosurfactants. **Food Technol. Biotechnol**., v.49, p.177-186, 2011.

BUMP, R.C.; BUESCHING, W.J. Bacterial vaginosis in virginal and sexually active adolescent females: evidence against exclusive sexual transmission. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.158, p. 935-939, 1988.

BURTON, J. B.; CADIEUX, P. A.; REID G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.69, p.97-101, 2003.

BURTON, J. P.; REID, G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase

chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. **J. Infect. Dis.,** v.15, p.1770-1780, 2002.

BUSSCHER, V. J.; NEU, T.; VAN DER MEI, H.C. Biosurfactant production by *thermophilic dairy Streptococci*. **Appl. Microb. Biotech.,** v.41, p.4-7, 1994.

BUSSCHER, V. J.; VAN HOOGMOED, C. G. GEERTSMA-DOORNBUSCH, G. I., VAN DER KUIJL-BOOLJ, M.; VAN DER MEI, H.C. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. **Appl. Envir. Microb.,** v.63, p.3810-3817, 1997.

BUSSCHER, V. J.; VAN DE BELT-GRITTER WESTERHOF, M.; VAN WEISSENBRUCH, R.; ALBERS, F. W. J.; VAN DER MEI, H. C. Microbial interference in the colonization of silicone rubber implant surfaces in the oropharynx: *Streptococcus thermophilus* against a mixed fungal/bacterial biofilm. In: Microbial Ecology and Infections Disease. Ed. Rosemberg, E. Washington D.C.; **Amer. Soc. Microb.**, p.66-74, 1999.

CALETA, I.; GRADISA, M.; MRVOS-SERMEK, D.; CETINA, M.; TRALIC-KULENOVIC, V.; PAVELIC, K.; KARMINSKI-ZAMOLA, G.; Synthesis, crystal structure and antiproliferative evaluation of some new substituted benzothiazoles and styrylbenzothiazoles**. il Farmaco,** v.59, p.297-305, 2004.

CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; RAMOS, S. A. F.; PIMENTEL, M. C. B.; MORAIS- JUNIOR, M. A.;. LIMA-FILHO, J. L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum.* **W. J. Microb. Biotech..**, v.19, p.191-194, 2003.

CAMERON, D.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Appl. Environ. Microb.,** v.54, p.1420-142, 1988.

CARRILLO, C.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.; GLULIETTI, A. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World J. Microbiol. Biotechnol**., v. 12, p. 82-84, 1996.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A.; QUINDÓS, P.A. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Rev.Esp.Quimioterap.,** v.19, p.130-139, 2006.

CARVALHO, F. P. Avaliação in vitro e in vivo do potencial probiótico de linhagens de *Lactobacillus* spp. Provenientes do canl vaginal de mulheres saudáveis, contra *Candida* spp. Belo Horizonte. **Inst. Ciênc. Biológ. UFMG** (Dissertação de Mestrado), 2007.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J. Infect. Dis**.. v.184, p.337-344, 2001.

CAUCI, S.; DRIUSSI, S.; DE SANTO, D.; PENACCHIONI, P.; IANNICELLI, T.; LANZAFAME P.; DE SETA F.; QUADRIFOGLIO F.; ALOYSIO D.; GUASCHINO S. Prevalence of Bacterial Vaginosis and Vaginal Flora Changes in Peri- and Postmenopausal Women. **J. Clin. Microbiol.** , v.40, p.2147 – 2152, 2002.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L.T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of Listeria monocytogenes strains of attachment to glass. Food Microbiol., v.23, p.250-259, 2006.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; McCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. **J. Bact.,** v.183, p.5385-5394, 2001.

CHANG, H. C.; CHANG, J. J.; HUANG, A. H.; CHANG, T. C. Evaluation of a capacitance method for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures. **J. Clin. Microb.**, v.38, p.971-976, 2003.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species**. J. Food Prot** . v.61, p.1636-1643, 1998.

CHEN, S.C.; O'DONNEL, M. L.; GORDON, S.; GILBERT, G. L. Antifungal susceptibility testing using the E test: comparison with the broth macrodilution technique. **J. Antimic. Chemoth.**, v.37, p.265-273, 1996.

CHEN, J.; WANG, X.J.; HU, J.D.; TAO,S. Effect of surfactants on biodegradation of PAHs by white-rot fungi. **Envirom. Sci.**, v.27, p. 154-159, 2006.

CLEWELL, D. B.; WEAVER, K.E.. Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. **Plasmid**., v.21, p.175-184, 1989.

CHRISTENSEN, G. D.; BADDOUR, L. M.; HASLY, D. L.; LOWRANCE, J. H.; SIMPSON, W. A. Microbial and foreign body factors in the pathogenesis of medical device infections. In Infections associated with indwelling medical devices. Ed. Bisno. A.L. and Waidvogel, F.A. Washigton DC. **Am. Soc. Microb.**, 3ª ed. p.27-59, 1989.

COCHIS, A.; FRACCHIA, L.; MARIA GIOVANNA MARTINOTTI, M.G.; RIMONDINI, L. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. **Oral Medic.,** v. 113, 2012.

COCHRAN, J.; GATIAL, J. I.; KAPOOR, T.; GILBERT, S. P. Monastrol inhibition of mitotic kinesin Eg5. **J. Biol. Chem.,** v.280, p.12658-12667, 2005.

COCO, A. S.; VANDENBOSCHE, M. Infectious vaginitis. **Post. Med.,** v.107, p.63-74, 2000.

CONSOLARO, M. E. L.; AKVBERTONI, T. A.; YOSHIDA, C. S.; MAZUCHELI, J.; PERALTA, R. M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvoginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.,** v.21, p.202-205, 2004.

COOPER, D. G. MaCDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin of *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.42, p.408-412, 1981.

CRIBBY, S.; TAYLOR, M.; REID, G. Vaginal microbiota and the use of probiotics. **Interdisc. Persp. Infect. Dis**. v. 2008 p.9 , 2008.

CUKROWSKA, B.; MOTYL, I.; KOZAKOVA, H.; SCHWARZER, M.; GORECKI, R. K.; KLEWICKA, E.; SLIZEWSKA, K.; LIBUDZISZ, Z. Probiotic *Lactobacillus* strains: in vitro and in vivo studies. **Folia Microbiol**. v.54, p.533-537, 2009.

CURY, A . E.; MICHE, M. P. Atividade de derivados imidazólicos contra espécies de *Candida* isoladas de pacientes com câncer. **Rev. Microbiol.**, v.20, p.249-253, 1989a.

CURY, A . E.; MICHE, M. P.; MINAMI, P. S. Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade à antibióticos. **Rev. Microbiol.** , v.20, p.102-107, 1989(b).

DAROUICHE R. O. Treatment of infections associated with surgical implants. N. Engl. J. Med. v.350, p.1422–1429, 2004.

DAS, K.P.; KINSELLA, J.E. Stability of food emulsions: physicochemical role of protein and non protein emulsifiers. **Adv. Food Nutr. Res**., v. 34, p. 81-129, 1990.

DASTGHEIB, S. M. M.; AMOOZEGAR, M. A.; ELAHI, E.; ASAD, S.; BANAT, I. M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. **Biotech. Lett.,** v. 30, p. 263–270, 2008.

DEHGHAN-NOUDEH, G.; HOUSAINDOKHT, M.; BAZZAZ, B.S.F. Isolation, Characterization, and Investigation of Surface and Hemolytic Activities of a Lipopeptide Biosurfactant Produced by Bacillus subtilis ATCC 6633**. J. Microbiol**., v.43, p.272-276, 2005.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. **Biophys. J.**, v.94, p.2667–2679, 2008.

DELGADO, W.; AGUIRRE, J. M. Las micosis orales em la era del sida. **Rev. Iberoamer. Micol.,** v.14, p.14-22, 1997.

