

EFEITO DO BROMETO DE CETILTRIMETILAMÔNIO
NO METABOLISMO E NA FISIOLOGIA
DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS

43/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

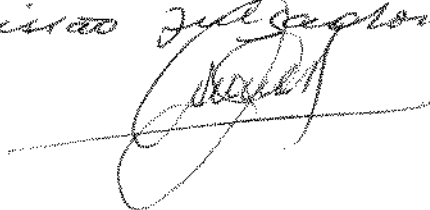
MARIKO UENO

EFEITO DO BROMETO DE CETILTRIMETILAMÔNIO
NO METABOLISMO E NA FISIOLOGIA

Parcial

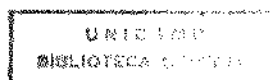
DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS

*Este exemplar corresponde a redação final da tese
defendida por Mariko Ueno e aprovada pela
comissão julgadora em 17.12.92.*

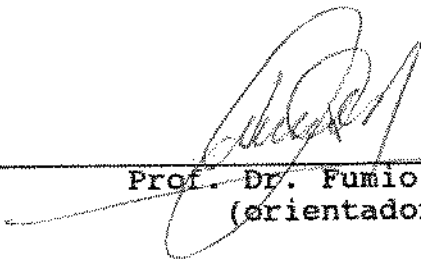


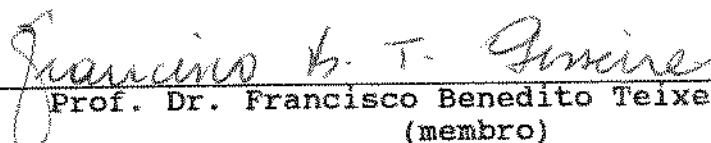
Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos para a
obtenção do título de Doutor em
Ciência de Alimentos.

orientador - Prof.Dr. FUMIO, YOKOYA†



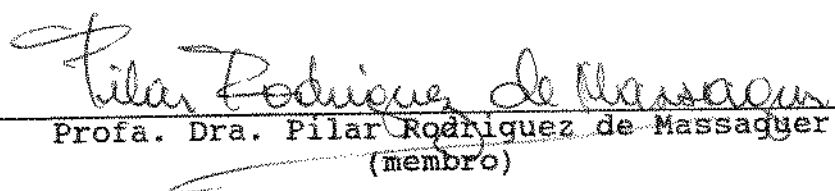
BANCA EXAMINADORA

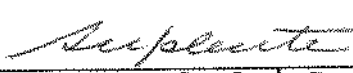

Prof. Dr. Fumio Yokoya
(orientador)

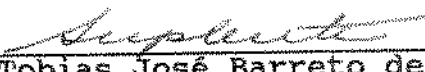

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine
(membro)


Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
(membro)


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(membro)


Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer
(membro)


Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
(membro)


Prof. Dr. Tobias José Barreto de Menezes
(membro)

Campinas, 17 de dezembro de 1992

AGRADEÇO:

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pela orientação.

Ao Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (IQ) pela orientação na determinação da concentração micelar crítica do CTAB em meio de cultura, ao Lauro Camargo Dias Jr. pelo auxílio na realização destas medidas, bem como ao Watson Loh pelas valiosas discussões.

Ao Celso Eduardo Benedetti pela orientação na extração de proteínas celulares.

Ao Prof. Dr. Valdomiro Carlos Sgarbieri (FEA) pela colaboração permitindo a utilização da ultra centrífuga.

À Dra. Mirtha Neely Uboldi Eiroa (ITAL) pela colaboração permitindo a utilização do ultra-sonicador.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (IB) por ter me recebido com tanto carinho em seu laboratório para a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida, bem como à Fabiana Fantinatti pelo auxílio incansável.

À Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder (IB) pela colaboração no preparo do material e observação no microscópio eletrônico.

À todos do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos que indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, bem como aos funcionários da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos por todos os serviços prestados.

À ABIA pelas cópias

À Neusely da Silva e Ilse Paschoal Moreira pela correção deste manuscrito.

Aos amigos Dra. Júlia Prado Franceschi e Dr. Antonio de Pádua Franceschi pelo apoio e amizade nos momentos mais difíceis.

À Raquel, Míriam e Zig pelo auxílio na composição final deste trabalho.

No momento em que esta lista começa a escapar dos limites da Universidade, gostaria de não esquecer daqueles que, por variados motivos, fizeram com que este trabalho se estendesse por um período maior que o necessário. A estes também agradeço, pois contribuíram para a compreensão que hoje tenho de mim mesma e do meu universo. Deles me lembrarei sempre, através do ensaio "Liberdade" de Albert Einstein:

"... O desenvolvimento da ciência e das atividades criadoras do espírito em geral requer ainda outro tipo de liberdade, que pode ser caracterizada como liberdade interior. (...). Esta liberdade interior é um raro dom da natureza e um objetivo digno de ser conquistado pelo indivíduo (...). Assim, as escolas podem prejudicar o desenvolvimento da liberdade interior, nos jovens, através de influências autoritárias e da imposição, de cargas espirituais; por outro lado, as escolas podem favorecer esta liberdade ao encorajar o pensamento independente. Só quando a liberdade exterior e a interior forem constantes e conscientemente conquistadas, haverá a possibilidade de desenvolvimento espiritual e da perfeição e, assim, de melhorar a vida interior e exterior do homem.

Albert Einstein
Ideas and Opinions
Crown Publishers Inc. N.Y., 1964

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Índice.....	iii
Índice de Tabelas.....	vii
Índice de Figuras.....	ix
Resumo.....	xii
Summary.....	xiv
1.Introdução.....	1
2.Revisão Bibliográfica.....	3
2.1.Introdução.....	3
2.2.Estrutura química.....	4
2.3.Sais de monoalquiltrimetilamônio.....	5
2.4.Análise.....	5
2.5.Atividade antimicrobiana.....	6
2.5.1.Influência da estrutura.....	6
2.5.2.Influência do pH.....	7
2.5.3.Influência da temperatura.....	8
2.5.4.Influência de cátions.....	8
2.5.5.Influência de matéria orgânica.....	9
2.5.6.Susceptibilidade de diferentes microrganismos.....	10
2.5.6.1.Bactérias.....	10
2.5.6.2.Vírus.....	10
2.5.6.3.Esporos bacterianos.....	11
2.5.6.4.Fungos.....	12
2.6.Aplicação.....	12
2.7.Toxidez.....	14

2.8.Mecanismo de ação.....	16
2.8.1.Interação primária.....	16
2.8.1.1.Adsorção.....	16
2.8.1.2.Mudanças na mobilidade eletroforética.....	17
2.8.2.Interação secundária.....	18
2.8.2.1.Modificação na permeabilidade celular e liberação de constituintes celulares.....	18
2.8.2.2.Coagulação irreversível dos constituintes citoplasmáticos.....	20
2.8.2.3.Efeitos gerais no metabolismo.....	21
2.9.Resistência ao CTAB.....	23
2.9.1.Lipídeos e resistência.....	24
2.10.Membrana celular.....	25
2.11.Surfatantes e micelas.....	27
2.11.1.Tamanho e forma das micelas.....	27
2.11.2.Concentração micelar crítica.....	30
2.11.3.Absorção de corante.....	30
2.11.4.Interação de surfatante com biomembranas.....	31
2.11.5.Interação de surfatante com proteínas.....	35
3.Materiais.....	39
3.1.Microrganismos utilizados.....	39
3.2.Meios de cultura.....	40
3.3.Enzimas.....	43
3.4.Reagentes.....	43
3.5.Equipamentos.....	44
4.Métodos.....	45
4.1.Formulação de meio de cultura tendo como base o caldo de cana concentrado.....	45
4.2.Determinação da concentração micelar crítica do CTAB e das interações em diferentes meios de cultura.....	47
4.3.Efeito do CTAB no crescimento de bactérias e leveduras em CANA 11.....	48

4.4. Concentração mínima inibitória do CTAB em diferentes meios de cultura.....	49
4.5. Efeito do CTAB na atividade metabólica dos microrganismos.....	49
4.6. Efeito do CTAB na atividade de enzimas.....	50
4.6.1. Efeito na atividade de lactato desidrogenase de células intactas.....	51
4.6.2. Efeito na atividade de lactato desidrogenase de células lisadas.....	51
4.6.3. Efeito na atividade de álcool desidrogenase de células intactas.....	51
4.7. Preparação de protoplastos.....	52
4.7.1. Preparação de protoplastos de <i>Sacch. cerevisiae</i>	52
4.7.2. Preparação de protoplastos de bactérias.....	52
4.8. Ação do CTAB em protoplastos e em células intactas.....	53
4.9. Extração de proteínas celulares.....	54
4.9.1. Extração de proteínas de membrana.....	54
4.9.2. Extração de proteínas do citosol.....	55
4.10. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS..	57
4.11. Coloração de Coomassie blue para proteínas.....	58
4.12. Coloração de prata para proteínas.....	59
4.13. Preservação e secagem dos géis de SDS-PAGE.....	60
4.14. Preparo das telas de microscopia eletrônica.....	60
4.15. Preparo das células, coloração negativa com PTA e visualização.....	61
5. Resultados e Discussão.....	63
5.1. Formulação de meio de cultura.....	63
5.2. Concentração micelar crítica.....	71
5.3. Interação entre CTAB e os componentes dos meios de cultura.....	73

5.4.Crescimento dos microrganismos em CANA 11 com CTAB.....	77
5.5.Concentração mínima inibitória do CTAB em diferentes meios de cultura.....	86
5.6.Efeito do CTAB sobre a atividade enzimática.....	90
5.6.1.Lactato desidrogenase.....	90
5.6.1.1.Efeito do CTAB sobre a lactato desidrogenase de células intactas.....	90
5.6.1.2.Efeito do CTAB sobre a lactato desidrogenase de células lisadas.....	91
5.6.2.Álcool desidrogenase.....	92
5.6.2.1.Efeito do CTAB sobre a álcool desidrogenase de células intactas.....	92
5.7.Efeito do CTAB na atividade metabólica.....	94
5.7.1.Efeito do CTAB na atividade metabólica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	94
5.7.2.Efeito do CTAB na atividade metabólica de <i>A. acetí</i> ...	101
5.7.3.Efeito do CTAB na atividade metabólica de <i>L. mesenteroides</i>	104
5.7.4.Efeito do CTAB na atividade metabólica de <i>E.coli</i> e <i>K. terrigena</i>	106
5.7.5.Efeito do CTAB na atividade metabólica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	110
5.8.Alterações fisiológicas.....	113
5.8.1.Ação do CTAB em protoplastos.....	113
5.8.2.Ação do CTAB em células intactas.....	114
5.9.Ação do CTAB nas proteínas celulares.....	114
5.10.Análise morfológica através de microscopia eletrônica..	122
6.Conclusões.....	125
7.Referências bibliográficas.....	128

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1. Formulação de meio de cultura.....	46
Tabela 2. Concentração de penicilina V utilizada para a obtenção de protoplastos de bactérias.....	53
Tabela 3. Soluções estoque e suas proporções usadas no preparo dos géis de eletroforese em sistema descontínuo dissociante.....	57
Tabela 4. Coloração de prata para proteínas.....	59
Tabela 5. Parâmetros de crescimento de <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Klebsiella</i> <i>terrigena</i> em MRS e em diferentes formulações de meio de cultura, a 30°C.....	69
Tabela 6. Parâmetros de crescimento de <i>Acetobacter acetí</i> e <i>Acetobacter pasteurianus</i> em ACE e em diferentes formulações de meio de cultura, a 30°C e agitação de 100 rpm.....	70
Tabela 7. Concentração micelar crítica de CTAB determinada por adsorção da luz no espectro visível, da eritrosina, a 30°C.....	72
Tabela 8. Concentração de CTAB em que ocorre interação com os componentes dos meios de cultura, a 30°C.....	74
Tabela 9. Parâmetros cinéticos de crescimento dos microrganismos em CANA 11 com diferentes concentrações de CTAB.....	80
Tabela 10. Tempo em minutos necessário para a redução do azul de metileno pela lactato desidrogenase de células intactas, em diferentes concentrações de CTAB.....	91

Tabela 11. Tempo em minutos necessário para a redução do azul de metileno pela lactato desidrogenase de células lisadas, em diferentes concentrações de CTAB.....	92
Tabela 12. Tempo em minutos necessário para a redução do azul de metileno pela álcool desidrogenase de células intactas, em diferentes concentrações de CTAB.....	93
Tabela 13. Produção de CO ₂ e consumo de O ₂ por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em presença de glicose.....	95
Tabela 14. Produção de CO ₂ e consumo de O ₂ por <i>Acetobacter acetí</i> em presença de glicose.....	102
Tabela 15. Produção de CO ₂ e consumo de O ₂ por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em presença de glicose.....	105
Tabela 16. Produção de CO ₂ e consumo de O ₂ por <i>Escherichia coli</i> em presença de glicose.....	107
Tabela 17. Produção de CO ₂ e consumo de O ₂ por <i>Klebsiella terrígena</i> em presença de glicose.....	108
Tabela 18. Produção de CO ₂ e consumo de O ₂ por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em presença de glicose.....	110
Tabela 19. Tempo requerido para lise de protoplastos dos microrganismos em difentes concentrações de CTAB....	114
Tabela 20. Alteração na composição de proteínas celulares em crescimento com CTAB.....	116

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1. Modelo de micela.....	28
Figura 2. Representação esquemática da sequência de eventos na exposição de fosfolipídeos (FL) à quantidades crescentes de surfatante (S).....	32
Figura 3. Representação esquemática da sequência de eventos na exposição de biomembrana à quantidades crescentes de surfatante (S).....	34
Figura 4. Ilustração da interação de moléculas de surfatante com polieletrólito, mostrando a formação de pequenos agregados.....	38
Figura 5. Fluxograma de extração de proteínas celulares.....	56
Figura 6. Curvas de crescimento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em diferentes meios de CANA, a 30°C.....	66
Figura 7. Curvas de crescimento de <i>Lactobacillus fermentum</i> em diferentes meios de CANA, a 30°C.....	66
Figura 8. Curvas de crescimento de <i>Acetobacter aceti</i> em diferentes meios de CANA, a 30°C.....	67
Figura 9. Curvas de crescimento de <i>Acetobacter pasteurianus</i> em diferentes meios de CANA, a 30°C.....	67
Figura 10. Curvas de crescimento de <i>Klebsiella terrigena</i> em diferentes meios de CANA, a 30°C.....	68
Figura 11. Absorbância da eritrosina em função da concentração de CTAB em água.....	71
Figura 12. Absorbância da eritrosina em função da concentração de CTAB no meio ACE.....	71
Figura 13. Espectro de absorção da eritrosina no meio YEPD com concentração crescente de CTAB	73

Figura 14. Absorbância da eritrosina em função da concentração de CTAB nos meios de CANA 11 e MRS.....	76
Figura 15. Absorbância da eritrosina em função da concentração de CTAB no meio ACE.....	76
Figura 16. Curvas de crescimento de <i>A. aceti</i> e <i>A. pasteurianus</i> em CANA 11 com CTAB, a 30°C, 100 rpm.....	78
Figura 17. Curvas de crescimento de <i>L. mesenteroides</i> e <i>L. fermentum</i> em CANA 11 com CTAB, a 30°C.....	79
Figura 18. Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> e <i>K. terrigena</i> em CANA 11 com CTAB a 37°C e 30°C, respectivamente..	83
Figura 19. Curvas de crescimento de <i>Ps. aeruginosa</i> em CANA 11 com CTAB, a 30°C.....	84
Figura 20. Curvas de crescimento de <i>Ps. acidovorans</i> em CANA 11 com CTAB, a 30°C.....	85
Figura 21. Curvas de crescimento de <i>Sacch. cerevisiae</i> em CANA 11 co CTAB, a 30°C.....	87
Figura 22. Concentração mínima inibitória do CTAB em diferentes meios de cultura para diferentes microrganismos.....	88
Figura 23. Curvas de crescimento de <i>Sacch. cerevisiae</i> em MRS e em CANA 11, a 30°C.....	88
Figura 24. Inibição da produção de CO ₂ e do consumo de O ₂ por <i>Sacch. cerevisiae</i> na presença de glicose e CTAB.....	98
Figura 25. Quociente respiratório de <i>Sacch. cerevisiae</i> tratadas com diferentes concentrações de CTAB em presença de glicose.....	99
Figura 26. Inibição da produção de CO ₂ e do consumo de O ₂ por <i>Acetobacter aceti</i> na presença de glicose e CTAB.....	103

Figura 27. Inibição da produção de CO ₂ e do consumo de O ₂ por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> na presença de glicose e CTAB.....	106
Figura 28. Inibição da produção de CO ₂ e do consumo de O ₂ por <i>E. coli</i> na presença de glicose e CTAB.....	109
Figura 29. Inibição da produção de CO ₂ e do consumo de O ₂ por <i>Klebsiella terrigena</i> na presença de glicose e CTAB.....	109
Figura 30. Inibição da produção de CO ₂ e do consumo de O ₂ por <i>Ps. aeruginosa</i> na presença de glicose e CTAB.....	111
Figura 31. Perfil de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 10%, corada com prata,.....	118
Figura 32. Perfil de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 10%, corada com prata....	119
Figura 33. Perfil de proteínas do citosol em gel de poliacrilamida-SDS 10%, corada com coomassie blue..	120
Figura 34. Perfil de proteínas do citosol em gel de poliacrilamida-SDS 10%, corada com coomassie blue..	121
Figura 35. Fotomicrografia de <i>Escherichia coli</i> cultivada com 100 ppm de CTAB.....	123
Figura 36. Fotomicrografia de <i>Escherichia coli</i> cultivada sem CTAB.....	123
Figura 37. <i>Escherichia coli</i> cultivada sem CTAB, formação de pequenos grupos de células.....	124
Figura 38. <i>Escherichia coli</i> cultivada com 100 ppm de CTAB, formação de grandes aglomerados de células.....	124

RESUMO

Foi conduzido um estudo sobre o efeito do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em células de *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cepacia*, *Ps. mendocina*, *Ps. acidovorans* e *Saccharomyces cerevisiae*, com o intuito de esclarecer os mecanismos através dos quais este agente atua como substância antimicrobiana. Avaliou-se seu efeito no crescimento e metabolismo celular, bem como a influência da forma química do composto no seu modo de ação.

A concentração micelar crítica (c.m.c.) do CTAB em meio de cultura é menor do que em água, e em concentrações abaixo da c.m.c. o CTAB interage com as proteínas do meio de cultura. Verificou-se que tanto a forma micelar como a monomérica apresentam ação antibacteriana.

A formulação de meio de cultura mostrou que altas concentrações de magnésio são responsáveis pela longa duração da fase de latência e que *Klebsiella terrigena*, representante da família Enterobacteriaceae mostrou-se pouco exigente quanto aos requerimentos nutricionais, porém, as espécies de *Acetobacter* não apresentaram comportamento semelhante.

A concentração de CTAB necessária para causar inibição do crescimento varia de microrganismo para microrganismo, bem como com o meio de cultura empregado. No caso dos membros do gênero *Acetobacter*, independente do meio de cultura, a inibição do crescimento ocorreu em concentrações abaixo da c.m.c.. Para os membros da família Enterobacteriaceae a inibição do crescimento em meio CANA 11 ocorreu acima da c.m.c., enquanto que em Caldo Nutriente ocorreu abaixo desta.