DEMBA, E ; MORISON, L.; VAN DER LOEFF, M. S., AWASANA, A. A.; GOODING, E.; BAILEY, R.; MAYAUD, P.; WEST, B. Bacterial vaginosis, vaginal flora patterns and vaginal hygiene practices in patients presenting with vaginal discharge syndrome in The Gambia, West Africa. **BMC Infect. Dis.,** v.5, p.12, 2005.

DESAI, J.; BANNAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. and Molec. Biol. Reviews**., v. 61, p. 47-64, 1997.

DEZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S. VILLEMUR. R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing cultures of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57 RP, **Biochim. Biophys. Acta,** v.1485, p.145-152, 2000.

DONDERS G.G.G. Microscopy of bacterial flora on fresh vaginal smears, **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v.3, p.126-127, 1999.

DONDERS, G.G.G.; VEREECKEN, A.; BOSMANS, E.; DEKEERSMAECKER, A.; SALEMBIER, G.; SPITZ, B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis Intern**. J. of Obst. and Gynaec**., v.109, p.34–43, 2002.

DOROCKA-BOBKOWSKA B, KONOPKA K, DÜZGÜNE N. Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro. **Arch. Or. Biol.,** v.48, p.805-814, 2003.

DRAGO, L.; MOMBELLI, B.; DE VECCHI, E.; FASSENA M.C.; TOCALLI L.; GISMONDO, M.R. In vitro antimicrobial activities of própolis dry extract. **J. Chemother.,** v.12, p.454-460, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.,** v.28, p.350-356, 1956.

ECKERT, L. O.; HAWES, S. E.; STEVENS, C. E.; KOUTSKY, L. A.; ESCHENBACH, D. A.; HOLMES, K. K. Vulvovaginal candidiasis: clinic manifestations, risk factors, management algorithm. **Obst. Gynec.,** v.92, p.757-765, 1998.

EDWARDS, L. The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. **Derm. Therap.,** v.17, p.102-110, 2004.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically non-immunosuppressed patients. **Th. Lanc. Infect. Dis.,** v.3, p.685-702, 2003.

EHRSTRÖM, M. S.; KOMFELD, D.; THURESSON J.; RYLANDER, E. Signs of chronic stress in women with recurrent candida vulvovaginitis. **Am. J. Obst. Gynecol.,** v.193, p.1376-1381, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; HAZEN, K. C.; MARTINEZ SUAREZ, V.; SCALISE, G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. **Med. Mycol.,** v.36, p.68-78, 1998.

ESPOSITO, S.; LEONE, S. Antimicrobial treatment for Intensive Care Unit (ICU) infections including the role of the infectious disease specialist. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.29, p.494–500, 2007.

ETGETON, S. A.; CHASSOT, F.; BOER, C. G.; DONATTI L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Influência da coagregação entre Candida albicans e Lactobacillus acidophilu na capacidade de adesão destes micro-organismos às células epiteliais vaginais humanas (CEVH). **Act. Scient. Health Sc**., v. 33, p. 1-8, 2011.

FALAGAS, M. E.; BETSI, G. I.; TOKAS, T.; ATHANASSIOU, S. Probiotics for prevention recurrent urinary tract infections in women: a rewiew of the evidence from microbiological and clinical studies. **Drugs**. v.66, p.1253-1261, 2006a.

FALAGAS, M. E.; BETSI, G. I.; ATHANASSIOU, S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a rewiew. **Antimicrob. Chemother.** v.58, p.266-272, 2006b.

FALAGAS, M. E.; BETSI, G. I.; ATHANASSIOU, S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. **Clin. Microbiol. Infect.** v.13, p.657-664, 2007.

FALAGAS, M. E.; MAKRIS, G. C. Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: A hypothesis. Journal. Hospital Infestion. v.71, p.301-306, 2009.

FEHRI, L.F.; WROBLEWSKI, H.;, BLANCHARD, A. Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against Mycoplasma pulmonis. **Antimicrob. Agents Chemother**. v.51, p.468–474, 2007.

FERNANDES, E.C.R.Study of Biosurfactant Cocktails with Enhanced Properties **Univ.do Minho**. Portugal, 2013

FIDEL, Jr., P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: rewiew of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *Candida albicans*. **Clin. Microbiol. Ver.,** v.12, p.80-96, 1999.

FLASZ, A.; ROCHA, C.A.; MOSQUERA, B.; SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Med. Scien. Res.,** v.6, p.181-185, 1998.

FLECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trend. Biotech.,** v.10, p.208-218, 1992.

FRACCHIA, L.; CAVALLO, M.; ALLEGRONE, G.; MARTINOTTI, M. G. A *Lactobacillus* - derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic Candida albicans biofilm producers. Curr. Res. Technol. and Educ. Appl. Microbiol. **Microbiol. Biotechnol**., v. 2, p. 827-837, 2010.

FREDRICKS, D.N.; FIELDLER, T.L.; MARRAZZO, J.M. Molecular identification of bactéria associated with bacterial vaginosis. **N. Engl. J. Med.,** v.3 p. 1899-1911, 2005.

GAN, B.; KIM, J.; REID,G.; CADIEUX, P.; HOWARD, J. *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. **Th. J. Infect. Dis.,** v.185, p.1369-1372, 2002.

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **J. Brás. Patol. Med. Lab.**, v.40, p.229-236, 2004.

GAZETA JÚNIOR, A.; GRIGOLETO, A.R.L.; FREGONEZI, P.A.G. Candidíase Vaginal: uma questão de educação em saúde. **Braz J Health***,* v.2, p.89-96, 2011.

GHANNOUM, M. A.; ABU-ELTEEN, K. H. Pathogenicity determinants of *Candida.* **Mycol.,** v.33, p.265-282, 1990.

GHANNOUM M. A.; RICE L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microb. Rev.,** v.12, p.501-517, 1999.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in Pharmaceutical Industry (A mini-review). **Amer. J. of Drug Disc. and Develop.**, 2010.

GILBERT, P.; MAIRA-LITRAN, T.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H.; WHITE, F. W. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. **Adv. Microb. Physiol.,** v.46, p.203-256, 2002.

GLEHN, E.A.V.; RODRIGUES, G.P.S. Antifungigrama para comprovar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicólicos sobre *Candida* sp. (Berkhout). **Rev. bras. plantas med.**, v.14, 2012

GOLOWCZYC, M.A.; MOBILI, P.; GARROTE, G.L.; SERRABELL, M.A.; ABRAHAM, A.G. and DE ANTONI, G.L. Interaction between Lactobacillus kefir and Saccharomyces lipolytica isolated from kefir grains. Evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. **J. Dairy Res.,** v.76, p.111-116, 2009.

GOLUBEV, W.; KULAKOVSKAYA, T. V.; GOLUBEVA, E. W. The yeast *Pseudozyma fusiformata* VKMY-2821 producing an antifungal glycolipid. **Microb.,** v.70, p.553-556, 2001.

GOTENBOS, B.; BUSSCHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. **J. Mat. Scien. Mat. Med.,** v.13, p.717-722, 2002a.

GREENFIELD, R. A. Host defense system interations with *Candida albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.,** v.30, p.89-104, 1992.

GRISTINA, A. G. Biomaterial centered infection; microbial adhesion versus tissue integration. **Scien,**, v.237, p.1588-1595, 1987.

GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by Lactobacillus paracasei. **Coll. Surf. B: Bioint.**., v. 76, p. 298-304, 2010.

GUDIÑA. E.J.; RANGARAJAN, V.;, SEN, R.; RODRIGUES, R. Potential therapeutic applications of biosurfactants., **Cell press**,p.9, 2013.

GUIDONI, E.B.M. ; TOPOROVSKI, J.. Infecção urinária na adolescência**. J.** de **Ped.** , v. 7, p. S165-S169, 2001.

GUPTA, K.; HILLIER, S. L.; HOOTON, T. M.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. Effects of contraceptive method on the vaginal microbial flora: a prospective evaluation. **J. Infect. Dis.,** v.181, p.595-601, 2000.