Pseudomonas aeruginosa, *Ps. cepacia* e *Ps. mendocina* apresentaram-se muito resistentes ao CTAB, o que não ocorreu com *Ps. acidovorans*.

O CTAB inibiu o metabolismo: glicólise, respiração e fermentação em concentrações menores do que as necessárias para a inibição do crescimento. Inibiu também a atividade da lactato desidrogenase e da álcool desidrogenase intracelular de todos os microrganismos testados, embora nas células resistentes, as enzimas tenham sido inibidas somente após lise celular.

A lise de protoplastos induzida por CTAB é a fase terminal de uma série de eventos que se inicia pela desorganização da membrana, porém não foi verificada solubilização da membrana. A parede celular protege a célula de lise, uma vez que células intactas não sofreram lise com as concentrações que causaram lise de protoplastos.

As células resistentes ao CTAB, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cepacia* e *Ps. mendocina* apresentaram perfil de proteínas de membrana e de proteínas do citosol idêntico, quando cultivadas na presença e na ausência de CTAB. Por outro lado, as células de *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena* e *Pseudomonas acidovorans* apresentaram diferenças tanto no perfil de proteínas de membrana, como no perfil de proteínas do citosol.

Observações microscópicas revelaram que as células de *Escherichia coli* cultivadas na presença de CTAB, apresentam diferenças morfológicas marcantes: as células são menores, apresentam superfície rugosa e formam aglomerados de células.

SUMMARY

The effect of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) on cells of *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cepacia*, *Ps. mendocina*, *Ps. acidovorans* and *Saccharomyces cerevisiae* was investigated, in order to elucidate the mechanism of CTAB action. Its effect on cell growth and metabolism, and action of chemical forms of agent were studied.

The critical micelar concentration (c.m.c.) of CTAB in medium was lower than in water and its concentration lower than c.m.c. interact with medium protein. Both free and micelar form of agent were active against microbes.

The formulations of medium has shown that magnesium concentration is responsible for delayed growth. *Klebsiella terrigena* did not have many nutritional requirements but *Acetobacter* spp. were quite fastidious.

The CTAB concentration required for growth inhibition was dependent on microbes as well as on medium composition. *Acetobacter* was inhibited at concentrations below c.m.c. in all tested media. With Enterobacteriaceae the inhibition occurred above c.m.c. in CANA 11 media and below c.m.c. in nutrient broth.

Pseudomonas aeruginosa, *Ps. cepacia* and *Ps. mendocina* were very resistant to CTAB but *Ps. acidovorans* was not.

Glycolysis, respiration and fermentation were inhibited by CTAB at concentration lower than growth inhibition. Lactate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase were also inhibited at low concentration of CTAB. Enzymes from cells resistant to CTAB were sensitive to the agent only after cell disruption.

CTAB caused lysis of protoplast which was a terminal phases of a series of events starting with membrane disorder. No solubilization of membrane was detected. Intact cells were not lysed with CTAB indicating that cell wall protected from lysis.

Bacteria resistant to CTAB, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cepacia* and *Ps. mendocina*, showed identical protein pattern in membrane and citosol when cultivated with agents as compared to control media. *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena* and *Ps. acidovorans* showed different protein pattern in similar circumstances.

Microscopic observation of *E. coli* cells cultivated in medium with CTAB showed different morphology. They were smaller with rough surface and they had tendency to aggregate.

1. INTRODUÇÃO

Em 1916, JACOBS, HEIDELBERGER e colaboradores do Rockefeller Institute relataram a descoberta de uma nova classe de compostos sintéticos que possuíam atividade bactericida. Pela reação de hexametilenotetramina com uma grande quantidade de haletos de alquila ou benzila substituídos, inúmeros sais quaternários foram obtidos desta base. Observou-se que a maioria dos sais possuíam atividade antibacteriana.

Compostos de amônio quaternário são produtos de reação de substituição nucleofílica de haletos de alquila com aminas terciárias. Quimicamente, têm quatro átomos de carbono ligados diretamente ao átomo de nitrogênio através de ligações covalentes, e o ânion normalmente associado ao nitrogênio é cloreto ou brometo

Inicialmente os compostos de amônio quaternário foram amplamente utilizados na assepsia cirúrgica, tanto na preparação do campo cirúrgico, como na desinfecção de instrumentos cirúrgicos não esterilizáveis pelo calor (BARNES, 1942; WILLIAMS et al., 1943; WILLIAMS et al., 1944). A literatura, entretanto, cita diversos casos de bacteremia causados por microrganismos Gram-negativos.

Atualmente, uma das áreas de aplicação dos compostos de amônio quaternário é na usina de açúcar e álcool. A fermentação alcoólica, desde os seus primórdios tem sido acompanhada de contaminantes indesejáveis. Na tentativa de controlar as infecções na fermentação alcoólica, diversas práticas envolvendo o uso de agentes antimicrobianos vêm sendo adotadas.

As fermentações acidentais, paralelas à fermentação alcoólica, podem provocar transtornos no processamento, com perdas substanciais no rendimento alcoólico (AMORIM et al. 1981). As bactérias comumente associadas a fermentações acidentais são *Acetobacter* - fermentação acética (GALLI, 1961), *Lactobacillus* e *Leuconostoc* - fermentação láctica, *Clostridium* - fermentação butírica, *Bacillus* e *Enterobacter* (AMORIM & OLIVEIRA, 1982).

Embora muitos compostos de amônio quaternário venham sendo empregados em operações de limpeza e sanitização, o mecanismo da sua ação antibacteriana ainda não está totalmente esclarecido. Estudos sobre o mecanismo de atividade antibacteriana têm investigado a inibição no processo metabólico.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo físico-químico das interações da forma não associada e micelar do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) nos meios de cultura, o efeito de diferentes concentrações de CTAB em células de bactérias e leveduras, através do estudo de cinética de crescimento; avaliação da interferência nos processos metabólicos: glicólise, respiração e fermentação; análise de atividade enzimática; lise de células e de protoplastos; análise dos padrões de proteínas de membrana e proteínas do citosol de células sensíveis e resistentes ao CTAB, através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e estudo citológico através de microscopia eletrônica.

A pesquisa foi conduzida em concentrações sub-letais de CTAB uma vez que o objetivo maior deste trabalho foi o estudo das reações celulares prévia à destruição.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1. INTRODUÇÃO.

Há uma concordância geral sobre dois marcos importantes na história do desenvolvimento dos germicidas de sais de amônio quaternário. O primeiro representado pelos trabalhos da equipe de JACOBS (1916); JACOBS et al. (1916a); JACOBS et al. (1916b), que examinaram a estrutura, a preparação, e a atividade antimicrobiana, e o segundo pelo trabalho de DOMAGK (1935), que demonstrou a atividade antibacteriana da cadeia longa dos sais de amônio quaternário.

Em 1916, JACOBS e seus colaboradores publicaram dois artigos descrevendo a atividade antimicrobiana desses compostos (JACOBS et al., 1916a; JACOBS et al., 1916b). JACOBS e HEILDELBURG, em 1915, publicaram vários artigos descrevendo a preparação de diferentes séries de sais de amônio quaternário de hexametilenotetramina. A discussão geral da quimioterapia enfatizou o poder bactericida, a especificidade, a compatibilidade com compostos tissulares e a resistência à alteração metabólica do ponto de vista de avaliação dos compostos usados como agentes quimioterápicos potenciais. Os testes de rotina foram realizados com *Salmonella typhosa*, porém, outros microrganismos foram avaliados para demonstrar a variabilidade no poder bactericida dos vários compostos, dependendo do organismo teste utilizado.

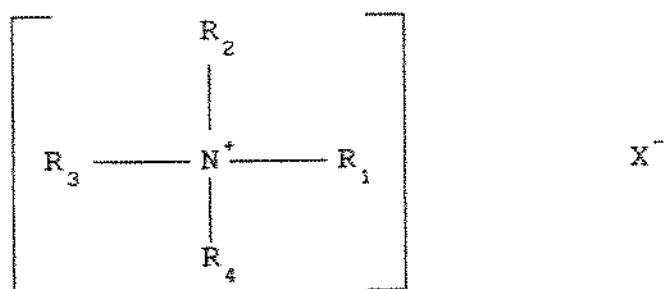
Embora algumas revisões tenham questionado os trabalhos da equipe de JACOBS como os primeiros na investigação dos germicidas constituídos por sais de amônio quaternário, sua proeminência encontra-se assegurada pela qualidade, quantidade e tratamento dado às pesquisas, que incluíram o estudo da

atividade antimicrobiana e a correlação entre estrutura e atividade antimicrobiana.

A importância do trabalho de DOMAGK (1935) é também inquestionável, pois demonstrou o aumento da atividade germicida, quando o resíduo alifático longo é ligado ao átomo de nitrogênio quaternário, estabelecendo a utilidade destes compostos, primeiro na medicina e, mais tarde, em outras aplicações.

2.2. ESTRUTURA QUÍMICA.

Os sais de amônio quaternário são produtos da reação nucleofílica de haletos de alquila com aminas terciárias. Quimicamente, cada molécula possui quatro átomos de carbono unidos ao átomo de nitrogênio através de ligações covalentes. A fórmula estrutural geral para os compostos de amônio quaternário é assim representada:



onde R₁, R₂, R₃ e R₄ são grupos alquila que podem ser iguais ou diferentes, substituídos ou não substituídos, saturados ou insaturados, ramificados ou lineares, cíclicos ou acíclicos, aromáticos ou grupos aromáticos substituídos.

2.3. SAIS DE MONOALQUILTRIMETILAMÔNIO.

Neste caso, um dos R é um grupo alquila de cadeia longa e os demais são radicais metila. Todos os compostos quaternários deste grupo são preparados através da reação entre uma amina terciária e um haleto de alquila (DOMAGK, 1935, SHELTON et al. 1946a). Neste caso a amina terciária pode ser alquildimetilamina de cadeia longa que reage com haleto de metila ou a reação pode ocorrer entre a trimetilamina de cadeia curta que reage com haletos de alquila de cadeia longa.

2.4. ANÁLISE.

A estrutura química dos compostos de amônio quaternário permite uma variedade de procedimentos quantitativos para a determinação de sua concentração: (1) titulação; (2) precipitação de um derivado insolúvel e subsequente determinação do excesso do agente precipitante empregado; e (3) formação de um complexo colorido com o amônio quaternário e subsequente medida da absorbância.

Para soluções que contenham 0,5 % (m/v) ou mais de sal de amônio quaternário, deve-se empregar a titulação direta ou a difásica. A análise depende da formação do complexo amônio quaternário-corante (azul de bromofenol), solúvel em um dos dois solventes empregados (EPTON, 1947; BARR et al., 1948). O titulante é um surfatante aniônico. Quando uma quantidade equivalente desse surfatante e do sal de amônio quaternário estão presentes, o corante do complexo formado é liberado de um dos solventes e passa para o outro. Uma limitação desta técnica é a interferência de haletos inorgânicos e hipocloritos de amônio, normalmente presentes em pequenas quantidades, como sub-produtos na fabricação de compostos de amônio quaternário.

Como alternativa, pode-se utilizar os métodos gravimétricos, um deles consistindo na reação de precipitação do composto sob estudo com o ferrocianeto de potássio e subsequente análise do excesso do reagente por titulação iodométrica (OFFICIAL METHODS AOAC, 1965).

Para soluções que contenham menos de 0,5 % (m/v) de amônio quaternário, pode-se usar métodos colorimétricos, como o de AUERBACH (1944). Freqüentemente, os métodos colorimétricos envolvem a reação do sal de amônio quaternário com um corante ácido, seguida de extração do complexo colorido com um solvente orgânico conveniente, e leitura da absorbância.

2.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

2.5.1. INFLUÊNCIA DA ESTRUTURA.

Estudos sistemáticos sobre a estrutura dos compostos de amônio quaternário e sua ação bactericida têm enfatizado a importância do comprimento da cadeia de carbono na determinação da atividade. Considerando os compostos com a fórmula geral $RN^+(CH_3)_3X^-$ onde R é um grupo alquila, observou-se que, com o aumento da cadeia de C_6 a C_{18} a atividade bactericida aumenta substancialmente, com máximos em C_{16} (HOOGERHEIDE, 1945; SHELTON et al., 1946a), em C_{12} , C_{14} (MILLER & BAKER, 1940 ; LAWRENCE, 1946) e em C_{14} , C_{16} (BAKER et al., 1941a, CELLA et al., 1952).

Conclusões similares sobre a relação entre atividade bacteriana e o comprimento da cadeia foram obtidos em estudos com cloretos de alquil piridinium (KOLLOFF et al., 1942, SHELTON et al., 1946b); cloreto de

alquilfenoxietoxietilenodimetilbenzilamônio (RAWLINS et al., 1943); cloreto de alquilbenzilamônio, brometo de alquildimetiletilamônio, brometo de alquildimetilalilamônio e brometo de alquiltrimetilamônio (VALKO & DUBOIS, 1945).

As propriedades bactericidas dos sais de amônio quaternário parecem independentes da identidade do ânion. SHELTON et al. (1946b) verificaram que os íons cloreto, brometo, iodeto, nitrato, sulfato, metassulfato, acetato, benzoato, cianeto e fluorsilicato de cetiltrimetilamônio não apresentaram diferenças significativas quanto ao poder bactericida.

A substituição de um átomo de H por um de Cl no anel aromático não produz aumento na atividade bactericida (GAULTIER et al., 1970). A substituição de 2 ou 3 átomos de Cl no radical benzila, entretanto, torna o composto mais ativo do que com um ou nenhum átomo de cloro (LAWRENCE et al., 1947).

2.5.2. INFLUÊNCIA DO pH.

Os compostos de amônio quaternário são agentes bactericidas ativos em meios ácidos e alcalinos, com alguma evidência de maior atividade em meio alcalino (MILLER & BAKER, 1940; GERSHELFELD & PERLSTEIN, 1941; GERSHELFELD & MILANICK, 1941; BAKER et al., 1941a; HOOGERHEIDE, 1945; QUISNO & FOTER, 1946; EINSMAN & MAYER, 1947). Porém, mesmo em pH 5,0, os sais contendo cetiltrimetilamônio são ainda germicidas altamente potentes (HOOGERHEIDE 1945).

HUCKER et al. (1948b) estudaram 10 compostos de amônio quaternário e encontraram que alguns são mais efetivos em pH alcalino, e outros, incluindo o CTAB são efetivos tanto em pH ácido como alcalino.

SOIKE et al. (1952), entretanto, observaram que a susceptibilidade de diferentes espécies de microrganismos ao sal de amônio quaternário, varia com o pH.

SALTON (1950) verificou que o pH mais efetivo para a destruição de *Staphylococcus aureus* foi de 8,1 e para *Pseudomonas fluorescens*, de 5,3.

2.5.3. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA.

Os resultados obtidos nos estudos da influência da temperatura na atividade de sais de cetiltrimetilamônio, realizados a 20°C e 37°C, não apresentaram diferenças significativas (HOOGHEIDE, 1945). Entretanto QUISNO & FOTER (1946); SHERE (1948); BUTTERFIELD et al. (1950) evidenciaram o efeito positivo da elevação da temperatura sobre a atividade antimicrobiana.

TWOMEY (1966) verificou a presença de coliformes no leite, quando foi utilizado compostos de amônio quaternário a 130°F na sanitização dos equipamentos, o que não ocorreu quando se utilizou 190°F.

2.5.4. INFLUÊNCIA DE CÁTIONS.

A redução da atividade germicida pela água dura tem sido descrita por inúmeros pesquisadores (ARMBRUSTER & RIDENOUR, 1949; PROUTY, 1949; DORKOVITZ & CROCKER, 1950; MUELLER & SEELEY, 1951; CHAMBERS et al., 1955). Em geral, parece que a interferência é resultado de muitos fatores inter-relacionados de modo complexo (MEGGISON & MUELLER, 1956; KLIMEX & BAILEY, 1956).

KRAVITZ & STEDMANS (1957) verificaram, entretanto, que a água dura não afeta sensivelmente a atividade dos compostos de amônio quaternário, quando utilizados em concentrações que asseguram a desinfecção. Os cátions metálicos interferem na atividade dos compostos de amônio quaternário competindo pelos sítios negativos existentes na superfície celular. Os cátions monovalentes, divalentes e trivalentes apresentam interferência na razão de 1:100:1.000 (MUELLER & SEELEY, 1951).

2.5.5. INFLUÊNCIA DE MATÉRIA ORGÂNICA.

Alguns trabalhos descritos na literatura demonstraram que substâncias como o leite, soro e amido (Van ESELTINE & HUCKER, 1948), proteínas e fosfolipídeos (BAKER et al., 1941; SOTIER, 1951) e ágar (QUISNO et al., 1946) causaram inibição da atividade dos compostos de amônio quaternário.

CURRY & BARBER (1952) verificaram que 10 ppm de um sal de amônio quaternário foi efetivo na destruição de culturas lácticas em solução aquosa, em 10 minutos. Entretanto, quando as culturas estavam em leite, esta concentração alterou a produção de ácido mas não foi efetivo para evitar o crescimento.

A presença de matéria orgânica causa um aumento no tempo requerido para a destruição de células de microrganismos, mas este efeito pode ser suprimido com o aumento na temperatura (KLIMEX & BAILEY, 1956).

Conseqüentemente, o CTAB é um potente bactericida, mesmo na presença de matéria orgânica (DAVIES, 1949; FERLAZZO et al., 1959).

2.5.6. SUSCEPTIBILIDADE DE DIFERENTES MICRORGANISMOS.

2.5.6.1. Bactérias.

Em alguns estudos, os compostos de amônio quaternário apresentaram igual eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DUNN, 1936; BAKER et al. 1941a; HOOGERHEIDE, 1945; LAWRENCE, 1946; GLASMAN, 1948).

Entretanto, diversos autores demonstraram que tais compostos apresentam maior atividade contra Gram-positivos do que contra Gram-negativos (HAUSER & CUTTER, 1944; QUISNO & FOTER, 1946; SALTON, 1950; JERCHEL & HOFFMEISTER, 1958; HUECK et al., 1966; PICARD et al., 1971; BLOIS & SWARBRICK, 1972a; BLOIS & SWARBRICK, 1972b).

FREEDLANDER (1940) relatou completa inibição do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* em diluição 1:80.000 e parcial retardamento em 1:400.000. VENTURI (1954) verificou que os detergentes catiônicos de amônio quaternário têm ação bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis* em meio de cultura.

HIRSCH (1954), entretanto, relatou que o bacilo da tuberculose é resistente ao cloreto de benzalcônio, enquanto muitas micobactérias saprófitas são sensíveis.

2.5.6.2. Vírus.

Os sais de amônio quaternário são efetivos contra bacteriófagos de *Streptococcus* lácticos utilizados como culturas "starters" (FRONTY, 1949; BENNETT & NELSON, 1954; WATKINS et al., 1957).

A adição de agentes quelantes como etilenodiamino tetracetato e tetrassódio pirofosfato aumentou sensivelmente a atividade dos compostos de amônio quaternário sobre os bacteriófagos de *Streptococcus cremoris* (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) (WATKINS & ELLIKER, 1960).

Os compostos de amônio quaternário mostraram atividade contra os vírus importantes em animais (SIDWELL et al., 1967; KIRCHHOFF, 1968; KIRCHHOFF, 1970; DORSON & MICHEL, 1987) e também contra vírus fitopatogênicos (BOCKHOTT et al., 1989).