GUPTA A. K.; KOHLI. Y. *In vitro* suscetibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole againts dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. **Br. J. Dermatol.,** v.149, p.296-305, 2003.

GUTNICK, D. L.; SHABTAI, Y. Exopolysaccharide bioemulsifiers 1987, in Biosurfactants and Biotechnology, Ed by Kosaric, N et al.; Marcel Dekker, In, New York and Basel, p. 211-246, 1987.

HABA, E.; PINAZO A.; JÁUREGUI, O.; ESPUNY, M.J.; INFANTE, M.R. MANRESA, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotech. Bioeng.,** v.81, p.316-322, 2003.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol., v.2, p.95-108, 2004.

HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotech. Adv.,** v.24, p. 604-620, 2006.

HANDLEY, P. S.; HARTY, D. S.; WYATT, J.E.; CHRISTOPHER R. BROWN, C.R.; DORAN, J.P. AND ALAN C. C. GIBBS, A.C.C. A Comparison of the Adhesion, Coaggregation and Cell-surface Hydrophobicity Properties of Fibrillar and Fimbriate Strains of Streptococcus salivarius. **Journ. Gen. Microbiol.** 133, 3207-3217,1987.

HARRISON, J.J.; TURNER, R.J.; JOO, D.A.; STAN, M.A.; CHAN, C.S.; ALLAN N.D.; Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.52, p.2870-2881, 2008.

HEALD, R. Motor function in the mitotic spindle. **Cell.,** v.102, p.399-402, 2000.

HILLIER S.L.; MARRAZZO, J.M.; HOLMES, K.K. Bacterial vaginosis. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh P-A. **Sex. Transm. Dis.** New York: McGraw-Hill; p. 737–768. 2008.

HOLLAND, J.; YOUNG, M. L.; LEE, O.; CHEN, S. C. A. Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans.* **Sex. Transm. Infect.,** v.79**,** p.249-250, 2003.

HOOTON, T. M.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. Effects of recent sexual activity and use of a diaphragm on the vaginal microflora. **Clin. Infect. Dis**. v.19, p.274-278, 1994.

HOWARD, J. C.; HEINEMANN, C.; THATCHER, B. J.; MARTIN, B.; GAN, B. S.; REID, G. Identification of collagen-binding proteins in *Lactobacillus* spp. with surface-enhanced laser desorption ionization-time-of-flight Protein Chip technology. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.66, p.4396-4400, 2000.

HUANG, X.; SUO, J. AND CUI, Y. Optimization of Antimicrobial Activity of Surfactin
and Polylysine Against Salmonella enteritidis in Milk Evaluated by a Response Surface Methodology **Foodb. Pathog. and Dis**., v.8, p.439-444, 2011

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCH, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chem.**, v. 61, p. 985–992, 2005.

IMSEIS, H.M.*;* GREIG, P.C.; LIVENGOOD, C.H.R.,; SHUNIOR, E.; DURDA, P. Characterisation of the inflammatory cytokines in the vagina during pregnancy and labor and with bacterial vaginosis, **J. Soc. Gynecol. Investig.,** v.4, p.90-92,1997.

JANEK, T.; KRASOWSKA, A.; RADWANSKA, A; ŁUKASZEWICZ, M. Lipopeptide Biosurfactant Pseudofactin II Induced Apoptosis of Melanoma A 375 Cells by Specific Interaction with the Plasma Membrane. **Plos. One**, v. 8, p. 11-17, 2013.

JAQUIERY, A.; STYLIANOPOULOS, A.; HOGG, G.; GROVER, S. Vulvovaginitis: clinical features, aetiology, and microbiology of the genital tract. **Arch. Dis. Child.,** v.81**,** p.64-67, 1999.

JESSUP, C. J.; WARNER, J.; ISHAM, N.; HASAN, I.; GHANNOUM, M. A. Antifungal
susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.,** v.38, p.341-344, 2000.

JOHN, A.K.; SCHMALER, M.; KHANNA, N.; LANDMANN, R. Reversible daptomycin tolerance of adherent staphylococci in an implant infection model. Antimicrob. Agents Chemother. v.55, p.3510 –3516, 2011.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C.; Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **J. Food. Engin.***,* v.*56*, p.77.2002.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D. W. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. **FEMS Microbiol. Lett.,** v.149, p.141-149, 1997.

JUÁREZ TOMÁS, M. S.; ZONENSCHAIN, D.; MORELLI, L.; NADER-MACÍAS M. E. Characterisation of potentially probiotic vaginal lactobacilli isolated from Argentinean women. **Br. J. Biomed. Sci**., v.62, p.170-174, 2005.

JURAK, M.; CHIBOWSKI, M.; Zeta potencial and surface free energy changes of solid-supported phospholipid (DDPC) layers caused by the enzyme phospholipase A_2(PLA_2). **Adsorpt.,** v.15, p.211-219, 2009.

LISBOA, C.; COSTA, A. R.; RICARDO, E.; SANTOS, A.; AZEVEDO, F.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Genital candidosis in heterosexual couples**. J Eur Acad Dermatol Venereol.** v. 25(2), p.145-151, 2011.

KAPER, J. B.; SPERANDIO, V. Bacterial Cell-to-Cell Signaling in the Gastrointestinal. **Infect. Imm.,** v.73, p.3197-3209, 2005.

KAPLAN, N,; ZOSIM, Z.; ROSENBERG, E. Reconstitution of emulsifying activity of Acinetobacter calcoaceticus BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. **Appl. Envirom. Microbiol.,** v. 53, p. 440-446, 1987.

KAPPE, C.O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type-a literature survey. **Eur. J. Med. Chem.,** v.35, p.1043-1052, 2000.

KÄPPELI, O.; FLECHTER, A. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. **J. Bacteriol.,** v.131, p.917-921, 1977.

KEOGH, J. R.; EATON, J. W. Albumin binding surfaces for biomaterials. **J. Labor. Clin. Med.,** v.124, p.537-545, 1994.

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, XY; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine Streptomyces species B3. **J. Colloid Interface Sci**., v.367, p.311-318, 2011.

KHOSPAVI, K.; KAZEMI S. Synthesis of 2-arylbenzimidazolis and 2-arylbenzothiazoles in both room temperature and microwave condition catalyzed by hexamethylenetetramine-bromine complex. **Chinese Chem. Lett**. v.23, p.61-64, 2012.

KIM, S.Y.; KIM, J.Y.; KIM, S.H.; BAE, H.J.; YI, H. Surfactin from Bacillus subtilis displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. **FEBS Letters**, v.581, p.865-871. 2007.

KIRAN, G. S.; HEMA, T. A.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN, J.; THOMAS, T. A.; RAVJI, T. R.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimizationa and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus Aspergillus ustus MSF3. Coll. Surf. B Biointerf., v.73, p. 250, 2009.

KLIMESOVÁ, V.; KOCI, J.; POUR, M.; STACHEL, J.; WAISSER, K.; KAUSTOVÁ, Synthesis of 2-benzylthiopyridine-4-carbothioamide derivatives and their antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity., **J. Eur. J. Med. Chem. ,** v.37, p.409-413, 2002.

KLIMESOVÁ, V.; SVOBODA, M.; WAISSER, K.; KAUSTOVÁ, J.; BUCHTÁ, V.; KRALOVÁ, K.; EUR. New pyrimidine derivatives as potential microbial agents. **Farm.** ,v.4, p.666-672, 1999.

KLOTZ, S. A. Role of hydrophobic interactions in microbial adhesion to plastics used in medical devices. In: Microbial Cell Surface Hydrophobicity. Ed. Doyle, R.J. and Rosemberg, M.; Washington: **Am. Soc. Microb.,** p.107-138, 1985.

KLOTZ, S. A.; SMITH, R. L. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracelullar matrix. **J. Infec. Dis.,** v.163, p.604-610, 1991.