STOLS & VELDSTRA (1965) verificaram que a cápsula do vírus, livre de ácido nucleico, é estável nas condições de inativação dos vírus, e sugeriram que os íons de amônio quaternário causam mudanças conformacionais no ácido nucleico dentro da partícula do vírus, resultando na sua degradação.

TSO et al. (1989) verificaram que a inativação dos vírus com sais de amônio quaternário é causada pela ruptura do envelope viral, com subsequente liberação do nucleocapsídeo. Não houve evidência de que o nucleocapsídeo tenha sido posteriormente degradado.

2.5.6.3. Esporos bacterianos.

HUCKER et al. (1948a) relataram que a concentração de sais de amônio quaternário necessária para a destruição de esporos de *Bacillus subtilis* é 5 vezes maior do que a necessária para a destruição das células vegetativas.

KLORMANN & WRIGHT (1950) verificaram que os compostos de amônio quaternário não são capazes de destruir esporos de *Clostridium welchii* (*perfringens*), *Clostridium tetani* e *Clostridium sporogenes*.

Segundo os estudos de CUPKOVA et al. (1981) os compostos de amônio quaternário ligam-se aos esporos de *Bacillus cereus* e diminuem sua termo-resistência . O fenômeno é associado à rápida liberação de ácido dipicolínico.

2.5.6.4. Fungos.

A atividade fungicida do alquildimetilbenzilamônio foi apresentada pela primeira vez por DUNN (1938). Os compostos de amônio quaternário apresentaram inibição no crescimento de linhagens patogênicas de *Candida albicans* (KUTSCHER et al., 1954; KUTSCHER et al., 1956; AMATO et al., 1968). WHITE (1953) demonstrou que o CTAB tem alta toxicidade contra *Saccharomyces* spp..

2.6. APLICAÇÃO.

Após a publicação do trabalho de DOMAGK em 1935, um grande número de aplicações para os compostos de amônio quaternário foi desenvolvido. Inicialmente, foram utilizados como coadjuvantes em cirurgias, em tratamentos pré-cirúrgicos da pele dos pacientes e das mãos da equipe cirúrgica e para a desinfecção de instrumentos cirúrgicos (SWAN 1949). HAGAN et al. (1946) compararam a atividade do cloreto de cetil piridinium e cloreto de alquildimetilbenzilamônio aos cloretos mercuriais, na preparação do campo cirúrgico e verificaram a superioridade dos compostos quaternários.

MILLER et al. (1943), entretanto, apresentaram evidências de que tais substâncias, aplicadas à pele, formam uma camada residual abaixo da qual as bactérias sobrevivem. RAHN (1946) propôs a teoria de que o filme do composto de amônio quaternário em superfícies organofílicas seria formado através da orientação do terminal não tóxico em direção à pele e o terminal ativo em direção ao exterior, o que explicaria os resultados obtidos nos estudos dos compostos de amônio quaternários.

BLANK & COOLIDGE (1950) rejeitaram a teoria do filme e propuseram uma outra explicação, segundo a qual o tratamento com tais substâncias alterava a carga da pele para positiva, atraindo e fixando as células bacterianas, carregadas negativamente. Os autores argumentaram, ainda, que os fosfolípídeos presentes na superfície da pele inibiriam a atividade antimicrobiana do composto de amônio quaternário.

O uso generalizado destes compostos na desinfecção de superfícies, paredes, pisos de hospitais e lugares públicos requereram o desenvolvimento de um detergente compatível com os mesmos e que permitisse a combinação das duas operações, isto é, limpeza e desinfecção (RAHN & ESELTINE, 1947; GUITERAS & SHAPIRO, 1946; KUDSIN & WALTER, 1961).

O tratamento de superfícies que estão em contato com alimentos, equipamentos em indústrias de alimentos e utensílios, com intuito de obter condições sanitárias que previnam a transmissão de doenças através dos alimentos é definido como sanitização de tais superfícies. Praticamente a sanitização requer que nenhum resíduo seja nocivo; não requer a destruição de todas as bactérias presentes na superfície tratada. A utilização de sais de amônio quaternário na sanitização de superfícies foi sugerido por KROG & MARSHALL (1940).

2.7. TOXIDEZ.

O conhecimento das propriedades toxicológicas dos compostos de amônio quaternário é importante para que a segurança, a saúde e o bem estar do homem não sejam comprometidos pelo contato com estes produtos quando são fabricados, transportados ou utilizados. Pelo menos três tipos de respostas toxicológicas estão associados aos amônios quaternários: ação curare, uma paralisia muscular sem envolvimento do sistema nervoso central ou coração; ação muscarínica, um estímulo do músculo liso, e ação nicotínica e bloqueio de gânglios, um estímulo primário transiente e secundário persistente, depressão ganglionar simpática e parassimpática (CUCCI, 1940).

A LD₅₀ é o parâmetro mais freqüentemente utilizado para caracterizar toxidez e esta é dependente da rota de administração. NELSON & LYSTER (1946) descreveram LD₅₀ em ratos para cloreto de miristil picolínico de 250 mg/Kg por administração oral, 200 mg/Kg por injeção sub-cutânea, 75 mg/Kg por injeção intra-peritonal e 30 mg/Kg por injeção intravenosa.

A mais importante consideração toxicológica relacionada com a aplicação de sais de amônio quaternários em superfícies de contato com alimentos, é a determinação dos efeitos cumulativos da ingestão de resíduos desses compostos nos alimentos. NELSON & LYSTER (1946) determinaram que o cloreto de miristil picolínico a 0,1% (m/v) na dieta de ratos não interferiu no seu crescimento normal, mas produziram a morte quando administrada como única fonte de fluído.

A preocupação da "Food and Drug Administration" sobre o perigo da contaminação dos alimentos, especialmente de leite, com resíduos de sanitizantes quaternários levou a especificações para estes produtos, determinando uma lavagem com água potável, após a sanitização empregando composto de amônio quaternário.

Em investigação cuidadosa efetuada pela FDA a partir de estudos fornecidos pelos fabricantes de compostos de amônio quaternário, concluiu-se que os regulamentos de aditivos em alimentos devem ser modificados para permitir o uso seguro de soluções de sanitizantes em equipamentos, utensílios e superfícies de contato com alimentos. Caso as soluções não excedam 200 ppm de composto de amônio quaternário contendo igual quantidade de cloreto de n-alquil (C_{12} - C_{18}) benzildimetilamônio e cloreto de n-alquil (C_{12} - C_{14}) dimetiletilbenzilamônio (tendo um peso molecular em torno de 384), o uso seguro não requer a lavagem das superfícies e equipamentos com água potável, após a aplicação dos compostos de amônio quaternário (Federal Register, 1969).

A informação toxicológica é apresentada como se segue: compostos germicidas contendo sais de amônio quaternário em soluções com concentração de 10% (m/v) ou mais, são tóxicos, se administrados internamente e provocam irritação severa em contato com a pele e mucosas. Com precauções normais, a probabilidade de tal contato é extremamente remota e as diluições efetivas usadas encontram-se em concentrações muito abaixo da mencionada. Em soluções diluídas até 100 ppm, apenas distorções nos procedimentos de operação oferecerão problemas de toxicidade aguda. Finalmente, a toxicidade crônica, como efeito cumulativo em alimentos contaminados com estas substâncias via resíduos de soluções usadas em equipamentos de processamento de alimentos não constitui um problema (PETROCCI, 1983).

2.8. MECANISMO DE AÇÃO.

2.8.1. INTERAÇÃO PRIMÁRIA.

2.8.1.1. Adsorção.

Talvez o primeiro da série de processos envolvidos na interação do agente com a bactéria seja a adsorção ou combinação reversível dos íons destes compostos com a célula bacteriana (SALTON, 1951). Estas evidências foram obtidas por analogia com a habilidade da bactéria em adsorver íons hidrogênio e outros cátions em solução (McCALLA, 1940; McCALLA, 1941).

As células bacterianas apresentam alta afinidade pelo brometo de cetiltrimetilamônio. *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* (*Enterococcus*), *Bacillus pumilus* e *Salmonella pullorum* apresentaram variações quanto à adsorção do agente, porém, no nível de saturação, observou-se que a quantidade correspondia a uma monocamada de detergente. Entretanto, para *S. aureus* esta camada ocupou uma área de 15 vezes a superfície celular (SALTON, 1951).

A ação inibitória dos agentes catiônicos sobre as bactérias pode ser retardada pelo tratamento prévio destas com agentes surfactantes aniônicos (DUBOIS & DIBBLEE, 1947). Há também relatos sobre uma ação protetora para a bactéria, pela presença de compostos de baixo poder bactericida, junto com compostos catiônicos efetivos. Provavelmente este efeito protetor opera através de uma mudança no equilíbrio de adsorção do cátion tóxico, através da competição pelos sítios reativos (VALKO & DUBOIS, 1944).

Outros trabalhos, entretanto, têm divergido destas observações. KLEIN & KARDON, 1947 verificaram que os compostos aniônicos, adicionados após exposição da bactéria aos compostos catiônicos, mostraram-se incapazes de reverter o efeito bactericida.

2.8.1.2. Mudanças na mobilidade eletroforética

As células bacterianas são normalmente carregadas negativamente quando suspensas em água e, ao aplicar-se uma diferença de potencial, as células migram para o eletrodo positivo.

Utilizando 10 diferentes organismos, DYAR & ORDAL (1946) verificaram que, com o aumento da concentração de cloreto de cetil piridínio, a mobilidade das células em direção ao cátodo diminuía gradualmente, até chegar a zero e, eventualmente, a carga aparentemente era revertida e as células moviam-se para o ânodo. A concentração da droga capaz de produzir este padrão, variou de espécie para espécie.

McQUILLEN (1950), utilizando CTAB, confirmou os resultados de DYAR & ORDAL (1946) com *Escherichia coli*. Entretanto, com as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, encontrou-se uma diferença no comportamento; após um ligeiro decréscimo na mobilidade, houve um aumento abrupto da mesma em concentrações entre 50-100 μ M de CTAB, seguido de decréscimo progressivo. DYAR & ORDAL (1946) não verificaram diferenças no comportamento entre Gram-positivas e Gram-negativas.

2.8.2. INTERAÇÃO SECUNDARIA.

É pouco provável que apenas a adsorção das drogas antibacterianas nas células seja um evento fatal. Após a adsorção, entretanto, processos secundários podem ocorrer, e estes contribuem para maior ou menor extensão da inibição dos processos metabólicos e reprodutivos da célula e até para uma rápida perda de viabilidade (HUGO, 1967).

2.8.2.1. Modificação na permeabilidade celular e liberação de constituintes celulares

Em 1940, KUHN & BIELIG sugeriram que os compostos de amônio quaternário provavelmente agiriam na membrana celular, um conjugado lipoproteico, posto que, tais substâncias têm habilidade de dissociar proteínas conjugadas.

BAKER et al. (1941b) reconheceram, como possível mecanismo da atividade antibacteriana dos agentes surfactantes, a capacidade de precipitar proteínas e no caso de proteínas conjugadas, causar a dissociação.

HOTCHKISS (1944); HOTCHKISS (1946) obteve provas a nível bioquímico, que de fato ocorriam danos na membrana, através da demonstração de que compostos contendo fósforo e nitrogênio eram liberados das células de *Straphylococcus aureus* tratadas com compostos de amônio quaternário.

A confirmação deste mecanismo foi encontrada em estudos de liberação dos aminoácidos glicina e ácido glutâmico das células bacterianas (GALE & TAYLOR, 1946), e liberação de lisina em quantidade proporcional à concentração de CTAB, até um nível suficiente para a liberação total do aminoácido, e esta ação era acompanhada de alteração na estrutura superficial da célula (MITCHEL & CROWE, 1947).

Segundo GALE & TAYLOR (1946) a ação lítica dos antibacterianos estudados, incluindo o CTAB, era suficiente para explicar sua ação bactericida.

Promovendo o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* em meio contendo fósforo radioativo (P^{32}), SALTON (1950) verificou um aumento na liberação de P^{32} no meio quando o brometo de cetiltrimetilamônio estava presente.

A liberação de purinas e pirimidinas de células *Staphylococcus aureus* tratadas com CTAB foram relatadas por SALTON & ALEXANDER (1950) e SALTON (1951).

SLADE (1957) estudou o efeito de surfatante catiônico em *Streptococcus pyogenes* e verificou alteração na permeabilidade da membrana celular, caracterizada pela liberação de lisina, ácido glutâmico e ácidos nucleicos, porém, sem alteração aparente na parede celular.

GILBY & FEW (1960) propuseram a teoria de que a carga positiva do sal de amônio quaternário se associa ao grupo fosfato dos fosfolipídeos, enquanto a porção não polar do detergente penetra no interior hidrofóbico da membrana. A distorção causada na membrana aumenta a sua permeabilidade, expondo o protoplasto à lise osmótica. É possível que haja uma correspondência entre a morte e a liberação de solutos; logo, a ruptura da membrana pode, seguramente, ser tomada como evento letal (SALTON, 1968, TOMLINSON et al., 1977).

Os sais de amônio quaternário, em concentrações ótimas ou abaixo destas, causam lise em células de *S. aureus*; acima destas concentrações, entretanto, não acarretam lise. Estes resultados mostram que as altas concentrações fixam as células, desnaturando as enzimas responsáveis pela autólise. Acredita-se que as baixas concentrações promovam a liberação dos complexos de lipoproteínas e que as enzimas autolíticas tornam-se livres para atuar (DAWSON et al., 1953).

2.8.2.2. Coagulação irreversível dos constituintes citoplasmáticos

A coagulação dos constituintes citoplasmáticos, uma lesão drástica, é normalmente verificada em concentrações muito maiores do que aquelas que causam lise ou liberação de solutos. Os componentes citoplasmáticos mais prováveis de serem coagulados ou desnaturados são as proteínas e os ácidos nucleicos (HUGO, 1967)

Exemplos de estudos desse efeito, realizados através de microscopia eletrônica em células intactas tratadas com compostos de amônio quaternário incluem os trabalhos de DYAR, (1947); MITCHEL & CROWE, (1947); SALTON et al., (1951); DAWSON et al., (1953); WASHAN et al., (1976).

Uma técnica interessante para o estudo da coagulação protoplásmica está baseada na formação de protoplasto. Certas bactérias podem ser desprovidas da parede celular, e se isto ocorrer em um meio onde há balanço da pressão osmótica, um protoplasto esférico é formado. Se a célula original for um bastonete, ocorre uma mudança na forma, de cilindro para esfera. Se a mesma operação for realizada com células anteriormente tratadas com um agente que coagula ou fixa o protoplasma, como os compostos de amônio quaternário, observa-se que, ao dissolver a parede celular, é produzido um protoplasto em forma de cilindro, sem alterações na forma original da célula. Se a coagulação for severa, em subsequente diluição, não ocorre lise, devido à explosão osmótica (TOMCSICK, 1955; HUGO & LONGWORTH, 1964).

RICHARDS & CAVIL 1976 relataram que o cloreto de benzalcônio provocava esse efeito: extraíndo-se a membrana externa das células de *Pseudomonas aeruginosa*, as células mantinham a forma após a retirada da membrana, permanecendo a camada de peptídeoglicano intacta.

2.8.2.3. Efeitos gerais no metabolismo

Estudos sistemáticos sobre o mecanismo de ação dos compostos de amônio quaternário foram realizados por MILLER et al., 1939; MILLER & BAKER, 1940; BAKER et al., 1941a; BAKER et al., 1941b, em células de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella paratyphi*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas aeruginosa* (pyocynea), *Aerobacter aerogenes*, *Shigella dysenteriae* e *Lactobacillus* sp., concluindo que os compostos de amônio quaternário são inibidores efetivos da respiração, em concentrações de 333 µg/ml, e que os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos são igualmente afetados. A depressão no metabolismo e a morte celular são eventos que ocorrem paralelamente.

ORDAL & BORG (1942) estudaram o efeito do cloreto de cetil piridinium na oxidação do lactato em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e verificaram que o sistema lactato-azul de metileno em *S. aureus* é mais susceptível do que em *E. coli*.

SEVAG & ROSS (1944) estudaram o efeito de Zephiran (cloreto de alquildimetilbenzilamônio) em certos sistemas enzimáticos de levedura. As bandas de absorção do citocromo C mostraram menor intensidade, quando tratadas com 1.000 µg/ml do composto.

Existe uma alta correlação entre morte celular e inibição da oxidação da glicose em *Escherichia coli*, causada por 5 diferentes compostos de amônio quaternário (KNOX et al., 1949).

HUGO (1952) concluiu que o CTAB inibe o consumo de oxigênio em *E. coli* e correlacionou este efeito com perda de viabilidade das células.

Segundo ARMSTRONG (1957) a reação tóxica inicial de diferentes compostos catiônicos em leveduras, é a desorganização da membrana celular, seguida da inativação de enzimas celulares. Em baixas concentrações, como $0,1 \times 10^{-3}M$ de sal de amônio quaternário, entretanto, há um pequeno aumento na produção de ácidos.

SCHARFF & BECK (1959) fizeram uma investigação detalhada desse efeito estimulante causado por pequenas doses de cloreto de benzalcônio nas reações metabólicas de leveduras e verificaram que o metabolismo da glicose, em condições anaeróbicas, sofre progressiva inibição, qualquer que seja a concentração da droga. Em presença de ar, o consumo de O_2 e a produção de CO_2 são estimulados em 33 e 50%, respectivamente, na presença de 3,5 $\mu g/ml$ de massa seca de levedura. Deduziu-se que o efeito Pasteur também foi inibido.

Esse trabalho foi estendido por SCHARFF & MAUPIN (1960), que distinguiram dois níveis de atividade do cloreto de benzalcônio, dependendo da concentração. No primeiro, a zona pré-lítica, observou-se consumo de O_2 aumentado, efeito Pasteur inibido, permeabilidade da membrana não afetada e fermentação não apreciavelmente afetada. Na segunda zona observou-se permeabilidade afetada demonstrada pela perda de íons potássio, e fermentação inibida. A inibição da fermentação pode dar-se devido à perda de cofatores essenciais ou à interferência com o transporte da glicose para o interior da célula, e não à uma ação direta do cloreto de benzalcônio sobre as enzimas.

A pré-disposição para a rota fermentativa aeróbica foi causada pela alta concentração inicial de glicose no meio. Com 11 mM de glicose, a fermentação aeróbica é desprezível, mas encontra seu máximo com um aumento de 100 vezes na concentração de glicose. O mesmo resultado pode ser obtido por adição de excesso de composto de dois carbonos (acetato e acetaldeído) e também por adição de cloreto de benzalcônio, em baixa concentração pré-lítica. O cloreto de benzalcônio bloqueia a

oxidação do acetato no ciclo de Krebs, e causa acúmulo de acetato, produzindo o mesmo efeito observado quando se adiciona excesso de compostos de dois carbonos (BIHLER et al., 1961).

2.9. RESISTÊNCIA AO CTAB.

O estudo da resistência das bactérias aos sais de amônio quaternário é importante, uma vez que soluções desses sais, contaminadas, têm sido fonte de casos de bacteremia por *Pseudomonas* (LOWBURY, 1951, KEOWN et al., 1957; PLOTKIN & AUSTRIAN, 1958, MALEZIA et al., 1960; LEE & FIALKOW, 1961, ADAIR et al., 1969; HARDY et al., 1970; ADAIR et al., 1971; PHILLIPS et al., 1971; DIXON et al., 1976, FRANK e SCHAFFNER, 1976).