KOLENBRANDER, P. E. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque**. Annu. Rev. Microbiol.** v.42, p.627-656. 1988.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VUKOVIC, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J. and MATOSIC, S. Adhesion and agregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, p.981-987, 2003.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. Biosurfactants and Biotechnology. Nova York: Marcel Dekker, Inc., **Surfac. Sc. Series**, v. 25, 342p. 1987.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **J. Am. Oil Chem. Soc.,** v.64, p.1731-1737, 1992.

KOUMANS, E.; MARKOWITZ, L.E.; HOGAN, V. Indications for therapy and treatment recommendations for bacterial vaginosis in nonpregnant and pregnant women: a synsthesis of data. v.35, p.152-171, 2002.

KUHN, D.M; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **J. Clin. Microb.,** v.41, p.506-508, 2003.

KUEHN, B.M. Scientists seek antibiotic adjuvants. JAMA v.306, p.2203–2204, 2011.

KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K. ; GHANNOUM, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect. Imm..** v.70, p.878-888, 2002.

KULAKOVSKAYA, T.; KULAKOVSKAYA, E.; GOLUBEV, W. ATP leakege from yeast cells treated by extracellular glycolipids of *Pseudozyma fusiformata*. **FEMS Yeas. Res.** v.3, p.401-404, 2003.

KUMAR, B.V.S., VAIDYA, S.D., KUMAR, R.V., BHIRUD, S.B., MANE, R.B. Synthesis and anti-bacterial activity of some novel 2-(6-fluorochroman-2-yl)-1-alkyl/acyl/aroyl-1H-benzoimidazoles. **Eur. J. Med. Chem**.,v.41,p.599-604, 2006.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Micologia médica, 8.ed. São Paulo: **Sarvier**, 695 p., 1991.

LADANI, N. K.; PATEL, M. P.; PATEL R. G. An efficient three component one-pot synthesis of some new octahydroquinazolinone derivatives and investigation of their antimicrobial activities. **Arkivoc,** v.vii, p.292-302, 2009.

LARSEN, B.; MONIF, G. R. Understanding the bacterial flora of the femele genital tract. **Clin. Infect. Dis.,** v.32, p.69-77, 2001.

LEITE, B.; GOMES, F.; TEIXEIRA P.; SOUZA C.; PIZZOLITTO, E.; OLIVEIRA, R. In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Curr. Microbiol. v.63, p.313–317, 2011.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilm among strains in natural population of *Candida albicans*. **Microbiol.,** v.149, p.353-362, 2003.

LIN, S. Biosurfactants: recent advences. **J. Chem. Tech. Biotech.,** v.66, p.109-120, 1996.

LIU, Y.; YANG, C. H.; LI, J.; Influence of extracellular polymeric substances on Pseudomonas aeruginosa transport and deposition profiles in porous media. **Environ. Sci. Technol.**, v.42*,* p.159 -165, 2008

LOPEZ-MARTINEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clin. Dermatol.**, v. 28, p. 178-184, 2010

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.,** v.193, p.265-275, 1951.

LUNA-VELASCO, M. A.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CAÑÍZARES-VILLANUEVA, R. O.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* spp. **Proc. Bioch**., v. 42, p. 310–314, 2007.

LYMAN, C. A.; WALSH, T. J. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. **Drugs.,** v.44, p.9-35, 1992.

MACK, D. R.; MICHAIL, S.; WEI, S.; MCDOUGALL, L.; HOLLIGSWORTH, M. A. Probiotics inhibits enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing mucin gene expression. **Am. J. Phys.,** v.276, p.941-950, 1999.

MAHMOUD, A. G.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Am. Soc. Microb.,** v.12, p.501-512, 1999.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microb. Biotech.,** v.58, p.428-434, 2002.

MARRAZZO, J. Vulvovaginal candidiasis. **Brit. Med. Jour.,** v.325, p.586-587, 2002.

MARRAZZO, J. Interpreting the epidemiology and natural history of bacterial vaginosis: Are we still confused? **Anaer.**, v.17, p.186-190, 2011.

MARTIN Jr., H. L.; RICHARDSON , B. A.; NYANGE, P. M.; LAVREYS, L.; HILLIER, S. L.; CHOHAN, B.; MANDALIYA, K.; NDINYA-ACHOLA, J. O. ; BWAYO, J.; KREISS, J. Vaginal *Lactobacilli*, microbial flora, and risk of human

immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. **Th. J. Infect. Dis.,** v.180, p.1863-1868, 1999.

MASTROMARINO, P.; BRIGIDI, P.; MACCHIA, S.; MAGGI, L.; PIROVANO, F.; TRINCHIERI, V.; CONTE, U.; MATTEUZZI, D. Characterization and section of vaginal Lactobacillus strains for the preparation of vaginal tablets. **J. Appl. Microbiol.,** v.96, p.884-893, 2002.

MAYER, T. U.; KAPOOR, T. M.; HAGGARTY, S. J.; KING, R. W. SCHREIBER, S. L. MITCHISON, T. J. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. **Scien.,** v.286, p.971-974, 1999.

MENDLING, W.; MARTIUS, J.; HOYME, U.B. S1- Guideline on Bacterial Geburtsh Frauenheilk v. 74, p. 51-54, 2014.

MENEZES, E. A.; MENEZES' E. A.; CAVALCANTE' M.S.; FARIAS, R. B.; TEIXEIRA, A. B.; PINHEIRO, F. G.; BEZERRA, B. P.; TORRES, J. C. N.; CUNHA, F. A. Freqüência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. **J. Brás. Pat. Med. Labor.,** v.14, p.9-13, 2005.

MERZ, W. G. Susceptibility testing of medically important fungi. **Adv. Exp. Med. Biol.,** v.202, p.127-134, 1986.

MERZ, W. G. *Candida albicans* strain delineation. **Clin. Microbiol.,** v.3, p.321-334, 1990.

METTS, J., FAMULA, T. R., TRENEV, N., CLEMENS, R. A. *Lactobacillus acidophilus*, strain NAS (H_2O_2 positive), in reduction of recurrent candidal vulvovaginitis. **J. Appl. Res.,** v.3, p.340-348, 2003.

MEEUWIS KAP ET AL. Skin cancer and (pre)malignancies of the female genital tract in renal transplant recipients. **Transp. Intern.** v. 23 P.191-199, 2010.

MEYLHEUC,T.; RENAUL,T. M.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes***. Int. J. Food Microbiol**., v.109, p.71–78, 2006.

MILLSAP, K,; REID, G.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Adhesion of *Lactobacilus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow. **Biomat.,** v.18, p.87-91, 1996.

MIRELES, J. R.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R. M. *Salmonella enterica serovar typhimurium* swarming mutants with altered biofilm formation abilities inhibits biofilm formation. **J. Bacter.,** v.183, p.5848-5854, 2001.

MOLDES, A.B.; PARADELO, R.; VECINO, X.; CRUZ, J.M.; GUDIÑA, E.; RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUEZ, J.M.; BARRAL, M.T. Partial

characterization of biosurfactant from lacotobacillus pentosus and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. Biomed Res. Intern., p.6, 2013.

MOLERO, G.; DÍEZ-OREJAS, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; MONTEOLIVA, L.; PLA, J.; GIL, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M.; NOMBELA, C. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. **Internat. Microbiol.,** v.1, p.95-106, 1998.

MORAIS, I. M. C. ; CLAUDINO A., L. R.; CHAVASCO J. M.; BIRMAN, E. G.; GAMBALE W.; ALEVA N. A.; DIAS, A. L. T.; PAULA, C. R.; CHAVASCO, J. K. Antifungal susceptibility evaluation of *Candida albicans* isolated from buccal lesions of hiv-positive and HIV-negative patients. **Rev. da Univ. Val. do Rio Verde**, v. 10, p. 156-166, 2012.

MORAN, A.; MARTINEZ, A. M.; SINERIZ, F. Quantification of surfactin in culture supernatant by hemolytic activity**. Biotechnol. Lett.,** Arch. Of Otolaryng. Head Neck Surgery. , v. 112, p. 321-325, 1986.

MORITA, T.; MASAAKI, K.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Physiological differences in the formation of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, between *Pseudozyma antarctica* and *Pseudozyma aphidis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 74, p. 307-315, 2007.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environ. Poll.,** v.133, p.183-189, 2005.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Curr. Op. Coll. & Interf. Sc.,** v. 14, p. 372-378, 2009.

NADER-MACIAS, M. E.; RUIZ, C. S.;BOCANERA, M. E. L.; HOLGADO, A. A. P. R. Preventive and therapeutic effects of *Lactobacilli* on urinary tract infections in mice: CLINICAL MICROBIOLOGY. **Anaer.,** v.2, p.85-93, 1996.

NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição*. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEU, T. Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microb. Rev.,** v.60, p.151-156, 1996.

NEU, T.; MARSHALL, K. C. Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces. **J. Biomat. Appl.,** v.5, p.107-133, 1990.

NIES, A.S.; SPIELBERG, S.E. Principles of Therapeutics. In: Goodman & Gilman"s The Pharmacological Basis of Therapeutcs**.** 9th ed. New York: Mc Graw-Hill; p. 43-62, 1996.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quim. Nova,** v.25, p.772-776, 2002.

NISTSCHKE, M.; COSTA, S. G. Biosurfactants in food industry. **Trend. Food Sc. Technol.**, v. 18, p. 252-259, 2007.

NOVERR, M. C.; NAGGLE, R. M.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Role and antibiotics and fungal microbiota in clining pulmonary allergic reponses. **Infect. Immun.,** v.72, p.4996-5003, 2004.

NUGENT, R.P.; KROHN, M.A.; HILLIER, S.L. Reabiliting of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation**. J. Clin. Microbiol.**, v.29, p. 297-301, 1991.

NWANYANWU, C.E.; ALISI, C.S.; NWEKE, C.O.; ORJI, J.C. Cell surface properties of phenolutilizing bacteria isolated from petroleum refinery wastewater. **J. Res. Biol.,** v. 2, p.383-391, 2012.

NYIRJESY, P. Chronic vulvovaginal candidiasis. **Am. Fam. Phys.,** v.63, p.697-702, 2001.

O'SULLIVAN, J. M.; JENKINSON, H. F.; CANNON, R. D. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsortion of salevary proteins to the streptococcal. **Microbiol.,** v.146, p.41-48, 2000.

OAKLEY, B. B.; FIELDER, T. L.; MARRAZZO, J.M.; FREDRICKS, D.N.; Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis, **App. Envir. Microbiol.,** v.74, p.4898-4909, 2008.

ÖZKAY, Y.; TUNALI, Y.; KARACA, H.; IŞIKDAĞ. I. Antimicrobial activity of a new series of benzimidazole derivatives, **Arch. Pharm. Res.**, v. 34(9):p.1427-1435, 2011.

ODDS, F. C*. Candida* and candidosis. 2.ed. London: **Bailliér. Tind.,** 468 p., 1988.

ODUYEBO, O.O.; AFOLABI, B. A.; OGUNSOLA, F. T.; OSUNTOKI, A.;ANORLU, R. I. Correlation of H2O2 production of *Lactobacillus species* with Nugent scores of young nigerian women. **J. Brit. Microbiol. Res.**, v.3, p. 557-563, 2013.

OLIVEIRA, D. R. Physico-chemical aspects of adhesion. In: Biofilms – Science and Technology. Ed. Melo, L. F.; Bolt, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. Dordrecht: **Kluw. Acad. Publis.,** v.223, p.45-48, 1992.

OLIVEIRA E. H.; SOARES L. F. Prevalence of vaginitis infectious through the clinical cytology: A study in the Central Laboratory of Public Health of the Piauí, **R.B.A.C.,** v.39, p.33-35, 2007.

OLMSTED, S.S.; MEYN, L.A.; ROHAN, L.C.; HILLIER, S.L. Glycosidase and proteinase activity of anaerobic gram-negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis. **Sex. Transm. Dis.,** v.30, p.257-261, 2003.

OLTENAU, V.; SICUIA, O.; CIUCA, M.; CARSTEA, D. M.; VOIADES, C.; CAMPEANY, G.; CORNEA, C. P.; Production of biossurfactants and antifungal compounds by new strains of Bacillus spp. isolated from different sources. **Rom. Biotechnol. Lett.**, v. 16, 2011.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **Int. J. Sci.**, v. 12, p. 633-654, 2011.

PARASZKIEWICZ, K..; KANWA, A.; DIUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **J. Biotechnol***., v*. 92, p. 287-294, 2002.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J. DE; SILVA, C. A. DE S.; SOARES, N. F. F.; SILVA, E. A. M. DA**.; Braz. Arch. Biol. Technol.** *,* v.47, p.77, 2004.

PARK, H.; MYERS, C. L.; SHEPPARD, D. C.; PHAN, Q. T.; SANCHEZ, A. A.;JOHN E. EDWARDS JR, J. E.; FILLER, S. G. Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. **Cell. Microbiol.,** v.7, p.499-510, 2005.

PASCUAL, L. M.; DANIELE, M. B.; PÁJARO, C.; BARBERIS, L. *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. **Contracep.,** v.73, p.78-81, 2006.

PASCUAL, L. M.; DANIELE, M. B.; RUIZ, F.; GIORDANO, W.; PÁJARO, C.; BARBERIS, L. GEN, J. Appl. Microbiol., v. 54, p. 141, 2008.

PATIL, A. D.; KUMAR, N. V.; KOKKE, W. C.; BEAN, M. F.; FREYER, A. J.; DE BROSSE, C.; MAI, S.; TRUNED, A.; FAULDNER, D. J.; CARTE B.; BREEN, A. L.; HERTZBERG, R. P.; JOHNSON, R. K.; WESTLEY, J. W.; POTTS, B. C. M. Novel alkaloids from the sponge *Batzella* sp.: Inhibitors of HIV gp120-Human CD4 binding. **J. Org. Chem.,** v.60, p.1182-1188, 1995.

PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W. Yeasts from beaches in the southern area of São Paulo state “baixada santista”, **Brasil. Rev. Microbiol.**, v.14, p.136-143, 1983.

PAVLOVA, S.I.; KILIC, S.S.; SO, J.S.;SO, J.S.; NADER-MACIAS, M.E.; SIMOES, J.A. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. **J. Appl. Microbiol.,** v.92,p.451-459, 2002.

PERSSON, J. C.; JANNASCH, P.; Intrinsically Proton-Conducting Benzimidazole Units Tethered to Polysiloxanes. **Macromol.**, v.38, p.3283-3289. 2005.

PETERS, T.; LINDENMAIER H.; HAEFELI, W. E.; WEISS, J. Interaction of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol with P-glycoprotein. **Naun-Schmied. Arch Pharm.,** v.372, p.291-299, 2006.

PFALLER, M. A. Strains variation among *Candida* species: application of various typing methods to study the epidemiology and pathogenesis of candidiasis in hospitalized patients. **Infect. Control.,** v.8, p.273-276, 1987.

PFALLER, M. A.; BURMEISTER, L.; BARTLETT, M. S.; RINALDI, M. G. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **J. Clin. Microbiol.,** v.26, p. 1437-1441, 1988.

PFALLER, M. A.; DUPONT, B.; KOBAYASHI, G. S.; MULLER, J.; MICHAEL G. RINALDI, M. G.; ESPINEL-INGROFF, A.; SHADOMY, S.; TROKE, P. F.; WALSH, T. J.; WARNOCK, D. W. Standardized susceptibility testig of fluconazole; an international collaborative study. **Antimicrob. Agent Chemother.,** v.36, p.1805-1809, 1992.