Em 1988, RUSSEL & GOULD apresentaram uma revisão sobre os dois possíveis mecanismos de resistência bacteriana. O primeiro é a resistência adquirida e o segundo é a resistência intrínseca. Como resistência adquirida TOWNSEND et al. (1984); TENNENT et al. (1985); EMSLIE et al. (1986) relataram a resistência aos sais de amônio quaternário mediada por plasmídeo em *Staphylococcus aureus*. Em bacilos Gram-negativos, entretanto, tal resistência não foi encontrada. Resistência aos compostos químicos hidrofóbicos e hidrofílicos é um exemplo de resistência intrínseca (NIKAIDO, 1976; NIKAIDO & NAKAE, 1979; NIKAIDO & VAARA, 1985; OSBORNE & WU, 1980).

Certas espécies de bactérias Gram-negativas adquirem tolerância aos compostos de amônio quaternário em transferências seriadas com aumento progressivo da concentração (CROCKER, 1951; CHAPLIN, 1951; MacGREGOR & ELLIKER, 1958; SOPREY & MAXCY, 1968).

ADAIR et al. (1971) verificaram que *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao cloreto de benzalcônio era, também, resistente a outros sais de amônio quaternário sendo, porém,

mais sensível à polimixina B, sulfato de colistina e EDTA.

As células de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos compostos de amônio quaternário produzem, durante o seu crescimento, alta quantidade de acetato de etila e valerato de etila, perdem a habilidade de sintetizar lipases e proteases extracelulares e são mais resistentes à ruptura osmótica (WASHAN et al., 1976a). São, também, mais sensíveis ao pH, não crescendo em pH 5,0, enquanto as sensíveis crescem em pH 4,5 (WASHAN et al., 1976b). As células resistentes são 30% menores do que as sensíveis e são imóveis devido à perda de flagelo. As células resistentes apresentam corpos elétricos-densos de 0,05 a 0,2 μ m de diâmetro.

As células de *Escherichia coli* tolerante aos sais de amônio quaternário são mais resistentes à ruptura com tratamento sônico (MAXCY et al., 1971).

2.9.1. LIPÍDEOS E RESISTÊNCIA.

A primeira sugestão de que os lipídeos bacterianos poderiam ter significância na determinação da resistência das bactérias aos compostos de amônio quaternário foi provida por DYAR & ORDAL (1946).

ANDERES et al. (1971), posteriormente, verificaram que as células resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, crescendo na presença de sal de amônio quaternário, apresentaram 77% mais lipídeos totais do que as células sensíveis. Na ausência do sal, mantiveram a resistência e apresentaram 27% mais lipídeos que as células sensíveis.

O conteúdo de lipoproteína na superfície celular de *Serratia marcescens* é significativamente maior em células resistentes ao amônio quaternário (CHAPLIN, 1952) e o conteúdo

de lipídeos em *Enterobacter cloacae* é maior nas células resistentes ao cloreto de benzalcônio (NISHIKAWA et al., 1979).

As células resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram maior quantidade de fosfolipídeo e lipídeos neutros na parede celular, em comparação com as células susceptíveis. A permeabilidade é reduzida devido ao aumento de ácidos graxos (SAKAGAMI et al., 1989).

2.10. MEMBRANA CELULAR.

As bactérias apresentam uma notável habilidade para alterar o seu metabolismo, em resposta à mudanças nas condições ambientais. A primeira estrutura através da qual esta alteração ocorre é o invólucro celular (WILLIAMS, 1988).

O invólucro celular de bactérias Gram-negativas é uma estrutura complexa, que consiste em 2 membranas, separadas por uma camada de peptídeoglicano, e um compartimento chamado periplasma. O periplasma forma um micro-ambiente entre a membrana citoplasmática e o meio externo; segundo HOBOT et al. (1984) o peptídeoglicano ocupa o periplasma na forma de gel.

Sobreposta à camada de peptídeoglicano encontra-se a membrana externa, uma bicamada composta de fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (LPS). A distribuição dos fosfolipídeos é incomum, ocupando a face interna, enquanto os LPS ocupam a face externa. Os LPS encontram-se ancorados na membrana através de ligações com as proteínas que têm um papel essencial na manutenção da membrana externa, como barreira permeável (HANCOCK, 1984; NIKAIDO & VAARA, 1985). Há um grande número de proteínas na membrana externa, envolvidas no transporte de solutos através desta barreira. Um grupo especial de proteínas são as porinas. Aproximadamente metade da massa da membrana externa é composta de proteínas (OSBORN et al., 1972).

A membrana externa de bactérias entéricas e algumas outras Gram-negativas atua como forte barreira de permeabilidade para muitos antibióticos (novobiocina, rifamicina, lincomicina, clindamicina), que são efetivos contra outras bactérias (NIKAIDO & NAKAE, 1979).

A membrana citoplasmática é considerada como a maior barreira das células para moléculas hidrofílicas ou ionizadas, mas é fato geralmente aceito que moléculas moderadamente hidrofóbicas podem penetrar e atravessar a bicamada de lipídeos, à temperatura de crescimento.

A maioria dos estudos sobre membranas de bactérias, incluindo função, organização, e caracterização (SCHNAITMAN, 1970a; DIRIENZO et al., 1978; BRAUN & HANTKE, 1974; OSBORN & WU, 1980; HANCOCK, 1984), têm sido realizados com espécies da família Enterobacteriaceae, principalmente *Escherichia coli* (MIURA & MIZUSHIMA, 1969; NIKAIDO, 1976; ZIMMERMANN & ROSSELET, 1977; HARDAWAY & BULLER, 1979; GMEINER et al., 1980; NAKAE & ISHII, 1980; NIKAIDO & ROSEMBERG, 1981; NIKAIDO & ROSEMBERG, 1983; MARVIN et al., 1989), *Salmonella typhimurium* (OSBORN et al., 1972; NAKAE & NIKAIDO, 1975; KAMIO & NIKAIDO, 1977) e *Proteus mirabilis* (HASIN et al., 1975).

Outra bactéria que tem recebido muita atenção é *Pseudomonas aeruginosa* (MIZUNO & KAGEYAMA, 1978; HANCOCK et al., 1979; NICAS & HANCOCK, 1980; HANCOCK et al., 1982; NICAS & HANCOCK, 1983a; NICAS & HANCOCK, 1983b; YOSHIMURA & NIKAIDO, 1982; ANGUS et al., 1982; YOSHIMURA et al., 1983).

Grande parte das técnicas descritas na literatura para a obtenção de proteínas de membranas de bactérias Gram-negativas baseiam-se nos trabalhos de SCHNAITMAN (1970a); SCHNAITMAN (1970b); SCHNAITMAN (1971a); SCHNAITMAN (1971b). Tais técnicas empregam em geral a ruptura das células com lisozima-prensa francesa ou lisozima-ultrassom e solubilização de proteínas com detergente Triton X-100. A eletroforese de

proteínas em gel de poliacrilamida foi descrita originalmente por LAEMMLI (1970).

2.11. SURFATANTES E MICELAS.

2.11.1. TAMANHO E FORMA DAS MICELAS.

Os surfatantes, em solução, podem formar, dependendo da concentração, agregados micelares que vêm sendo investigados há sete décadas. Entretanto, somente agora têm sido melhor compreendidos (FROMHERZ, 1980; DILL & FLORY, 1981). As micelas iônicas possuem cerca de 50 a 200 moléculas de surfatantes que, em solução aquosa, organizam-se em uma estrutura onde as cadeias hidrofóbicas estão voltadas para o núcleo do agregado. A parte hidrofílica, portanto, se dirige para a superfície, formando a camada de Stern, na qual cerca de 10 a 30% dos grupos estão ionizados, com os contra-íons remanescentes formando a dupla camada elétrica de Gouy-Chapman (Figura 1). O diâmetro do núcleo varia de 10 a 30 Angstrons, sendo que a camada de Stern tem alguns Angstrons de espessura enquanto que a camada de Gouy-Chapman pode atingir até algumas centenas de Angstrons (FENDLER, 1982).

Historicamente, o primeiro modelo de micelas foi proposto por McBAIN em 1914, sendo conhecido como o modelo lamelar, onde as moléculas de surfatante estariam dispostas lado a lado e, também extremidade a extremidade, formando uma folha (MENGINE, 1979). HARTLEY (1935), HARTLEY (1948) propôs o modelo clássico, como sendo a micela constituída por um núcleo apolar, envolvido por uma camada de íons. Tal modelo falha na explicação de diversas observações tais como a questão da penetração de água nas micelas e a presença de moléculas pouco polares localizadas na superfície polar.

MENGER (1979) propôs um modelo constituído de estruturas moleculares, a partir de um centro de simetria. Os espaços vazios são reduzidos a um mínimo, sendo admitidas dobras nas cadeias de hidrocarbonetos. Assim há um equilíbrio dinâmico, de partes da cadeia apolar na superfície, coexistindo com íons e moléculas de água. Este modelo, entretanto, superestima a penetração de água no interior da micela.

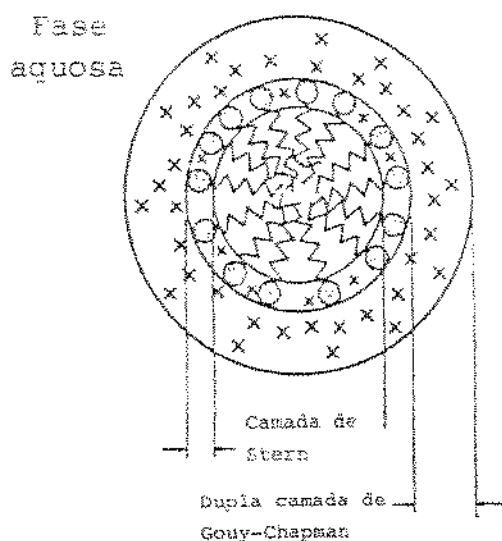


Fig. 1. Modelo de micela, extraído de FENDLER 1975.

De modo geral admite-se que as micelas, em concentrações não muito acima da concentração micelar crítica (c.m.c.), são aproximadamente esféricas ou elipsoidais. Porém, com o aumento da concentração de surfactante, elas passam a se alongar, adquirindo geometria cilíndrica ou lamelar. Aumentando mais a concentração há a formação das chamadas fases de cristal líquido. Em soluções aquosas concentradas de CTAB, as micelas esféricas e cilíndricas coexistem, sendo que o contra-íon predomina em torno das micelas cilíndricas (ALMGREN et al., 1979).

As micelas como as mostradas na Figura 1 são ditas normais. Existem também as micelas reversas, formadas em solventes apolares nas quais, os grupos polares estão voltados para o núcleo, microregião hidratada, e a parte hidrofóbica para a superfície.

As micelas fornecem microambientes que diferem substancialmente do ambiente da fase aquosa, possuindo polaridades e viscosidades efetivas que variam de acordo com a região do agregado. As micelas em soluções aquosas apresentam microviscosidades entre 15 e 30 cP sendo, portanto, mais altas que a viscosidades de solventes orgânicos ou da água (1 a 2 cP), porém muito menores que a de bicamadas de vesículas lipídicas (200 cP) (KALYANASUNDARAM, 1978; TURRO et al., 1980). Algumas observações evidenciam a existência de um gradiente de viscosidade em direção ao núcleo micelar, com os grupos metila terminais da molécula de surfactante comportando como se estivessem em solvente apolar (KALYANASUNDARAM & THOMAS, 1976).

A c.m.c. de micelas não iônicas é normalmente 100 vezes menor que a de micelas iônicas, contendo grupos hidrofóbicos comparáveis em tamanho. Diferenças estruturais importantes também ocorrem, em consequência do tamanho do grupo polar e do impedimento estérico. Uma vez que a carga positiva do átomo de nitrogênio quaternário de micelas catiônicas é menos exposta que a carga negativa de micelas aniônicas, a proximidade dos contra-íons ao grupo polar é menor nas micelas catiônicas, e como resultado, sua estrutura é mais compacta. Conseqüentemente, uma micela catiônica é capaz de solubilizar maior quantidade de substrato não polar que a micela aniônica de peso molecular semelhante (FENDLER, 1975).

2.11.2. CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA.

A formação de micelas é, em geral, um processo cooperativo e a concentração micelar crítica (c.m.c.) representa a concentração limitante de moléculas não associadas que podem existir em solução (MYSELS & MUKERJEE, 1979). O valor da c.m.c. depende da hidrofobicidade da cadeia hidrocarbônica, da carga líquida do surfatante, da natureza do contra-íon, do tipo e concentração de eletrólitos adicionados, assim como do solvente. A c.m.c. é também afetada pela temperatura e pressão (FENDLER, 1982).

A concentração micelar crítica (c.m.c.) representa uma estreita faixa de concentrações onde diversas propriedades físico-químicas da solução sofrem alterações sensíveis (FENDLER, 1975)

Existem diversos métodos que podem ser aplicados na determinação da c.m.c., dentre os quais podemos citar: medidas sobre condutividade elétrica, absorção de corantes, solubilização, tensão superficial, índice de refração, espalhamento de luz, etc. O valor da c.m.c. depende consideravelmente do método utilizado para a sua determinação (SHINODA, 1963).

2.11.3. ABSORÇÃO DE CORANTE.

As primeiras observações de HARTLEY (1934) e SHEPPARD & GEDDS (1945) de que a fluorescência de alguns corantes muda dependendo da localização do corante, isto é, se está livre na solução, adsorvido ou absorvido pela micela, foram utilizadas com sucesso por CORRIN & HARKINS (1947) e KOLTHOFF & STRICKS (1948).

O corante é mantido a uma concentração constante (aproximadamente $10^{-5}M$). Na c.m.c. a cor da solução sofre uma mudança marcante, levando a mudanças no espectro de absorção do corante. Com surfactantes catiônicos, alguns dos corantes utilizados são: eosina, eritrosina, fluoresceína e diclorofenol-indofenol (SHINODA, 1963).

A existência do ponto isosbético no espectro de absorção é uma evidência que o corante livre na solução está em equilíbrio com aquele da micela, e que ambos têm a mesma absorbância em um dado comprimento de onda (SHINODA, 1963).

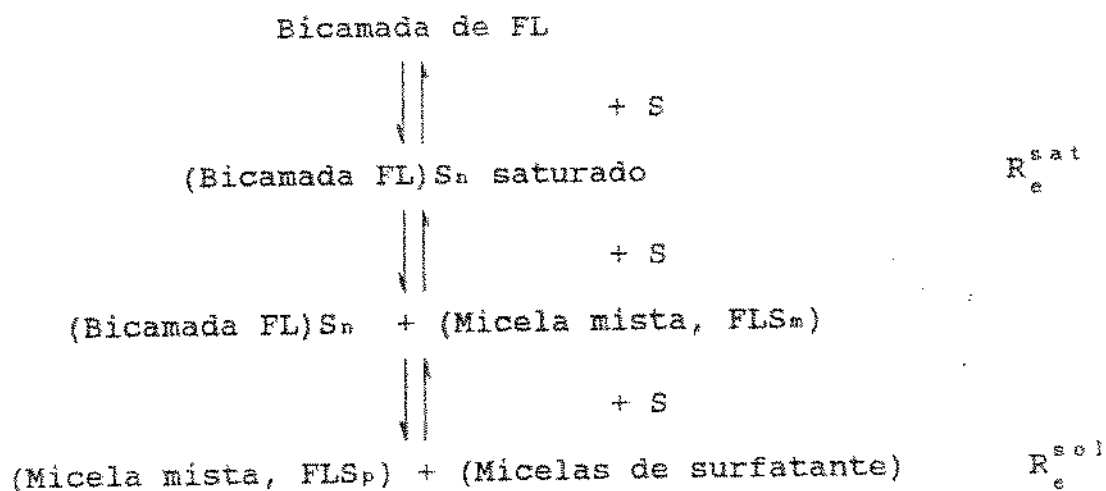
2.11.4. INTERAÇÃO DE SURFATANTES COM BIOMEMBRANAS.

A interação de substâncias anfifílicas solúveis (surfatantes) com moléculas anfifílicas insolúveis (como fosfolípídeos) é complexa. Quando a concentração de surfatante é baixa, suas moléculas estão associadas com a bicamada de fosfolípídeos sem mudanças na estrutura geral desta (DENNIS, 1974; RIBEIRO & DENNIS, 1974).

Há revisões detalhadas disponíveis sobre as propriedades dos surfatantes utilizados na solubilização de membranas (HELENIUS et al., 1979), e interações de surfatantes com proteínas e seu uso na solubilização de membranas (TANFORD & REINOLDS, 1976; HELENIUS & SIMONS, 1975).

Acima de uma determinada concentração, o surfatante pode acarretar um aumento da permeabilidade da membrana (LICHTENBERG, et al., 1979), sem contudo causar qualquer efeito na sua estrutura geral. Aumentando a concentração de surfatante na bicamada acima da concentração crítica de transição lamelar/micelar, micelas mistas são formadas (Figura 2).

Quando um surfatante é adicionado à uma camada de fosfolipídeos em meio aquoso, o surfatante se distribui entre a bicamada e a solução. Estudos realizados com taurocolato, SDS e octil glucosídeo com bicamada de fosfatidil colina sugerem que a concentração de surfatante livre em solução permanece abaixo da c.m.c. do surfatante puro (HELENIUS & SIMONS, 1975; JACKSON et al., 1982).



S_n, S_m, S_p-moléculas de surfatante nos complexos.

R_e^{sat} , R_e^{sol} -vide texto.

Fig. 2. Representação esquemática da sequência de eventos na exposição de fosfolipídeos (FL) a quantidades crescentes de surfatante (S). Extraído de JONES, 1992.

A concentração efetiva de surfatante nas micelas mistas é dada pela seguinte equação (LICHTENBERG et al., 1983; LICHTENBERG, 1985).

$$R_e = \frac{[\text{surfatante}] - [\text{monômeros de surfatante}]}{[\text{fosfolipídeos}]} \quad (1)$$

As micelas mistas começam a se formar apenas depois que a camada de fosfolipídeos torna-se saturada com surfatante. Uma mistura de bicamada saturada de surfatante e micelas mistas saturadas de fosfolipídeos deve coexistir (Figura 3) até suficiente surfatante ser adicionado levando à conversão total da bicamada em micelas mistas (DENNIS, 1974; RIBEIRO & DENNIS, 1974).