PHETRONG, K.; H-KITTIKUN, A.; MANEERAT, S. Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. **Songkl. J. of Sc. and Technol.**, v. 30, p. 297-305, 2008.,

PORTILLA-RIVERA, O.; TORRADO, A.; DOMINGUEZ, J. M.; MOLDES, A. B. Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 8074, 2008.

POTHIRAJ, C.; VELAN, A. S.; JOSEPH, J.; RAMAN, N. Simple method of preparation and characterization of new antifungal active Biginelli type hetrocyclic compounds. **Mycobiol.,** v.36, p. 66-69, 2008.

PRATT-TERSPSTRA, I. M.; WEERKAMP, A. H.; BUSSCHER, H. J. Microbial factors in a thermodynamic approach of oral streptococcal adhesion to solid sbstrata. **J. Coll. Interf. Scien.,** v.129, p.568-574, 1989.

RABE, L.K.; HILLIER, S.L. Optimization of media for detection of Hydrogen Peroxide production by *Lactobacillus* species. **J. of Clin. Microbiol.**, v.41, p.3260-3264, 2003.

REDONDO-LOPEZ, V.; COOK, R. L.; SOBEL, J. D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. **Rev. Infec. Dis.,** v.12, p.856-872, 1990.

REID, G. Current scientific understanding of urinary tract infections in women: an overview. **World J. Urol.,** v.17, p.336-338, 1999a.

REID, G. Biofilms in infectious disease and on medical devices. **Internat. J. Antim. Agent.,** v.11, p.223-226,1999b.

REID, G. *In vitro* testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. **Intern. Dair. J.,** v.10, p.415-419, 2000.

REID, G.; BRUCE A. W.; COOK, R. L.; LLANO M. Effect on the urogenital flora of antibiotic therapy for urinary tract infection. **Scand. J. Infect. Dis.,** v.22, p.43-47, 1990.

REID, G.; BRUCE, A.; FRASER, N.; HEINEMANN,C.; OWEN, J.; HENRING, B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. **FEMS Immun. Med. Microb.,** v.30, p.49-52, 2001.

REID, G.; BRUCE, A.; SMEIANOV, V. The role of *Lactobacilli* in preventing urogenital and intestinal infections. **Intern. Dair. J.,** v.8, p.555-562, 1998.

REID, G.; TIESZER, C.; FOERCH, R.; BUSSCHER, H. J; KHOURY, A. E.; VAN DER MEI, H. C. The binding of urinary components and uropathogens to a silicone latex urethral catheter. **Cells. Mater.,** v.2, p.253-260, 1992.

RENIERO, R.; COCCONCELLI, P. S.; BOTTAZZI, V.; L. MORELLI. High-frequency conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. **J. Gen. Microbiol***.* v.138, p.763-768, 1991.

REX, J. H.; MICHAEL, A. PFALLER, M. A.; RINALDI, M.G.; POLAK, A;. JOHN, N.; GALGIANI, J. N. Antifungal susceptibility testing. **Clin. Microbiol. Rev.,** v.6, p.367-381, 1993.

REX, J. H., PFALLER, M. A., WALSH, T., CHATURVEDI, V., ESPINEL-INGROFF, A., GANNOUM, M. A., GOSEY, L. L., ODDS, F. C., REINALDI, M. G., SHEEHAN, D. J., WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microb. Rev.,** v.14, p.643-651, 2001.

RIVARDO,F.; MARTINOTTI, M.G.; TURNER, R.J.; CERI, H. Synergistic effect of lipopeptide biosurfactant with antibiotics against *Escherichia coli* CFT073 biofilm. **Intern. J. of Antim. Ag.** v.37, p.324–331, 2011.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. Fungal infections – diagnosis and management. London Blacwell, **Antifung. drugs**. Cap.3, p.17-43, 1993.,

RODRIGUES, L. R. Biosurfactants production by probiotic bacteria and inhibition of voice prostheses microbial colonization. Portugal. **Univ. Minho**, (Tese de doutorado), 2005 (b).

RODRIGUES, L. R.; BANAT, I. M.; VAN DER MEI, H. C.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Interference in adhesion of bactéria and yeast isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **J. Appl. Microb.,** In press. 2005 (c).

RODRIGUES, L. R.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Strategies for the prevention of microbial biofilm formation on silicone rubber voice prostheses. **J. Biomed. Mater. Res. B: Appl.Biomat.** v.81, p. 358- 370, 2007.

RODRIGUES, L.R.; MOIDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Bioch. Engin. J.,** In press. 2006 a.

RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R., Biosurfactants: Potencial applications in medicine. **J. Ant. Chemother.,** v. 57, p. 609-618, 2006.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; VAN DER MEI, H. C.; OLIVEIRA, R. Phycochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus lactis* 53. **Coll. surf B: Biointerfaces,** v. 49, p. 79-86, 2006b.

RODRIGUES L. R.; VAN DER MEI, H. C.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA , R. Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibit microbial adhesion on silicone rubber. **Appl. Microb. Biotech.,** v.66, p.306-311, 2004(a).

RODRIGUES L. R.; VAN DER MEI, H. C.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA , R. Influence of biosurfactants from probiotic bactéria on formation of biofilms on voice prostheses. **Appl. Environ. Microb.,** v.70, p.4408-4410, 2004(b).

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microb. Lett.,** v.9, p.29-33, 1980.

ROSENBERG, E.; RON E. Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** v.52, p.154-162, 1999.

ROSSOLINI, G.; THALLER,M. “Coping with antibiotic resistance: contributions from genomics,” Gen. Med., v. 2, article 15, 2010.

ROVNYAK, G. C.; ATWAL, K. S.; HEDBERG, A.; KIMBALL, S. D.;MORELAND, S.; GOUGOUTAS, J. Z.; O’REILLEY, B. C.; SCHWARTZ, J.; MALLEY, M. F.;

Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 4.Basic 3-substituted-4-aryl-1,4-dihydropyrimidine-5-carboxylic acid esters. Potent antihypertensive agents. **J. Med Chem.,** v.35, p.3254-3263, 1992.

SAKOWICZ, R.; FINER, J. T.; BERAUD, C.; CROMPTON, A.; LEWIS, E.; FRITSCH, A.; LEE, Y.; MAK, J.; MOODY, R.; TURINCIO, R.; CHABALA, J. C.; GONZALES, P.; ROTH, S.; WEITMAN, S.; WOOD, K. W. Antitumor activity of a kinesin inhibitor. **Cancer Res.,** v.64, p.3276-3280, 2004.

SAMARANAYAKE, L.P.; SCHEUTZ, F.; COTTONE, J.A. Controle da infecção para a equipe odontológica. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995.

SAMARANAYAKE, L. P. & MacFARLANE, T. W. The effect of dietary carbohydrates on the in-vitro adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells. **J. Méd. Microbiol.,** v.15, p.511-517, 1982.

SAMBANTHAMOORTHY, K.; GOKHALE, A.A.; LAO, W.; PARASHAR, V.; NEIDITCH, M.B.; SEMMELHACK, M.F.; LEE, I. and WATERS, C.M. Identification of a Novel Benzoimidazole That Inhibits Bacterial Biofilm Formation in a Broad-Spectrum Manner. **Antim. Ag. and Chemot.** v.55 p. 4369–4378, 2011.

SCHACHTSIEK, M., HAMMES, P. W.; HERTEL, C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 2001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. **Appl. Environ.Microbiol.,** v.70, p.7078-7085, 2004

SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L. and GOODWIN, A. Antimicrobial susceptibility testing protocols. **CRC Press, Boca Raton**, p 209,2007.

SEWANKABO, N. K.; GRAY, R. H.; WAWER, M. J. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. **The Lancet.,** v.350, p.546-550, 1997.

SHENG, J.; NGUYEN, P.T.M.; BALDECK, J.D.; OLSSON, J. and MARQUIS, R.E. Antimicrobial actions of benzoimidazoles against the oral anaerobes *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia*. **Arch. of Oral Biol**. v.51, 1015—1023, 2006.

SHEHAB, W.S.; ELEIWA,N.Z.H.; MOUNEIR S.M.**,** Synthesis,Characterization and Evaluation of the Anticancer and Antimicrobial Activities of Some Novel Benzazole and Benzazine Derivatives. **J. of Adv. in Chem.,** v.3, p.102-111,2010

SHIP, J. A. ; VISSINK, A.; CHALLACOMBE, S. J. Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. **Or. Surg., Or. Med., Or. Pathol., Or. Radiol. Endodont.,** v.103 , p.S6e1-S6e14, 2007.

SINGH, V.; ARORA, V.; ALAM, M.J. and GAREY K.W. Inhibition of Biofilm Formation by Esomeprazole in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus.* Antim. Ag. and Chem. v.56, p.4360–4364, 2012.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnol. Adv**., v. 25, p. 99-121, 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Tren. Biotech.,** v.22, p.142-146, 2004.

SINGH, O. M.; SINGH, S. J.; DEVI, M. B.; DEVI, L. N.; SINGH, N. I.; LEE, S. G.; Synthesis and in vitro evaluation of the antifungal activities of dihydropyrimidinones. **Bioorg. & Med. Chem. Lett.,** v.18, p.6462-6267, 2008.

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANNAT I. M.; Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipds. In: Timmis KN (ed) Hand book of hydrocarbon and lipid microbiology**. Springer,** p. 3705-3723, 2010.

SOBEL, J. D. Current concoptis: vaginitis. **New Eng. J. Med.,** v.337, p.1896-1903, 1997.

SOBEL J.D.; FERRIS, D.; SCHWEBKE, J. Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. **Am. J. Obstet. Gynecol**. v.194, p.1283–1289, 2006**.**

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis . **Lancet.**, v. 369, p. 1961-1971, 2007.
SOMMER, P.; MARTIN-ROUAS, C.; METTLER, E. Influence of the adherent population level on biofim population, structure and resistence to chlorination. **Food Microbiol.**, v.16, p.503-505, 1999.

SOUZA, E. M. B. *Candida albicans:* Sorotipagem estudo de alguns aspectos morfisiológicos de amostras isoladas de diversos materiais clínicos. São Paulo. **Inst. Ciênc. Bioméd. USP** (Dissertação de Mestrado) 1988.

SOUZA, E. M. B.; PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, V.; CORREA, B.; CURY, A. E. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade à antifúngicos de amostras de *Candida albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. **Rev. Microbiol.,** v.21, p.247-253, 1990.

SPENCER R. J.; CHESSON, A. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic Escherichia coli to isotated porcine enterocytes. **J. Appl. Bacteriol.,** v.77, p.215-220, 1994.

SPINILLO, A.; CAPUZZO, E.; GULMINETTI, R.; MARONE, P.; COLONNA, L.; PIAZZI,G. Prevalence of and risk factors for fungal vaginitis caused by non-*albicans* species. **Am. J. Obstet. Gynecol.,** v.176, p.138-141, 1997.

SPURBECK RR, ARVIDSON CG. Inhibition of Neisseria gonorrhoeae epithelial cell interactions by vaginal *Lactobacillus* species. **Infect. Immun**., v.76, p.3124-3130, 2008.

SUDBERRY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trend. Microb.,** v.12, p.317-324, 2004.

SUDO, T.; ZHAO, X.; WAKAMATSU, Y.; SHIBAHARA, M.; NOMURA, N. Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids. **Cytotechn.,** v.33, p.259–264, 2000.

SWEBERG, J.; STEINER, J.F.; DEISS, P.; DRIGGERS, D.A. Comparison of single-dose vs one-week course of metronidazole for symptomatic bacterial vaginosis. **J.A.M.A.,** v.254, p.1046-1049, 1985.

SWIDSINSKI, A.; MENDLING, W.; LOENING-BAUCKE, V. An adherent Gardnerella vaginalis biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole**. Am J Obstet Gynecol**., v.198, p.97, 2008.

SWIDSINSKI, A.; DÖRFFEL, Y.; LOENING-BAUCKE, V. Dissimilarity in the occurrence of bifidobacteriaceae in vaginal and perianal microbiota in women with bacterial vaginosis. **Anaer.,** v.16: p.478-482, 2010a.

SWIDSINSKI, A.; DÖRFFEL, Y.; LOENING-BAUCKE, V. Gardnerella biofilm involves females and males and is sexually transmitted. **Gynecol Obstet Invest** . v.70, p.256–263, 2010b.

SWIDSINSKI, A.; DÖRFFEL, Y.; LOENING-BAUCKE,V. Desquamated epithelial cells covered with a polymicrobial biofilm typical for bacterial vaginosis are present in randomly selected cryopreserved donor semen. FEMS **Immunol Med Microbiol**.. v.59: p.399-404, 2010c.

TAHMOURESPOUR, A.; SALEHI, R.; KERMANSHAHI, R. K. *Lactobacillus acidophilus*- derived biosurfactant effect on *GTFB* and *GTFC* expression level in *Streptococcus mutans* biofilm cells. **Braz. J. Microbiol.**, v. 42, p. 330-339, 2011.

TEXTER, J.; ZIEMER, P.; RHOADES, S.; CLEMANS, D. Bactericidal silver ion delivery into hydrophobic coatings with surfactants. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.34, p.571–575, 2007.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL, G. Effect of lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS Microb. Lett.,** v.128, p.101-106, 1995.

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of momo and di succinyl trehalose lipids by a strain of *Rodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Agricult. Biolog. Chem.,** v.53, p.757-763, 1989.

VAN BOGAERT, I.N.A.; ZHANG, J. and SOETAERT, W. “Microbial synthesis of sophorolipids,” **Proc. Biochem.,** v. 46, p. 821–833, 2011

VAN HOOGNOED, C. G.; VAN DER KUIJL-BOOIJ, M.; VAN DER MEI, H. C.; BUSCCHER, H. J. Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salevary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strain. **Appl. Envirom. Microb.,** v.66, p.659-663, 2000.

VAN KESSEL, K.; ASSEFI, N.; MARRAZZO, J.; ECKERT, L. Common complementary alternative therapies for yeast vaginitis and bacterial vaginosis: a systematic review. **Obst. Gyn. Surv.,** v.58, p.351-358, 2003.

VAN OSS, C. J. The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles – their determination and relative roles. **Biofouling.,** v.4, p.25-35, 1991.

VANDEN BOSSCHE, H.; WILLEMSENS, G.; MARICHAL, P. Anti-*Candida* drugs-the biochemical basis for their activity. **Crit. Ver. Microbiol.,** v.15, p.57-72, 1987.

VANDEVOORDE, L.; CHRISTIAENS, H.; VERSTRAETE, W. Prevalence of coaggregation among chicken lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol.,** v. 72, p. 214–219, 1992.

VELRAEDS, M. M. C.; VAN DE BELT-GRITTER, B.; VAN DER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. J. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yests to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. **J. Med. Microb.,** v.47, p.1081-1085, 1998.

VELRAEDS, M. M. C.; VAN DER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. J. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactats released by *Lactobacillus* strains. Colloids and Surfaces B; **Biointerf.,** v.8, p.51-61, 1996a.

VELRAEDS, M. M. C.; VAN DER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. J. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 62, p.1958-1963, 1996b.

VELRAEDS, M. M. C.; VAN DER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. J. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* to solid by an adsorbed biosurfactant layer from *Lactobacillus acidophilus*. **Urol.,** v.49, p.790-794, 1997.

VERSTREPEN, K. J. ; KLIS, F. M. Floculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol. Microbiol.,** v.60, p.5-15, 2006.

VOLTAN, S. CATAGLIUOLO, M. E.; LONGO, S.; BRUN, P.; D’INCA, R.; PORZIOMATO A.; MACCHI, V.; PALÙ, G.; STURNIOLO, G. C.; MORELLI, L.; MARTINES, D. **Clin. Vaccine Imunoll.,** v.14, p.1138-1345, 2007.