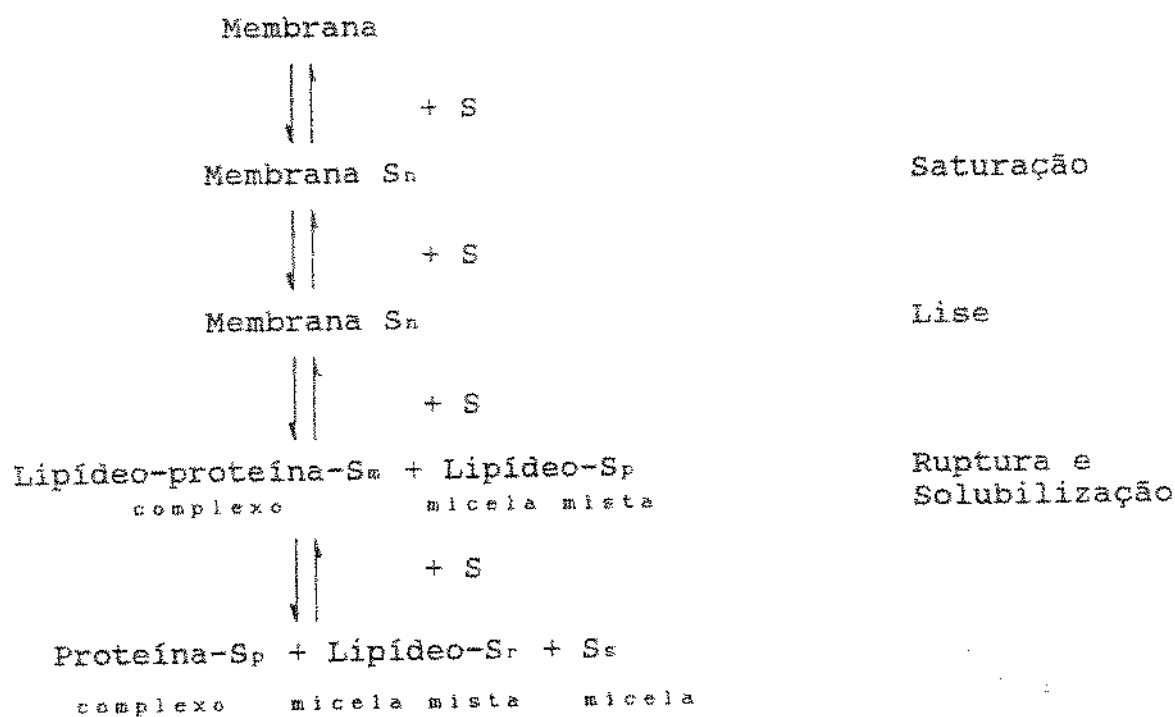
Nesta região, a razão efetiva entre surfatante e fosfolipídeos em estruturas agregadas é definida como R_e^s .

$$R_e^s = \frac{[\text{surfatante}] - [\text{monômeros de surfatante}] - [\text{surfatante em micelas}]}{[\text{fosfolipídeos}] - [\text{fosfolipídeos nas micelas}]} \quad (2)$$

E a razão entre surfatante e fosfolipídeos nas micelas mistas, R_e^m , é definida pela equação:

$$R_e^m = \frac{[\text{surfatante}] - [\text{monômeros de surfatante}] - [\text{surfatante em agregados solubilizáveis}]}{[\text{fosfolipídeos}] - [\text{fosfolipídeos em agregados solubilizáveis}]} \quad (3)$$

O mínimo R_e para completa solubilização, na qual todo lipídeo está nas micelas mistas é referido como R_e^{sol} . O R_e no início do processo crítico de solubilização em que ocorre a transição lamelar/micelar é definido como R_e^{sat} .



S_n , S_m , S_p , S_r , S_p -moléculas de surfatante nos complexos.

Fig. 3. Representação esquemática da seqüência de eventos na exposição de biomembrana à quantidade crescente de surfatante (S). Extraído de JONES, 1992.

Os detalhes da solubilização da membrana variam com a composição desta, mas o estado final, que consiste na solubilização do complexo proteína-surfatante, demonstra que a interação entre surfatante e proteínas é, em geral, mais forte do que o que existe entre proteínas e lipídeos da membrana (JONES, 1992).

O complexo proteína-surfatante atinge a saturação assim que o surfatante livre, em equilíbrio com o complexo, aproxima-se da c.m.c.. Portanto os complexos são mais estáveis do que as micelas, e as proteínas apresentam uma superfície anfipática complementar na qual o surfatante pode se condensar (JONES, 1992).

2.11.5. INTERAÇÃO DE SURFATANTES COM PROTEÍNAS.

Os surfatantes podem interagir com proteínas em pelo menos três modos distintos: 1) associação com sítios específicos nas proteínas, 2) associação cooperativa entre proteína e um grande número de moléculas de surfatante, sem grandes mudanças conformacionais e 3) associação cooperativa com desnaturação da proteína.

Este último ocorre entre o dodecil sulfato de sódio (SDS) e todas as proteínas. Há entretanto, exceções destas generalizações. Algumas proteínas como a glicose oxidase (JONES et al., 1982a), a catalase bacteriana (JONES et al., 1982b), a papaína e a pepsina (NELSON, 1971) são resistentes à desnaturação por SDS, sob certas condições, havendo mesmo casos de ativação de enzimas por surfatantes, como na catalase de *Aspergillus niger* por SDS (JONES et al., 1987). Os surfatantes aniônicos como deoxicolato podem ativar enzimas como fosfolipase de *Bacillus cereus* (EL-SAYED & ROBERTS, 1985)

A interação não cooperativa, isto é, ligação em sítios distintos na proteína nativa não produz mudança detectável na conformação (NOZAKI et al., 1974).

Em todos os casos, a atividade termodinâmica do surfatante é determinada pela concentração das moléculas não associadas, não havendo contribuição de micelas. As micelas e as moléculas de proteínas podem se associar através de interação polar entre a proteína e a superfície da micela. Este tipo de interação, entretanto, não ocorre com surfatantes iônicos que se ligam fortemente à proteína, em concentrações abaixo da c.m.c..

Os modos cooperativos de associação requerem maior concentração de detergente monomérico que aquela necessária para associação com sítios específicos na proteína nativa. A

termodinâmica da formação da micela torna-se então um fator importante, sendo razoável supor que todos os surfatantes são capazes de associar-se cooperativamente com as proteínas. Os surfactantes com baixa c.m.c., entretanto, não têm concentração suficientemente alta de monômeros para que ocorra esse tipo de associação (MAKINO et al., 1973).

Há poucos estudos de associação de surfatantes catiônicos com proteínas. Um estudo preliminar de associação entre DTAB (dodeciltrimetilamônio) e albumina de soro bovino (FEW et al., 1955) indicou a ocorrência de ligação cooperativa com desnaturação. Estudos eletroforéticos (WILLIAMS & GRÄTZER, 1971; FAIRBANKS & AVRUCH, 1972), sugerem que o CTAB combina-se com diversas proteínas e o comportamento eletroforético do complexo resultante assemelha-se ao complexo formado entre proteína e SDS. Há também evidências de associação cooperativa entre glucagon e tetradeciltrimetilamônio e cetiltrimetilamônio, com acompanhamento de mudanças conformacionais (BORNET & EDELHOCK, 1971).

Os surfatantes catiônicos e aniônicos são similares em alguns aspectos: a concentração de surfatante na qual ocorre a ligação cooperativa é praticamente a mesma para uma grande variedade de proteínas, e a restrição conformacional imposta pelas pontes de dissulfeto leva a um nível menor de ligações do que o observado quando as pontes de dissulfeto estão reduzidas (REYNOLDS & TANFORD, 1970; PITT-RIVERS & IMPIOMBATO, 1968). Entretanto, dois níveis discretos de saturação nas proteínas reduzidas foram observadas para SDS (REYNOLDS & TANFORD, 1970) e apenas um nível foi observado para tetradeciltrimetilamônio (NOZAKI et al., 1974).

A diferença mais importante entre os dois surfatantes está no fato de que o modo cooperativo de ligação para o surfatante catiônico, ocorre em concentração muito perto da sua c.m.c., enquanto que o correspondente processo, para SDS, em força iônica similar, ocorre muito abaixo da c.m.c..

A associação cooperativa entre o cátion tetradeciltrimetilamônio (TTA) e proteínas, em alta concentração de surfatante, é similar ao processo com SDS, resultando em complexos que têm quase as mesmas propriedades hidrodinâmicas. Entretanto, a concentração de surfatante catiônico em que ocorre a transição é aproximadamente 10 vezes maior do que a requerida para SDS. O TTA tem uma cadeia alquila maior, correspondente a uma maior hidrofobicidade intrínseca e sua c.m.c. é menor do que a do SDS.

A explicação para a diferença na concentração crítica para a ligação cooperativa não é a mesma utilizada para a não observação de ligação cooperativa com surfatantes não iônicos (MAKINO et al., 1973). Os surfatantes não iônicos tem c.m.c. menor que os iônicos de mesmo comprimento de cadeia alquila, devido à menor repulsão entre os grupos polares. Se o grupo polar tem pouco efeito na afinidade por proteína desnaturada, a vantagem competitiva entre associação com proteína e auto-associação para formar micelas pode então mudar, favorecendo a formação de micela, quando um grupo polar iônico é trocado por um não iônico. A troca de um grupo iônico por outro, entretanto, não tem efeito na c.m.c., sendo a c.m.c. de TTA quase a mesma de $C_{13}OSO_3^-$. Apesar disso o catiônico é menos efetivo que $C_{12}OSO_3^-$ ou $C_{14}OSO_3^-$ em promover a transição cooperativa.

O grupo polar tem um importante papel no mecanismo de ligação. Uma vez que a transição cooperativa em SDS e TTA ocorre na mesma concentração para muitas proteínas e o envolvimento do grupo polar não deve depender da característica específica da sequência de aminoácidos ou outros aspectos da estrutura da proteína, uma explicação razoável é que o surfatante não pode ligar-se como uma camada uniforme, sobre a cadeia polipeptídica porque estaria sujeito à repulsão eletrostática, em posições onde as cadeias laterais de mesma carga projetam da superfície. Então, as moléculas de surfatante,

primeiramente atraídas pela proteína por interação hidrofóbica, tenderiam a se compactar sobre as cadeias laterais de carga oposta.

A interação entre DTAB e o polieletrólito sintético poliestireno sulfonato (PSS) foi examinada por HAYAKAWA & KWAK (1982) que estabeleceram que o detergente interage fortemente com o polieletrólito num processo que envolve um efeito cooperativo.

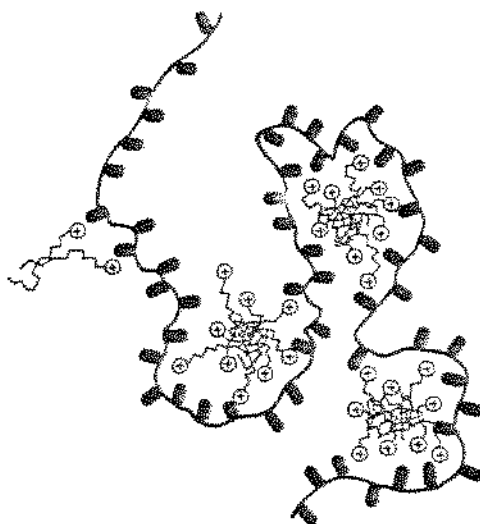


Fig. 4. Ilustração da interação de moléculas de surfatante com polieletrólito, mostrando a formação de pequenos agregados em grande número. Extraído de ABUIN & SCAIANO, 1984.

ABUIN & SCAIANO (1984) verificaram que 90 a 95% do surfactante está ligado ao PSS, e que a adição do DTAB acarreta um decréscimo na viscosidade devido ao enrolamento da cadeia do PSS, que acompanha a ligação cooperativa. Este trabalho enfatiza que a agregação ocorre em concentrações abaixo da c.m.c., e isso demonstra claramente que estes agregados não são micelas convencionais (Figura 4). O número de moléculas na agregação é de 7 a 10 por sítio, portanto, menor do que nas micelas.

O mesmo comportamento também pode ser esperado para interação entre surfactantes e proteínas (JONES, 1992).

3. MATERIAL

3.1. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

As culturas de *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171, *Saccharomyces cerevisiae* FFTP 0472 , e *Escherichia coli* fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

As culturas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas mendocina* ATCC 25411, *Pseudomonas acidovorans* ATCC 17438, *Pseudomonas cepacia* ATCC 25416, e *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 foram gentilmente cedidas pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello".

As culturas de *Acetobacter aceti* IZ 2023 e *Acetobacter pasteurianus* IZ 2024, ambos de procedência NUR, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Claudio Rosa Gallo do Departamento de Tecnologia Rural-ESALQ-USP.

A cultura de *Klebsiella terrigena* foi gentilmente cedida pela colega Neusely da Silva, bactéria isolada de Torre de Resfriamento de usina de açúcar e álcool (Tese de mestrado FEA-UNICAMP).

3.2. MEIOS DE CULTURA.

3.2.1. Meio CN (Caldo Nutriente)

Empregado na reativação das bactérias Gram-negativas, exceto *Acetobacter* spp.

Extrato de carne.....	3 g
Peptona.....	5 g
H ₂ O destilada.....	1.000 ml

3.2.2. Meio NA (Ágar Nutriente)

O meio 3.2.1 acrescido de 1,5% de ágar foi empregado na manutenção de *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena* e *Alcaligenes faecalis*.

3.2.3. Pseudomonas ágar F

Utilizado para manutenção de *Pseudomonas* spp.

Bacto proteose peptona.....	20 g
Maltose.....	10 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
Sulfato de magnésio.....	15 g
H ₂ O.....	1.000 ml

3.2.4. Meio ACE

Utilizado para reativação de *Acetobacter* spp.

Triptona.....	50 g
Extrato de levedura.....	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Glicose.....	20 g
H ₂ O.....	1.000 ml

3.2.5. Meio ACEA

O meio ACE acrescido de 2% de ágar foi utilizado para a manutenção de *Acetobacter* spp.

3.2.6. Litmus Milk

Utilizado para manutenção de *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*.

Bacto Skin Milk.....	100 g
Bacto Litmus.....	0,75 g
H ₂ O.....	1.000 ml

3.2.7. PDA

Utilizado para manutenção de *Saccharomyces* spp.

Infusão de batata.....	4 g
Glicose.....	20 g
Agar.....	15 g
H ₂ O destilada.....	1.000 ml

3.2.8. Meio MRS

Utilizado para reativação de *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*.

Bacto proteose peptona N°3.....	10 g
Extrato de carne.....	10 g
Extrato de levedura.....	5 g
Dextrose.....	20 g
Citrato de amônio.....	2 g
Acetato de sódio.....	5 g
Sulfato de magnésio.....	0,1 g
Sulfato de manganês.....	0,05 g
Tween 80.....	2 g
H ₂ O.....	1.000 ml

3.2.9. Meio YEPD

Utilizado na reativação das culturas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Extrato de levedura.....	10 g
Peptona.....	20 g
Dextrose.....	20 g
H ₂ O.....	1.000 ml

3.3. Enzimas

Lisozima (SIGMA)

Novozym²³⁴ (NOVO NORDISK)

3.4. Reagentes

Acrilamida (SIGMA)

bis Acrilamida (SIGMA)

Ácido acético (MERCK)

Ácido clorídrico (MERCK)

Ácido fosfotungstico (MERCK)

Álcool etílico 99,5% (MERCK)

Azul de metileno (ECIBRA)

Brometo de cetiltrimetilamônio (SIGMA)

Carbono em bastão

Carbonato de sódio (SIGMA)

Citocromo-C (SIGMA)

Cloreto de magnésio (MERCK)

Cloreto de potássio (MERCK)

Coomassie blue (SIGMA)

Dodecilsulfato de sódio (MERCK)

Eritrosina (FLUKA)

Etilenodiaminotetracetato (MERCK)

Formaldeído (MERCK)

Fosfato de potássio monobásico (MERCK)

Fosfato de potássio dibásico (MERCK)

Glicerol (ECIBRA)

Glicina (SIGMA)

Glicose (MERCK)

Hidróxido de sódio (MERCK)
2-mercaptoetanol (BAH Biochemicals)
Metanol (MERCK)
Nitrato de prata (MERCK)
Paralódio
Penicilina V (Fontoura-Wyeth)
Persulfato de amônio (ECIBRA)
Sacarose (MALLINCRODT)
Sulfato de amônio (ECIBRA)
TEMED (NNNN-tetrametiletileno diamino) (ECIBRA)
Tiosulfato de sódio (BAKER)
Tris (hidroximetil) aminometano (MERCK)
Triton X-100 (REAGEN)

3.5. Equipamentos

Centrífuga (International Equipment Co., modelo B-20A)
Espectrofotômetro (Baush & Lomb, Spectronic 20)
Espectrofotômetro DMS 100 (INTRALAB)
Equipamento para eletroforese (Pharmacia, Sistema 2001)
Incubador Shaker (New Brunswick Scientific Inc. Co., modelo G-25)
Microscópio de contraste de fase (NIKON)
Microscópio eletrônico de transmissão (ZEISS, EM-9)
Respirômetro Warburg (B. Braun-Melsungen)
Ultracentrífuga (Beckman, modelo L5-75)
Ultrasonicador (Bronwil Scientific, Biosonik III)

4. MÉTODOS

4.1. FORMULAÇÃO DE MEIO DE CULTURA TENDO COMO BASE O CALDO DE CANA CONCENTRADO.

Para a realização do presente trabalho, que teve por finalidade estudar o efeito de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em diferentes microrganismos foi necessário formular um meio de cultura onde todos os microrganismos crescessem com características cinéticas semelhantes à de seus meios de origem.

Foram testadas diferentes formulações de meio de cultura, tendo como base o caldo de cana concentrado, uma vez que o CTAB é um biocida utilizado em usinas de álcool para o controle de contaminantes da fermentação.

A adição de vários sais, em diferentes concentrações, a adição de diferentes fontes de proteínas, assim como, a adição de vitaminas, foram analisadas através de curvas de crescimento realizadas paralelamente no meio apropriado e no meio formulado. As formulações estão ilustradas na Tabela 1.

Para a realização de estudos através de curvas de crescimento, é desejável a utilização de culturas jovens. As culturas foram reativadas através de 3 repiques sucessivos em meios apropriados, de forma que o último, isto é, o inóculo para as curvas tivesse 12 horas.

As cubetas foram esterilizadas com álcool etílico 70% e enxaguadas com água destilada estéril. Durante a realização das curvas de crescimento, as cubetas permaneceram tampadas com rolhas de cortiça estéreis.

TABELA 1. Formulação de meio de cultura

	Meios de CANA										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
C	-	-	-	-	5	5	-	-	-	-	-
D	5	5	5	5	10	10	5	5	5	5	5
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5
F	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H	0,05	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	0,1	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	2	-	2	2	2
L	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-
M	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-

A.Caldo de Cana Desidratado "rapadura" (g/l)

B.Extrato de levedura (g/l)

C.Extrato de carne (g/l)

D.Peptona (g/l)

E.Triptona (g/l)

F.Fosfato de potássio (g/l)

G.Sulfato de amônio (g/l)

H.Sulfato de manganês (g/l)

I.Sulfato de magnésio (g/l)

J.Acetato de sódio (g/l)

K.Citrato de amônio (g/l)

L.Vitamina complexo B.(Roche) (%)

M.Tween 80 (ml)

As curvas de crescimento foram iniciadas com aproximadamente 5×10^7 células. A determinação do número de células viáveis seguiu a metodologia descrita por BUSTA et al., 1984.

Para os microrganismos estritamente aeróbios os cultivos foram realizados em erlenmeyer de 250 ml contendo 20 ml de meio de cultura, sob agitação de 100 rpm a 30°C (New Brunswick Scientific Inc. Co., modelo G-25). Para se fazer as leituras de absorbância no espectrofotômetro (Bauch & Lomb, Spectronic 20) o material foi transferido assepticamente para a cubeta e imediatamente após a leitura, retornada para o frasco e posto sob agitação. Para as demais culturas, as curvas de crescimento foram realizadas nas próprias cubetas em banho de água a 30°C, exceto para *Escherichia coli* que foi realizada a 37°C. As leituras de absorbância foram realizadas em 600 nm.

Foram realizadas curvas de crescimento somente para *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* por serem os microrganismos mais exigentes, para *Klebsiella terrigena* como representante dos demais microrganismos Gram-negativos e *Saccharomyces cerevisiae* FTPT 0472 como representante das leveduras.

4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA DO CTAB EM ÁGUA E DAS INTERAÇÕES NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Para a determinação da c.m.c.do CTAB foi utilizado o método de absorção de corante.

Foi utilizado o corante eritrosina, devido sua absorção máxima ocorrer em comprimentos de onda onde não há absorção dos componentes dos meios de cultura utilizados, além de possuir carga oposta ao CTAB.

Em uma cubeta com tampa foram colocados 2 ml de água destilada com eritrosina, em concentração de 10^{-5} M. O CTAB foi acrescentado em pequenos volumes entre, 1 e 10 μ l das soluções de concentrações entre 10^{-4} e 10^{-1} M, com auxílio de microseringa. À cada acréscimo, a solução foi agitada e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro DMS 100 (Intralab), com compartimento de termostatização da cubeta, fazendo-se uma varredura entre 400 e 700 nm. As leituras foram realizadas a 30°C.

O mesmo procedimento foi realizado com os diferentes meios de cultura.

4.3. EFEITO DO CTAB NO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS.

O estudo da influência de diferentes concentrações do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi realizado através de parâmetros cinéticos. As curvas de crescimento foram realizadas segundo descrito no item 4.1.

A solução de CTAB foi esterilizada através de filtração em membrana de 0,45 μ m (Millipore HA) e acrescentado ao meio de cultura imediatamente antes da inoculação. Os seguintes parâmetros cinéticos foram determinados a partir da curva de crescimento: 1) constante específica de crescimento (μ); 2) latência (L) (LODGE & HINSHELWOOD, 1943) e 3) fator de latência (R) (IBARRA & YOKOYA, 1986)

4.4. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE CTAB EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Foram preparados tubos contendo 9,0 ml dos seguintes meios: CANA 11, CN, CN + 2% de glicose, MRS, YEPD e ACE, todos a pH 7,0.

A cada tubo foi adicionado 1,0 ml de CTAB em concentrações finais de 0 a 2.000 ppm.

As cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cepacia* e *Ps. acidovorans* foram ensaiadas nos meios CANA 11, CN, CN + 2% de glicose e MRS; *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* em CANA 11 e MRS. *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* em CANA 11 e ACE e *Saccharomyces cerevisiae* em CANA 11, MRS e YEPD.

Os tubos foram inoculados com 0,1 ml de uma cultura de 12 horas, cultivadas no mesmo meio onde foram posteriormente inoculadas para teste. A incubação seguiu as indicações do item 4.1.

4.5. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE METABÓLICA DOS MICRORGANISMOS.

Para o estudo do efeito do CTAB na atividade metabólica de bactérias e leveduras foram realizados experimentos no respirômetro Warburg (B.Braun-Melsungen).

Para obter células jovens, todos os microrganismos foram cultivados no meio de CANA 11 por 12 horas. Após o período de incubação as culturas foram centrifugadas a 8.000 g por 10 minutos a 4°C (International Equipment), lavadas 2 vezes com tampão fosfato 0,02 M pH 7,0 e ressuspensas no mesmo tampão, na concentração aproximada de 10^9 células/ml.

Técnica manométrica - A taxa respiratória foi determinada em frascos padrão Warburg. A cada frasco foi adicionado 1,0 ml da suspensão e 1,2 ml de tampão fosfato 0,02 M pH 7,0. No compartimento lateral, foram adicionados 0,5 ml de glicose 0,2 M e 0,3 ml de CTAB em diferentes concentrações, de forma a dar o volume final de 3,0 ml. Foi realizado um controle sem glicose para a análise do metabolismo endógeno.

Para a medida do oxigênio consumido, o dióxido de carbono foi absorvido por 0,2 ml de NaOH 10%, contido no recipiente central.

Um frasco contendo apenas tampão foi monitorado, funcionando como termobarômetro.

Todo o conjunto de frascos foi mergulhado no banho termostatzado com agitação a 30°C, exceto para *Escherichia coli* que foi realizado a 37°C, e o suporte contendo os frascos foram agitados a 50 rpm durante 15 minutos, para atingir o equilíbrio térmico. Após este período todo o conjunto foi suspenso e inclinado de maneira que o conteúdo do compartimento lateral vertesse pelas paredes do frasco e entrasse em contato com as células. As leituras foram realizadas a cada 15 minutos.

4.6. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE DE ENZIMAS.

A atividade das enzimas lactato desidrogenase e álcool desidrogenase foi determinada pelo método de ORDAL e HARVORSON (1939), com azul de metileno como indicador.

As culturas de 12 horas foram centrifugadas a 8.000g por 10 minutos a 4°C, lavadas 3 vezes com tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 e ressuspensas no mesmo, de forma a conter aproximadamente 10^9 células/0,25 ml.

4.6.1. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE DE CÉLULAS INTACTAS.

Em tubos com tampa de rosca foram adicionados: 5,0 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7,56; 0,25 ml de (D-L) lactato de sódio 0,2 M; 1,0 ml de azul de metileno 1:5.000; 0,25 ml da suspensão de células e 2,0 ml de água deionizada ou solução de CTAB em diferentes concentrações. A reação foi realizada a 37°C.

4.6.2. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE DE CÉLULAS LISADAS.

As células, preparadas conforme descrito no item 4.6, foram ressuspensas em tampão fosfato 0,05 M pH 7,56 e lisadas com ultra-sonicador (Bronwil Scientific, modelo Biosonik III) em 6 ciclos (84 W/cm^2) de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto, em banho de gelo.

O material lisado foi centrifugado a 8.000 g a 4°C por 10 minutos, para a remoção das células inteiras. O sobrenadante foi utilizado para a análise da atividade da lactato desidrogenase como no item 4.6.1.

4.6.3. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE DA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE DE CÉLULAS INTACTAS.

Em tubos com tampa de rosca foram adicionados: 5,0 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7,56; 0,25 ml de álcool etílico 99%; 1,0 ml de azul de metileno 1:5.000, 0,25 ml da suspensão de células e 2,0 ml de água deionizada ou solução de CTAB em diferentes concentrações. O pH da solução foi acertado para 9,0, usando NaOH 0,1 N. A reação foi realizada a 37°C.

4.7. PREPARAÇÃO DE PROTOPLASTOS.

4.7.1. PREPARAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Os métodos de preparação de protoplastos de leveduras utilizam normalmente uma mistura enzimática (BASTIDE et al., 1979; STEPHEN & NASIN, 1982). Neste trabalho foi utilizado a enzima Novo ZYM²³⁴ (NOVO NORDISK) que possui várias atividades enzimáticas, das quais as mais importantes são: 1,3 alfa-glucanase; 1,3 beta-glucanase; laminarinase; xylanase; quitinase e protease, produzida por fermentação por *Trichoderma harzianum*.

Células cultivadas em meio de CANA 11 foram lavadas com tampão Tris-HCl 3,3 mM pH 7,4 e ressuspensas no mesmo tampão. Adicionou-se Novo ZYM²³⁴, a uma concentração final de 0,1 mg/ml, e incubou-se a 30°C por 30 minutos.

A proteção osmótica dos protoplastos foi realizada com solução de KCl 0,6 M.

4.7.2. PREPARAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE BACTÉRIAS.

A preparação de protoplastos de bactérias foi realizada através do cultivo de células na presença de penicilina V (Tabela 2), no meio de CANA 11, com incubação a 30°C, com exceção de *Escherichia coli* que foi incubada a 37°C durante 12 horas.

Tabela 2. Concentração de penicilina V utilizada para a obtenção de protoplastos de bactérias.

Microrganismo	penicilina V (Unidades)
<i>Escherichia coli</i>	500
<i>Klebsiella terrigena</i>	500
<i>Alcaligenes faecalis</i>	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.000
<i>Pseudomonas mendocina</i>	5.000
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	5.000
<i>Pseudomonas cepacia</i>	5.000
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	500
<i>Lactobacillus fermentum</i>	200
<i>Acetobacter aceti</i>	200
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	200

A proteção osmótica foi realizada com solução de sacarose 0,75 M

4.8. AÇÃO DO CTAB EM PROTOPLASTOS E EM CÉLULAS INTACTAS.

Transferiram-se 4,0 ml de cada suspensão de protoplastos para 4 tubos de ensaio. Em cada um dos tubos foi acrescentado 1,0 ml de CTAB, em concentrações finais de 10, 100 e 1000 ppm e, ao quarto tubo, foi acrescentado 1,0 ml de água deionizada.

O mesmo procedimento foi realizado com células intactas. Os microrganismos, após crescimento em CANA 11, foram lavados com água deionizada e ressuspensos no mesmo.

Todo o conjunto foi mantido a 30°C. Em intervalos de 10 minutos, foram feitas lâminas em montagem úmida, observadas em microscópio de contraste de fase, para comparação com os protoplastos e as células intactas não tratadas. Também foi verificada a redução da turbidez da solução, ocasionada pela lise celular.

4.9. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES.

4.9.1. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.

O preparo de proteínas de membrana das amostras seguiu a metodologia descrita por BENEDETTI (1991), com algumas modificações (Figura 5).

As bactérias foram cultivadas em CANA 11. e a suspensão foi centrifugada a 8.000 g a 4°C durante 10 minutos. O precipitado foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 3,3 mM pH 7,4 e centrifugado a 8.000 g a 4°C por 10 minutos. O mesmo procedimento foi utilizado com tampão Tris-HCl 0,1M + EDTA 10 mM pH 7,2 e em seguida com tampão Tris-HCl 0,1 M + MgCl₂ 10 mM pH 7,2.

O sedimento foi ressuspensão em tampão Glicina 0,1 M pH 9,2 contendo lisozima (Sigma) 0,1 mg/ml e sacarose 0,75 M e mantido em banho de gelo por 30 minutos. O material foi lisado em ultra-sonicador (Bronwil Scientific modelo Biosonik III), em banho de gelo, em 4 ciclos de 30 segundos (84 W/cm²), com intervalos de 1 minuto.

O material foi centrifugado a 8.000 g a 4°C por 10 minutos para a remoção de células inteiras. O sobrenadante (S₁) foi recuperado e centrifugado a 28.000 g (Beckman Ultracentrifuge modelo L5-75) por 30 minutos a 4°C.

O sobrenadante (S₂) contendo as proteínas do citosol foi coletado e o precipitado (P₂), contendo as membranas foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 3,3 mM pH 7,4 e centrifugado a 28.000 g a 4°C por 30 minutos.

O precipitado (P₃) foi novamente ressuspenso em tampão Tris-HCl 3,3 mM pH 7,4 e centrifugado a 28.000 g a 4°C por 30 minutos.

O precipitado (P₄) contendo as vesículas de membranas foi ressuspenso em 400 µl de tampão Tris-HCl 85 mM e Triton X-100 2% (SCHNAITMAN 1971a; SCHAITMAN 1971b). A suspensão foi agitada por inversão durante 30 minutos e centrifugada a 12.000 g durante 3 minutos.

O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi recuperado, adicionou-se igual volume de tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,001% e ferveu-se em banho de água durante 5 minutos.

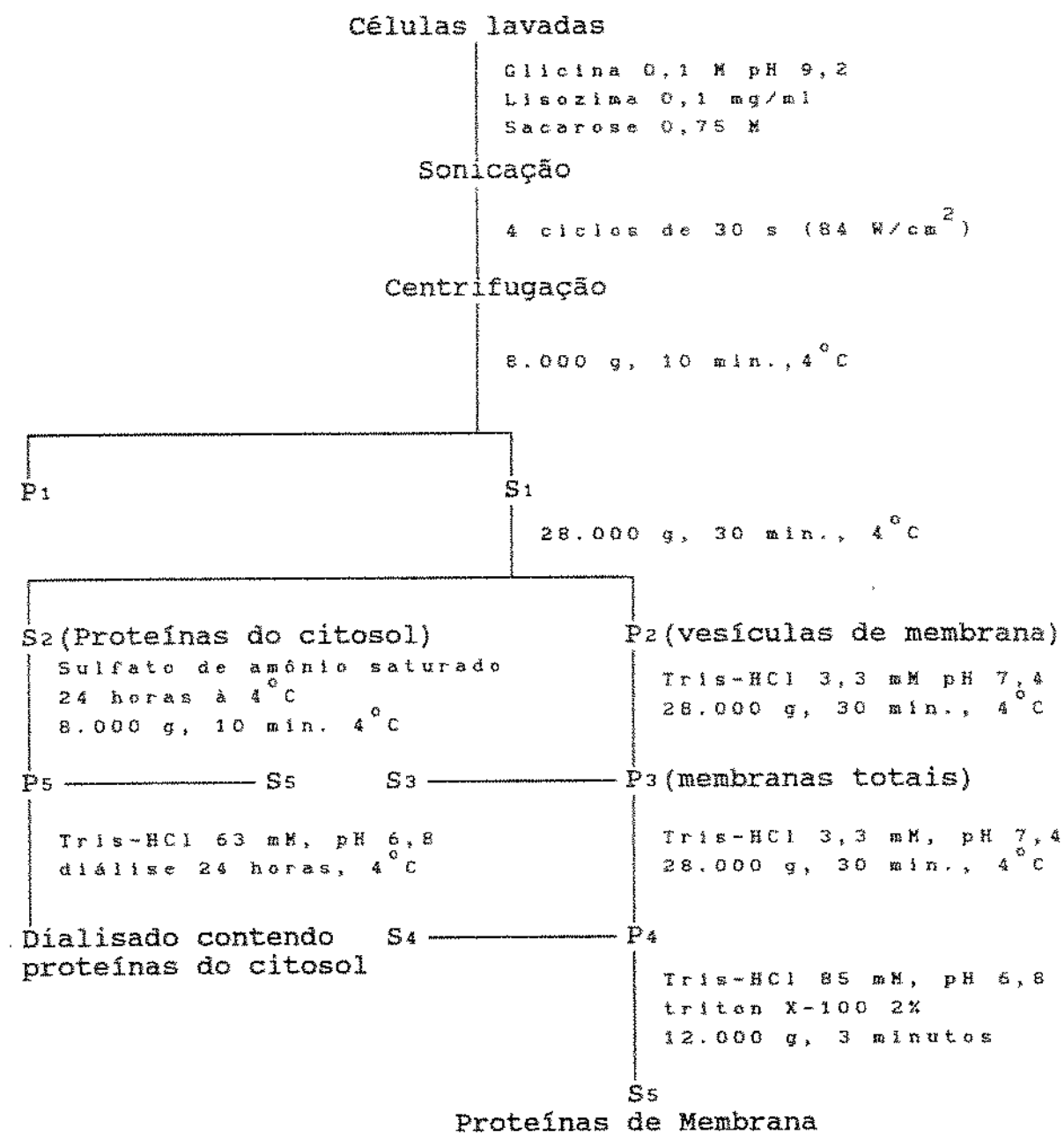
4.9.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO CITOSOL.

Ao sobrenadante S₂ contendo proteínas do citosol, foi acrescentado igual volume de sulfato de amônio saturado a 25°C. A mistura foi mantida por 24 horas a 4°C. O material foi centrifugado a 8.000 g por 10 minutos a 4°C.

O precipitado (P₅) foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 85 mM e dialisado contra água destilada durante 24 horas a 4°C.

A solução contendo proteínas do citosol foi recuperada e adicionou-se igual volume de tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 4% , glicerol 20% , 2-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,001% e fervidas em banho de água durante 5 minutos.

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES



S-Sobrenadante
P-Precipitado

Fig. 5. Fluxograma de Extração de Proteínas Celulares.

4.10. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS.

A eletroforese de proteínas em gel de SDS-PAGE foi realizada no sistema descontínuo dissociante de LAEMMLI (1970) em equipamento Pharmacia Sistema 2001. A montagem dos géis e condições de corrida seguiram a metodologia descrita no "Hoefer Electroforesis Catalog and Exercises (1990-1991)".

A montagem dos géis de separação (10%) e de empacotamento (4%) seguiu as especificações da Tabela 3.

TABELA 3. Soluções estoques e suas proporções usadas no preparo dos géis de eletroforese em sistema descontínuo dissociante.

Soluções	Gel de Separação	Gel de empacotamento
Monômero 30%T 2,7%Cbis	20 ml	2,66 ml
Tampão Gel de Separação Tris-HCl 1,5M; pH 8,8	15 ml	----
Tampão Gel de Empacot. Tris-HCl 0,5M; pH 6,8	--	5,0 ml
SDS 10%	0,6 ml	0,2 ml
H ₂ O	24,1 ml	12,2 ml
Persulfato de amônio 10%	300 µl	100 µl
TEMED (NNNN-tetrametile- tillenodiamino)	20 µl	10 µl
Volume Total	60 ml	20 ml

As soluções do gel de separação foram homogeneizadas em H₂O, de acordo com a seqüência mostrada na Tabela 3, e aplicadas entre as placas. Inseriu-se um pente em branco para a formação do espaço do gel de empacotamento. Os géis foram polimerizados à temperatura ambiente por 30 minutos.

A mistura do gel de empacotamento seguiu a mesma sequência do gel de separação. O pente em branco foi retirado e o espaço remanescente foi lavado com H_2O destilada e depois foi aplicado o gel de empacotamento. O pente (10 canaletas) foi inserido no conjunto e o gel de empacotamento foi polimerizado à temperatura ambiente por 1 hora. O pente foi removido e as canaletas foram lavadas com H_2O destilada.

As canaletas dos géis polimerizados foram completadas com tampão de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 0,025 M; Glicina 0,192 M; SDS 0,1% pH 8,3) e as amostras de proteínas foram aplicadas. O conjunto foi montado na cuba superior e o volume da cuba foi completado com o tampão de corrida. Os géis foram montados na cuba inferior, totalmente submersos em tampão de corrida Tris-glicina-SDS.

4.11. COLORAÇÃO DE COOMASSIE BLUE PARA PROTEÍNAS.

A metodologia de coloração de Coomassie Blue para proteínas em gel de SDS-Poliacrilamida seguiu a metodologia descrita no "Hoefer Eletroforesis Catalog and Exercises (1990-1991)", com algumas modificações.

Após a corrida eletroforética o gel foi transferido para uma cuba de acrílico (20 x 15 cm) com 150 ml da solução corante Coomassie Blue 1%, sob agitação suave, à temperatura ambiente, por 2 horas no mínimo.

A solução de coloração foi removida e o gel foi transferido para a solução de descoloração I (metanol 50%, ácido acético 10% e H_2O 40%), sob agitação constante. Após uma hora, o gel foi transferido para a solução de descoloração II (metanol 5%, ácido acético 7% e H_2O 88%) e mantido com trocas ocasionais, sob agitação, até a remoção da coloração de fundo.

4.12. COLORAÇÃO DE PRATA PARA PROTEÍNAS.

A metodologia de coloração de proteínas em gel de SDS-Poliacrilamida seguiu a técnica originalmente descrita por BLUM et al. (1987), com modificações (Tabela 4).

Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma cuba (20 x 15 cm) contendo 150 ml da solução de fixador (etanol 50%, ácido acético 12% e 0,5 ml/l formaldeído a 37%), sob agitação suave durante 2 horas.

A seqüência da técnica de coloração de prata seguiu as indicações mencionadas na Tabela 4. Os tempos em cada solução foram seguidos estritamente, com exceção dos passos 7, 8 e 9. A coloração foi interrompida quando a intensidade de revelação das bandas foi julgada suficiente.

TABELA 4. Coloração de prata para proteínas.