WANG, C.L.; NG, T.B.; CAO, X.H.; JIANG, Y.; LIU, Z.K. CLP induces apoptosis in human leukemia K562 cells through Ca2+ regulating extracellular relatedprotein kinase ERK activation. **Cancer Letters**, v.276, p.221-227,2009.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microb. Rev.,** v.11, p.382-402, 1998.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegrad.,** v.7, p. 415-423, 1997.

WILSON, J. Managing recurrent bacterial vaginosis. **Sex. Transm. Infec**., v.80, p.8-11, 2004.

WYNNE, A. G.; McCARTINEY, A. L.; BROSTOFF, J.; HUDSPITH, B. N.; GIBSON, G. R. An in vitro assessment of the effects of broad-spectrum antibiotics on the human gut microflora and concominant isolation of a *Lactobacillus plantarum* with anti-*Candida* activities. **Anaer.,** v.10, p.165-169, 2004.

XAVIER,J.B., PICIOREANU,C., ALMEIDA,J.S., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Bol. de Biotecn.,** v.76, p.2-13, 2005.

YANG, C. W.; BARKHAM; T. M. S.; CHAN, F. Y.; WANG, Y. Prevalence of *Candida* species, including *Candida dubliniensis*, in Singapore. **J. Clin. Microb.,** v.41, p.472-474, 2003.

YOSHIDA, H. J, SUGIYAMA, T.T., MORI I.K.N..; YOKOCHI, T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enters hemorrhagic *E. coli* infection of human intestinal cells in vitro. **Microbiol. Immunol**. v.47, p.405-409, 2003.

ZAAS, A.K. Echinocandins: a wealth of choice.how clinically different are they? **Curr. Opin. Infect. Dis.,** v.21, p.426-432, 2008.

ZARB, P and GOOSSENS , H. Human use of antimicrobial agents. **Rev. Sci.Tech**. v.31(1), p.121-133, 2012.

ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: Effect of temperature and hydrophobicity. **Curr. Microbiol**., v.61, p.554-559, 2010.

ZHANG, J.; LEE, S.; GROSSS, R. A.; KAPLAN, D. Surface properties of emulsan-anlogs. **J. Chem. Tech. Biol**., v.74, p.759-765, 1999.

ZHANG, D.; WANG, Z.; XU, W.; SUN, F.; TANG, L.; WANG, J. Design, synthesis and anti-bacterial activity of novel actinonin derivatives containing benzoimidazole heterocycles. **Eur. J. Med.Chem**.,v. 44, p.2202- 2210, 2009.

ZHAO, X.; GELTINGER, C;. KISHIKAWA ,S;. OHSHIMA, K;. MURATA, T. Treatment of mouse melanoma cells with phorbol 12-myristate 13-acetate counteracts mannosylerythritol lipid-induced growth arrest and apoptosis. **Cytotechn**., v.33, p.123–130, 2000.

ZHOU, X.; BENT, S. J.; SCHNEIDER, M. G.; DAVIS, C. C.; ISLAM, M. R.; FORNEY, L. J. Characterization of vaginal microbial commnities in adult healthy women using cultivation-independent methods. **Microbiol.,** v.150, p.2565-2573, 2004.

ZHONG, W.; MILLSAP, K.; BIALKOWSKA-HORBRZANSKA, H.; REID, G. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.64, p.2418-2423, 1998.

ZITOUNI, G. T.; DEMIRAYAK, S.; OZDEMIR, A.; KAPLANCIKLI, Z. A.; YILDIZ, M. T.; Insecticidal potentiality of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on the Mediterranean fruit fly Ceratitis capitata: which prospects? **EUR. J. Med. Chem**., v.39, p.267-270, 2003.

ANEXO I:

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) dos dados de crescimento de diferentes isolados de *Lactobacillus* cultivados em aerobiose e anaerobiose

Parâmetro	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	Valor de F	Valor de P
CONDIÇÃO DE CULTIVO	1	0.645176	0.645176	9.635	0.0032 *
ISOLADO	23	8.701629	0.378332	5.650	0.0000*
BLOCO	1	0.002109	0.002109	0.031	0.8599^{ns}
CONDIÇÃO DE CULTIVO*ISOLADO	23	3.105938	0.135041	2.017	0.0209*
Erro	47	3.147330	0.066964		
Total corrigido 95	**15.602183**				

CV (%) = 72.94 Média geral:0.3547708 Número de observações: 96

* - significativo, pelo teste de F, no nível de 5% de probabilidade

ns - não significativo, pelo teste de F, no nível de 5% de probabilidade

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) dos dados de *E24* para condições de cultivo aerobiose e anaerobiose), diferentes extratos (intracelular e extracelular) e solvente hidrofóbico tolueno

Parâmetro	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	Valor de F	Valor de P
Expressão	1	714.240181	714.240181	2.814	0.0961^{ns}
Condições de cultivo	1	383.538427	383.538427	1.511	0.2215^{ns}
Isolado	23	23592.077646	1025.742506	4.041	0.0000*
Bloco	1	379.837769	379.837769	1.496	0.2237^{ns}
Expressão x cultivo	1	2595.985810	2595.985810	10.227	0.0018*
Expressão x isolado	23	20067.084224	872.481923	3.437	0.0000*
Condições de cultivo isolado	23	20136.848478	875.515151	3.449	0.0000*
Erro	117	29698.581183	253.834027		
CV (%) = 82.36 Média geral: 11.5286458 Número de observações: 191					
Total corrigido 190	**97568.193717**				

* - significativo, pelo teste de F, no nível de 5% de probabilidade

ns - não significativo, pelo teste de F, no nível de 5% de probabilidade

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) dos dados de *E24* para condições de cultivo (aerobiose e anaerobiose), diferentes extratos (intracelular e extracelular) e solvente hidrofóbico querosene.

Parâmetro	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	Valor de F	Valor de P
Expressão	1	827.095052	827.095052	9.714	0.0023*
Condições de cultivo	1	32.095052	32.095052	0.377	0.5404^{ns}
Isolado	23	16191.248698	703.967335	8.267	0.0000*
Bloco	1	50.532552	50.532552	0.593	0.4426^{ns}
Expressão x condições de cultivo	1	260.167969	260.167969	3.055	0.0831^{ns}
Expressão x isolado	23	9946.561198	432.459183	5.079	0.0000*
Condições de cultivo	23	12085.311198	525.448313	6.171	0.0000*

x isolado			
Erro	118	10047.580729	85.148989
CV (%) = 80,04	**Média geral: 11.5286458**	**Número de observações: 192**	
Total corrigido	**191**	**49440.592448**	

* - significativo, pelo teste de F, no nível de 5% de probabilidade

ns - não significativo, pelo teste de F, no nível de 5% de probabilidade

Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) dos dados de atividade surfactante para condições de cultivo (aerobiose e anaerobiose), diferentes extratos (intracelular e extracelular) e solventes hidrofóbicos (tolueno e querosene)

Parâmetro	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	Valor de F	Valor de P
ISOLADO	23	44.125000	1.918478	17.732	0,0000*
CONDIÇÃO DE CULTIVO	1	1.008333	1.008333	9.320	0.0024*
EXPRESSÃO	1	2.133333	2.133333	19.718	0.0000*
EXPxCONDIÇÃO DE CULTIVO	1	0.833333	0.833333	7.702	0.0058*
EXPxISOLADO	23	52.116667	2.265942	20.943	0.0000*
CONDIÇÃO DE CULTIVOxISOLADO	23	10.191667	0.443116	4.096	0.0000*
ERROR	403	43.602083	0.108194		
TOTAL	479	154.625000			

CV(%) = 8.10 Média geral:4.0625000 Número de observações:480

* - significativo, pelo teste de F, no nível de 5% de probabilidade