Passo	Soluções	Tempo
1.Fixação	etanol 50%; ácido acético 12%; 0,5ml/l formaldeído 37%	2 horas
2.Lavagem	etanol 50%	3x20 min
3.Pré-Tratamento	tiossulfato de sódio 0,02%	1 min
4.Lavagem	água destilada	3x20 seg
5.Impregnação	nitrato de Prata 0,2%; 0,75 ml/l formaldeído 37%	20 min
6.Lavagem	água destilada	3x20 seg
7.Revelação	carbonato de sódio 6%; tiossulfato de sódio 0,4%; 0,5ml/l formaldeído 37%	10 min
8.Lavagem	água destilada	3x20 seg
9.Bloqueio	metanol 50%; ácido acético 12%	10 min
10.Lavagem	metanol 50%	20 min

4.13. PRESERVAÇÃO E SECAGEM DOS GÉIS DE SDS-PAGE.

Os géis corados foram transferidos para a solução de Preservação I (metanol 30%), sob agitação constante por 30 minutos e em seguida para a solução de Preservação II (glicerol 3%) por 30 minutos, sob agitação.

Os géis foram envolvidos em papel celofane previamente lavado com água destilada (JUANG et al., 1984), apoiados sobre uma placa de vidro (30 x 30 cm) e secados a temperatura ambiente por 4 a 5 dias.

4.14. PREPARO DAS TELAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA.

Nas preparações para observação por microscopia eletrônica, foram utilizadas telas de cobre com diâmetro de malha de 400 Mesh. As telas sofreram deposição de uma película de parlódio, metalização com carbono e impregnação com citocromo-c, antes da preparação das amostras bacterianas (BRADLEY, 1965), conforme descrito a seguir.

Em uma cuba de vidro contendo água destilada foi adicionada uma gota da solução de parlódio com pipeta Pasteur. A película formada foi removida com auxílio de papel de filtro. Uma outra gota da solução de parlódio foi depositada sobre a superfície da água imediatamente após a remoção do primeiro filme.

As telas de microscopia eletrônica foram depositadas sobre as porções mais finas e uniformes do filme, tomando-se o cuidado de não se depositar telas numa área do filme superior a 5 cm de diâmetro. Com o auxílio de uma pinça, as telas foram levemente pressionadas contra o filme de parlódio

A retirada das telas foi realizada com auxílio de um pedaço de papel de filtro, que foi aplicado por cima das telas. O papel de filtro com as telas aderidas foi retirado e invertido, de modo que as telas ficassem na porção superior do papel. Secou-se o filtro à temperatura ambiente durante uma noite.

As telas secas foram metalizadas com uma película fina de carbono em metalizador Hitachi (HUS-4GB).

Na preparação das telas, utilizou-se uma solução de citocromo-c para permitir uma melhor adesão bacteriana e espalhamento. Para cada tela a ser sensibilizada foi depositada uma gota (aprox. 20 μ l) da solução de citocromo-c sobre uma superfície de Parafilm e deixadas em repouso por 1 hora. Após este período as faces metalizadas das telas foram depositadas sobre a gota e imediatamente removidas, deixando secar à temperatura ambiente por alguns minutos.

4.15. PREPARO DAS CÉLULAS, COLORAÇÃO NEGATIVA COM PTA E VISUALIZAÇÃO.

As células foram cultivadas e lavadas com tampão tris-HCl 3,3 mM pH 7,4 e ressuspensas em água deionizada. Aplicou-se uma gota de 50 μ l do material ressuspenso sobre uma tira de Parafilm. Sobre esta gota foi depositada uma tela de microscopia eletrônica com a película sensibilizada com citocromo-c voltada para a gota.

Deixou-se a tela em contato com a suspensão bacteriana por dois minutos e o excesso de material foi removido encostando-se a borda da tela em papel absorvente. A tela foi então depositada sobre uma gota de 50 μ l da solução de ácido

fosfotungstico 1% e deixada em repouso por 2 minutos (HORNE, 1965). O excesso foi retirado com papel absorvente. A tela foi acondicionada em um porta-telas para secagem.

As telas secas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-9, sob aumentos de 9.780 e 28.048 X. As fotomicrografias eletrônicas foram feitas em filme Kodalit (Kodak) e ampliadas em papel fotográfico Kodak F-3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. FORMULAÇÃO DE MEIO DE CULTURA.

Uma propriedade básica das células microbianas intactas, em presença de nutrientes, é a habilidade de crescer.

O crescimento de uma cultura apresenta três estágios: uma fase de latência (ou "lag"), nem sempre observada, durante a qual a divisão é anormalmente lenta, uma fase logarítmica, durante a qual o número de microrganismos aumenta exponencialmente com o tempo, seguido de uma rápida queda no crescimento atingindo a fase estacionária, em que o número total de células atinge um limite chamado de população estacionária ou concentração estacionária (DAGLEY & HINSHELWOOD, 1938).

Na escolha do meio de cultura dois fatores foram considerados relevantes: a capacidade de promover um bom crescimento e a capacidade de permitir o início do crescimento após uma fase de latência não muito extensa, uma vez que o objetivo do trabalho foi o estudo da ação do CTAB não apenas em células em repouso mas, principalmente, sobre células em crescimento ativo. Segundo BAKER et al. (1941b) os compostos de amônio quaternário atuam sobre o metabolismo das células em crescimento logo nos primeiros 15 minutos de contato.

Os resultados de crescimento de diversas cepas, obtidas nas diferentes formulações de meio de cultura testadas durante a etapa de seleção do meio, encontram-se nas Tabelas 5 e 6 e algumas curvas de crescimento das cepas nos meios de CANA, estão ilustradas nas Figuras 6 a 10.

No meio de CANA 1, somente *Klebsiella terrigena* foi capaz de crescer. As quantidades de sulfato de manganês e sulfato de magnésio acrescentados a esse meio foram as mesmas

presentes no meio MRS. A duração da fase de latência é uma função da concentração de magnésio. Há um limite na concentração de magnésio de 2-20 ppm, abaixo do qual não ocorre crescimento. Este íon, portanto, é necessário para alguma reação durante a fase de latência. Na sua ausência, a fase "lag" prolonga-se e o inóculo deixa de ser viável antes das células começarem a divisão. Altas concentrações de magnésio, entretanto, diminuem o crescimento (LODGE & HINSHELWOOD, 1939b)

O magnésio tem um papel fundamental na atividade das fosfatases. Estas enzimas controlam a formação de substâncias intermediárias entre o substrato fornecido e o protoplasma. Estes compostos intermediários devem estar presente em uma concentração mínima antes que a divisão ocorra. Portanto, a velocidade de síntese e o tempo necessário para acumular a concentração necessária dentro da célula varia com a concentração do magnésio. Todas as substâncias que atuam como ativadores de enzimas, entretanto, somente o fazem em baixas concentrações; quando a concentração aumenta acima de um certo limite estas substâncias passam a ter um efeito inibidor.

Na possibilidade de que a ausência de crescimento das outras culturas fosse devido ao fato do caldo de cana apresentar altas quantidades de sulfato, magnésio e manganês, provocando excesso destes íons no meio, a quantidade destes sais, foi reduzida a um quinto na formulação do meio de CANA 2. Verificou-se então uma melhora considerável no crescimento dos demais microrganismos; porém, com constantes máximas de crescimento muito inferiores às obtidas nos meios de origem, e com fase de latência superior, com exceção de *Klebsiella terrigena*. A fase de latência apresentada foi consequência de fatores externos, uma vez que a sua duração no meio de CANA 2 foi maior do que no meio de origem de todos os microrganismos testados, exceto *Klebsiella terrigena*. *Acetobacter aceti* apresentou uma fase de latência 7,6 vezes maior do que no meio ACE, com um tempo de 8,47 horas para a adaptação.

A fase de latência é o período durante o qual a atividade metabólica das células inoculadas aumenta até atingir as características de uma cultura em crescimento exponencial. Mudanças no conteúdo de DNA, RNA e proteína durante a fase de latência tem sido estudadas por vários pesquisadores ao longo dos anos (AIBA et al., 1967; WALDRON & LACROUTE, 1975), porém há poucas informações precisas e detalhadas sobre os ajustes metabólicos que ocorrem durante essa fase.

Todas as prováveis causas da ocorrência do período de latência podem ser caracterizadas como algum tipo de deficiência presente na célula, que impossibilita o imediato crescimento nas novas condições ambientais (BARFORD et al., 1982). Dentre essas deficiências podemos destacar: espectro de enzimas inapropriado para o crescimento nas novas condições; redução no metabolismo geral, como resposta à mudança ou à ausência de energia e/ou nutrientes prontamente utilizáveis pelas células; danos físicos e/ou fatores químicos. As células nestas condições permanecem na fase de latência até que os constituintes celulares sejam reajustados para responder às novas condições e acumulem-se nas concentrações requeridas para o crescimento. Esse processo ocorre, por exemplo, no caso dos inóculos tomados a partir de culturas que já atingiram a fase estacionária de crescimento.

Outras prováveis causas do período de latência, relacionadas com o meio extracelular são: necessidade de produzir um "pool" extracelular de intermediários metabólitos, necessidade de remover materiais tóxicos do meio (PIRT, 1975), falta de dióxido de carbono no meio e necessidade de produzir enzimas extracelulares.

No meio CANA 3, retirou-se o sulfato de manganês e o sulfato de magnésio, com resultados relativamente melhores no crescimento de todas as culturas. A latência diminuiu, porém, a população atingida na fase estacionária foi baixa. O *Lactobacillus fermentum*, por exemplo, alcançou a fase

estacionária em apenas 2 horas de incubação.

O início da fase estacionária é devido principalmente à: 1) exaustão do substrato necessário para o crescimento; 2) acúmulo de produtos tóxicos e 3) pH adverso.

A população estacionária aumenta linearmente com a quantidade de glicose e fosfato no meio em uma faixa considerável de concentração. Acima dessa faixa, torna-se independente da concentração destas substâncias. Assim, em soluções diluídas, a exaustão do meio é o principal fator responsável pela suspensão do crescimento, enquanto que, em altas concentrações, outros fatores devem ser considerados (LODGE & HINSHELWOOD, 1939a).

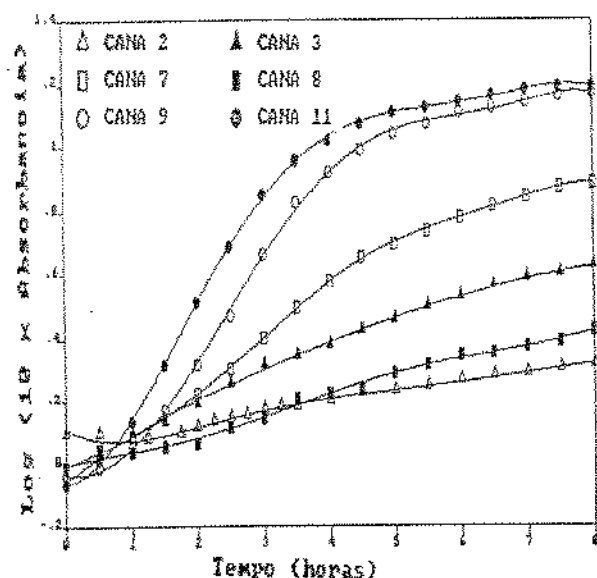


Fig.6. Curvas de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em diferentes meios de CANA.

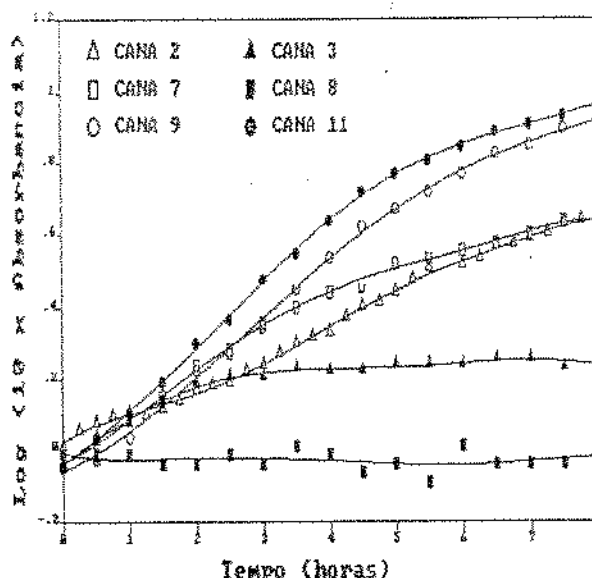


Fig.7. Curvas de crescimento de *Lactobacillus fermentum* em diferentes meios de CANA.

Na possibilidade de que a redução do pH fosse a causa da fase estacionária de *Lactobacillus fermentum*, duplicou-se a quantidade de fosfato de potássio (CANA 4),

verificando-se praticamente nenhuma alteração. *Lactobacillus fermentum* apresentou constante máxima de crescimento (μ) superior ao meio anterior e *Leuconostoc mesenteroides* apresentou fase de latência mais longo que no meio anterior. Portanto o pH não parecia ser o único fator limitante para o crescimento (Tabela 5).

Aumentando a quantidade de proteína, adicionando extrato de carne e dobrando a quantidade de peptona (meio CANA 5); *Acetobacter pasteurianus* e *A. aceti* deixaram de crescer após 2,5 e 5 horas de incubação, respectivamente (Tabela 6).

Na formulação do meio CANA 6 manteve-se a concentração de proteína anterior e acrescentou-se acetato de sódio. Observou-se uma ligeira melhora no crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum*; porém, neste meio pouco ou nenhum crescimento de *Acetobacter* spp. foi observado (Tabela 6).

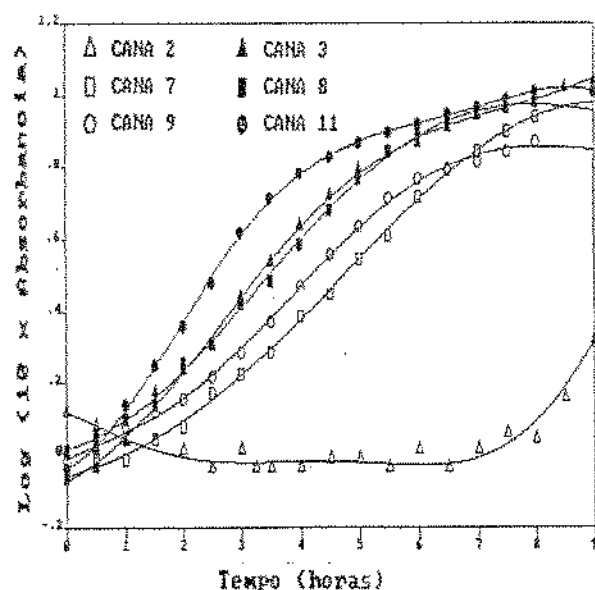


Fig. 8. Curvas de crescimento de *Acetobacter aceti* em diferentes meios de CANA

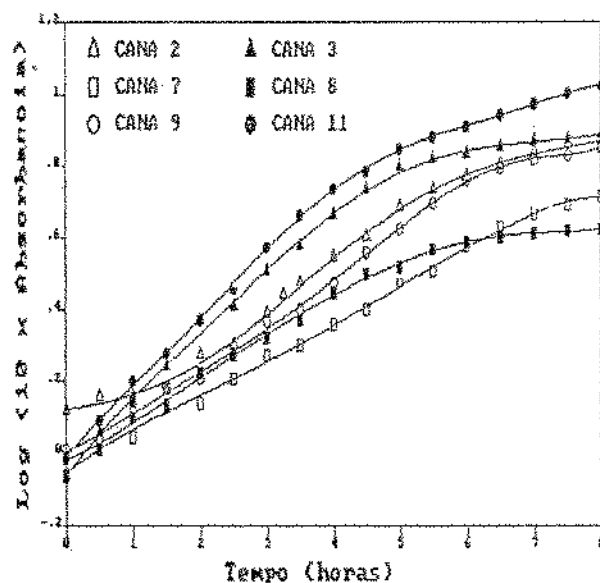


Fig. 9. Curvas de crescimento de *Acetobacter pasteurianus* em diferentes meios de CANA.

Substituindo-se o acetato pelo citrato (meio CANA 7), os resultados foram acentuadamente melhores, porém, o meio ainda não se apresentou ideal para o crescimento de todas as cepas (Tabelas 5 e 6).

Retirando-se o citrato e acrescentando-se 0,1% de vitaminas do complexo B (meio CANA 8), os resultados apresentaram-se piores.

Todavia, quando no meio CANA 9, foi retirada a vitamina do complexo B e novamente acrescentou-se o acetato, acompanhado de Tween 80. Os resultados melhoraram muito; mas, *A. aceti* ainda apresentou latência alta (Tabela 6).

Acrescentando-se 5 g de triptona (CANA 10), o crescimento de todos microrganismos foi significativamente beneficiado. *Leuconostoc mesenteroides*, entretanto, ainda apresentou latência alta (Tabela 5).

Retirando-se o Tween 80 o meio mostrou-se excelente (meio CANA 11), sendo utilizado no prosseguimento do trabalho.

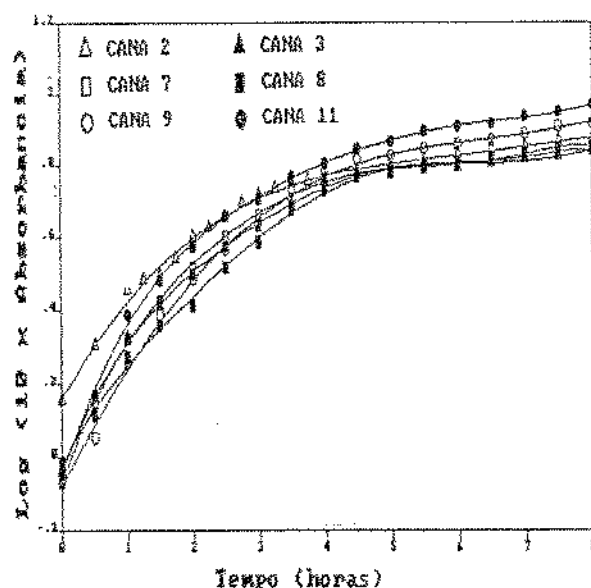


Fig. 10. Curvas de crescimento de *Klebsiella terrigena* em diferentes meios de CANA.

TABELA 5. Parâmetros de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum* e *Klebsiella terrigena* em MRS e em diferentes formulações de meio de cultura, a 30°C, cultura estática.

meios	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			<i>Lactobacillus fermentum</i>			<i>Klebsiella terrigena</i>		
	μ	L	R	μ	L	R	μ	L	R
MRS	0,72	0,0	1,0	0,51	0,0	1,0	0,85	0,0	1,0
CANA 1	-	-	-	-	-	-	1,1	0,0	1,0
MRS	0,73	0,38	0,76	0,41	0,18	0,93	0,39	0,0	1,0
CANA 2	0,13	1,70	0,81	0,24	0,71	0,85	0,69	0,0	1,0
MRS	0,82	0,17	0,87	0,44	0,0	1,0	0,55	0,0	1,0
CANA 3	0,37	0,0	1,0	0,26	0,0	1,0	0,84	0,0	1,0
MRS	0,79	0,16	0,08	0,44	0,0	1,0	0,42	0,0	1,0
CANA 4	0,39	0,72	0,76	0,57	0,0	1,0	0,91	0,0	1,0
MRS	0,62	0,70	0,65	0,34	1,14	0,68	0,35	0,44	0,86
CANA 5	0,19	1,55	0,74	0,24	1,93	0,63	0,60	0,29	0,84
MRS	0,71	0,46	0,72	0,42	0,35	0,86	0,36	0,0	1,0
CANA 6	0,34	0,59	0,82	0,32	0,52	0,84	0,33	0,0	1,0
MRS	0,86	0,55	0,63	0,44	0,01	0,96	0,82	0,0	1,0
CANA 7	0,42	0,73	0,73	0,33	0,15	0,95	0,90	0,0	1,0
MRS	0,69	0,19	0,87	0,37	0,86	0,73	0,51	0,0	1,0
CANA 8	0,18	0,87	0,86	-	-	-	0,66	0,0	1,0
MRS	0,87	0,53	0,63	0,40	0,33	0,88	0,45	0,09	0,96
CANA 9	0,74	0,87	0,53	0,41	0,70	0,75	0,74	0,0	1,0
MRS	0,86	0,38	0,72	0,36	0,37	0,86	0,38	0,0	1,0
CANA 10	0,84	1,40	0,31	0,50	0,79	0,67	0,66	0,10	0,93
MRS	0,89	0,33	0,75	0,49	0,19	0,91	0,51	0,0	1,0
CANA 11	0,85	0,46	0,68	0,42	0,21	0,92	0,80	0,0	1,0

μ -constante máxima de crescimento (h^{-1})

L-latência (h)

R-fator de latência (adimensional)

(-)-não crescimento

TABELA 6. Parâmetros de crescimento de *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* em meio ACE e em diferentes formulações de meio de cultura, a 30°C, 100rpm.

Meios	<i>Acetobacter aceti</i>			<i>Acetobacter pasteurianus</i>		
	μ	L	R	μ	L	R
ACE	0,63	0,0	1,0	0,35	0,0	1,0
CANA 1	-	-	-	-	-	-
ACE	0,57	1,11	0,54	0,46	0,76	0,70
CANA 2	0,78	8,47	$1,36 \cdot 10^{-3}$	0,36	1,25	0,64
ACE	0,55	0,0	1,0	0,57	0,0	1,0
CANA 3	0,48	0,63	0,74	0,46	0,0	1,0
ACE	0,50	0,28	0,91	0,43	2,30	0,37
CANA 4	0,50	0,38	0,83	0,51	0,19	0,92
ACE	0,33	0,75	0,78	0,17	0,87	0,86
CANA 5	0,40	2,07	0,44	0,31	0,22	0,34
ACE	0,55	0,46	0,78	0,47	0,25	0,89
CANA 6	0,07	2,03	0,85	-	-	-
ACE	0,75	1,05	0,46	0,53	0,09	0,95
CANA 7	0,38	1,36	0,59	0,24	0,05	0,98
ACE	0,70	0,77	0,59	0,43	0,0	1,0
CANA 8	0,42	0,83	0,71	0,28	0,16	0,95
ACE	0,52	0,75	0,68	0,53	0,48	0,78
CANA 9	0,41	1,33	0,59	0,34	0,85	0,75
ACE	0,55	0,75	0,67	0,41	0,72	0,73
CANA 10	0,57	0,63	0,69	0,48	0,12	0,94
ACE	0,65	0,12	0,93	0,58	0,0	1,0
CANA 11	0,56	0,33	0,82	0,46	0,0	1,0

μ -constante máxima de crescimento (h^{-1})

L-latência (h)

R-fator de latência (adimensional)

(-)-não crescimento

5.2. CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA DO CTAB.

A partir do espectro de absorção da eritrosina, os pontos máximos de absorção foram locados em gráfico em função da concentração de CTAB para a determinação da concentração micelar crítica (c.m.c.).

A absorção do corante nos meios de cultura seguiu o mesmo perfil da absorção do corante em água, isto é, aumentou linearmente com o aumento da concentração de CTAB até uma determinada concentração em que houve uma mudança na inclinação da curva, com tendência à estabilidade. As figuras 11 e 12 ilustram a determinação da c.m.c. em água e no meio ACE.

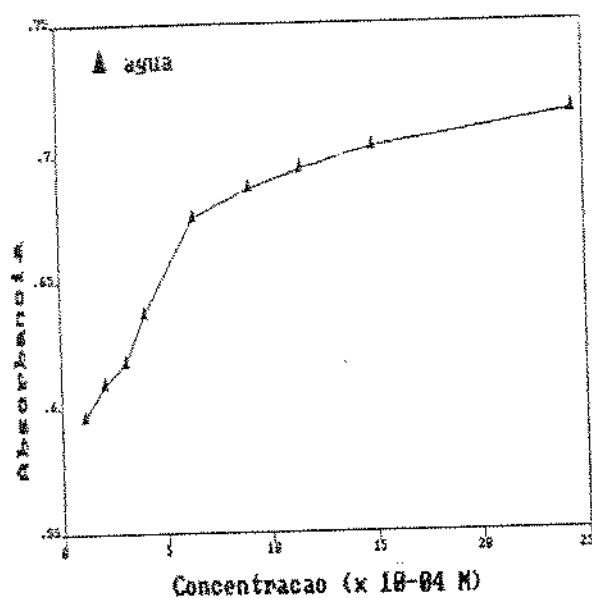


Fig.11.Absorbância da eritrosina em função da concentração de CTAB em água.

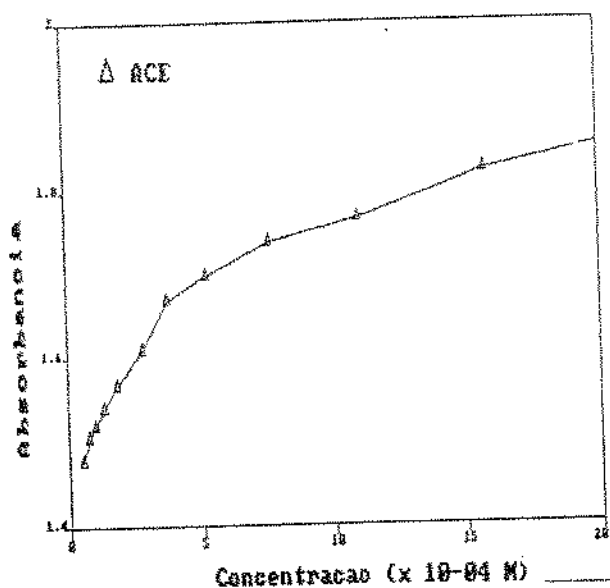


Fig.12.Absorbância da eritrosina em função da concentração de CTAB no meio ACE.

Os valores da c.m.c. do CTAB em água e nos meios de cultura encontram-se na tabela 7.

A concentração micelar crítica do CTAB, determinada pela absorção de luz no espectro visível da eritrosina, em água destilada foi de aproximadamente $8 \times 10^{-4} \text{M}$. Este valor está um pouco abaixo do valor descrito na literatura, $9 \times 10^{-4} \text{M}$ (FENDLER, 1975) determinado através de condutividade elétrica, porém, segundo SHINODA, (1963), a c.m.c. varia consideravelmente com o método utilizado para a sua determinação.

Tabela 7. Concentração micelar crítica (c.m.c.) de CTAB determinada por absorção da luz visível, da eritrosina, a 30°C .

Meio	Concentração de CTAB (Molar)
Água destilada	$8,0 \times 10^{-4}$
CN	$5,5 \times 10^{-5}$
CN + 2% glicose	$6,5 \times 10^{-5}$
YEPD	$5,0 \times 10^{-5}$
ACE	$4,6 \times 10^{-4}$
CANA 11	$1,2 \times 10^{-4}$
MRS	?

(?) medição impossibilitada. Ver texto para explanação.

Verificamos através da tabela 7 que houve um decréscimo na c.m.c. em meio de cultura em comparação à água destilada. Este resultado era esperado, pois a presença de eletrólitos causa uma diminuição da c.m.c..

5.3. INTERAÇÃO ENTRE CTAB E OS COMPONENTES DO MEIO DE CULTURA.

Em concentrações abaixo da c.m.c. verificou-se uma mudança no comportamento espectroscópico da eritrosina, com respeito à absorção de luz visível, em meio de cultura. Com o acréscimo de CTAB houve diminuição da absorbância máxima, até um valor mínimo, que variou com o meio de cultura, e não ocorrendo com água. Após esta concentração, posterior acréscimo de CTAB provocou aumento da absorbância máxima até atingir a c.m.c..

O espectro de absorção da eritrosina em meio YEPD contendo diferentes concentrações de CTAB encontra-se ilustrado na Figura 13.

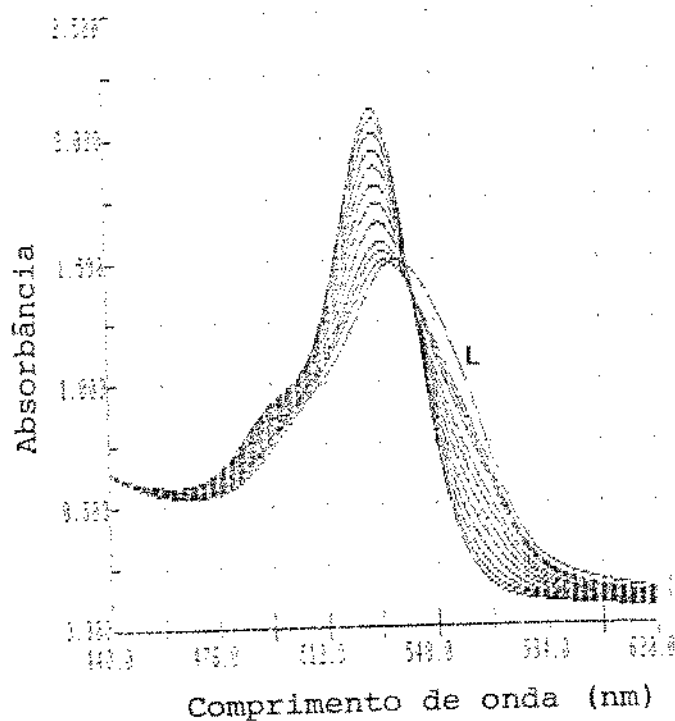


Fig. 13. Espectro de absorção da eritrosina no meio YEPD com concentrações crescentes de CTAB. A curva L representa o ponto isosbético.

Acreditamos que essa diminuição do ponto de máxima absorção, (Figuras 14 e 15) seja devida à interação do CTAB com algum componente do meio de cultura e que após a saturação, os monômeros de CTAB adicionados permaneçam em solução, em concentrações crescentes até a c.m.c..

As concentrações de CTAB em que se verifica essa interação com o(s) componente(s) do meio de cultura estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração de CTAB em que ocorre interação com os componentes dos meios de cultura, a 30°C.

Meio de cultura	Concentração de CTAB x 10 ⁻⁵ M
CN	4,5
CN + 2% glicose	2,8
YEPD	2,5
ACE	4,7
CANA 11	0.14
MRS	?

(?) medição impossibilitada. Ver texto para explanação.

Comparando os resultados da Tabela 8 com a composição dos meios de cultura, podemos concluir que:

1) O(s) componentes do extrato de carne, que participa(m) da formulação do meio CN, interage(m) com o CTAB. O meio YEPD tem 4 vezes mais peptona do que o meio CN além de extrato de levedura, porém, não tem extrato de carne e o meio CN interage com o CTAB em concentrações maiores do que o meio YEPD.

2) Quanto maior a concentração de hidrolizado proteico, maior é o comprometimento do CTAB nesta interação. O meio ACE que contém 50 g/l de triptona, apresenta um comprometimento maior do que o meio YEPD que tem 20 g/l de peptona.

3) O extrato de levedura tem pouco efeito na interação. O meio ACE que tem 5 vezes menos extrato de levedura do que o meio YEPD, a interação é maior.

As observações acima são confirmadas no meio de CANA 11, que apresenta o menor comprometimento do CTAB, e cuja formulação não tem extrato de carne, tem 4 vezes menos peptona do que o meio YEPD, 10 vezes menos triptona do que o meio ACE e tem concentração intermediária de extrato de levedura.

Podemos atribuir essa interação entre o CTAB e o meio de cultura às proteínas (ou cadeias polipeptídicas) do meio. Certamente, esta interação não é devida às micelas pois seus valores são mais baixos do que aqueles determinados no item anterior, além do fato de não apresentarem um comportamento, do ponto de vista de absorção, típicos dos descritos na literatura para as imediações da c.m.c..

A explicação para o fato que o extrato de carne do meio CN contribuir em maior extensão para esta interação, em comparação com a peptona, a triptona e o extrato de levedura, pode ser o grau de hidrólise da proteínas destes últimos. Para que haja a interação do CTAB com proteínas, é necessário que a cadeia polipeptídica apresente uma estrutura terciária, com seus sítios hidrofóbicos (Figura 4). Dependendo do grau de hidrólise da proteína, entretanto, estes sítios são destruídos. Assim é provável que as proteínas do extrato de carne apresentem estes sítios, de forma que 3 g/l de extrato de carne equivaleriam a 50 g/l de triptona, em termos de sítios hidrofóbicos para a interação, uma vez que os meios CN e ACE apresentam esta interação em concentrações muito semelhantes.

Nas análises realizadas com os meios de cultura também foi incluído o meio MRS, porém, não conseguimos obter dados sobre a interação do CTAB com proteínas desse meio, e nem o valor da c.m.c. A eritrosina não apresentou sensibilidade à adição de CTAB. É provável que este fato deva-se à presença do surfatante não iônico Tween 80 na composição do MRS.

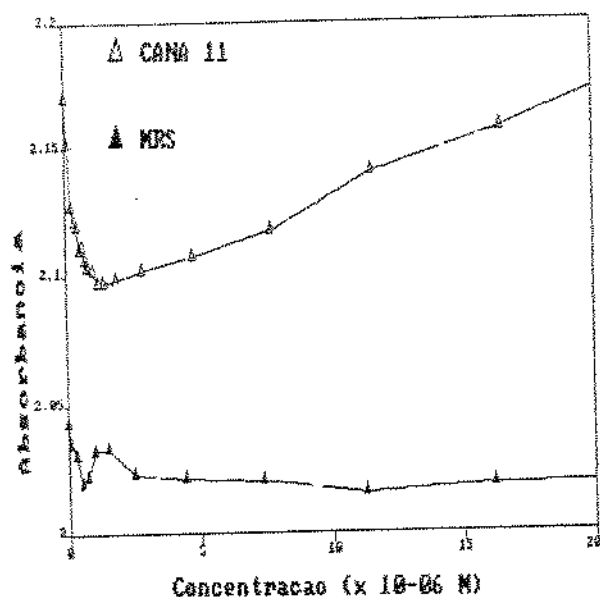


Fig. 14. Absorbância da eritrosina em função da concentração de CTAB nos meios de CANA 11 e MRS.

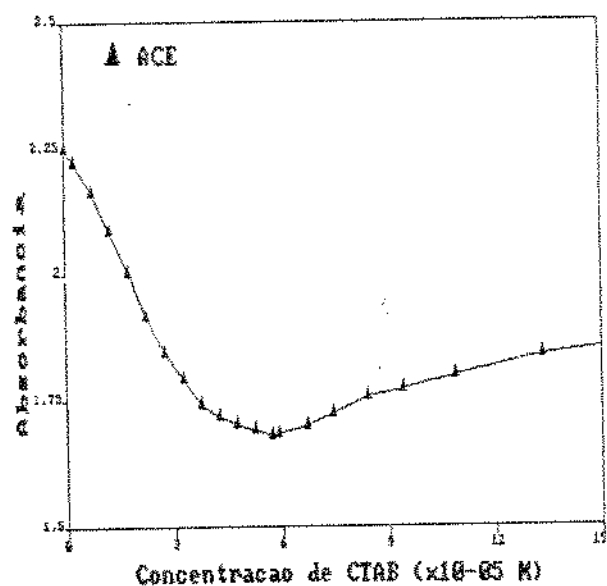


Fig. 15. Absorbância da eritrosina em função da concentração de CTAB no meio ACE.

A eritrosina é um corante que pode ser utilizado para a determinação da c.m.c. de surfatantes catiônicos e não iônicos; logo, ao se adicionar o corante ao meio de cultura, este se complexa com o Tween 80, não permitindo a interação com o CTAB adicionado posteriormente. O surfatante Tween 80 está presente no meio MRS em concentração acima da c.m.c (10^{-5} M, SHINODA, 1963), portanto, a eritrosina já está incorporada às micelas de Tween 80.

5.4. CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS EM CANA 11 COM CTAB.

O efeito de diferentes concentrações de CTAB sobre os parâmetros cinéticos de crescimento dos microrganismos é apresentado na Tabela 9 e algumas curvas de crescimento estão ilustradas nas Figuras 16 a 21.

Os resultados mostraram que o CTAB exerce uma ação biocida sobre as bactérias e leveduras em concentrações que variaram de microrganismo para microrganismo.

Concentrações tão baixas como 2 ppm de CTAB em Cana 11 provocaram alterações no crescimento de espécies do gênero *Acetobacter*. Os parâmetros mais afetados foram a velocidade máxima de crescimento e a população atingida na fase estacionária, tendo pouco efeito sobre a latência.

Esta inibição no crescimento aumentou com o aumento da concentração de CTAB sendo que, acima de 6 ppm, o crescimento foi fortemente inibido, atingindo a fase estacionária em 2 horas (Figura 16).

Em todas as concentrações utilizadas, o CTAB estava presente na forma não associada; portanto, neste sistema tem-se:



Aumentando a concentração de 0 a 50 ppm de CTAB houve diminuição da velocidade de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum* (Figura 17, Tabela 9) e também aumento da duração do período de latência para o último. Para *Leuconostoc*, a duração do período de latência foi máxima na presença de 20 ppm de CTAB, atingindo 4,1 horas. Acima ou abaixo dessa concentração o período de latência diminuiu.

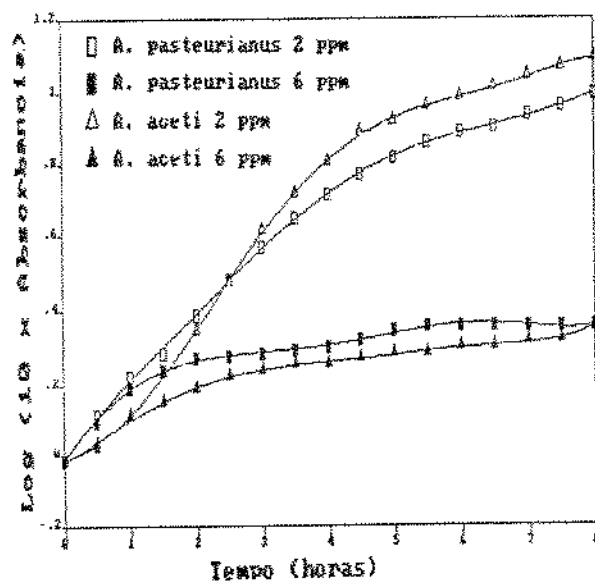


Fig. 16. Curvas de crescimento de *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* em CANA 11 com diferentes concentrações de CTAB, a 30°C, 100 rpm.

O comportamento das espécies *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum* na presença de 40 ou 50 ppm de CTAB foi muito semelhante, em termos de velocidade máxima de crescimento, latência e população estacionária.

A c.m.c. do CTAB no meio CANA 11 é de aproximadamente 42 ppm. Assim, 40 ppm é praticamente o limite da concentração onde há somente a forma não associada de surfatante. Se com 50 ppm de CTAB houver a presença de micela temos o seguinte:



Na presença de células, a c.m.c. provavelmente sofre uma alteração no seu valor.

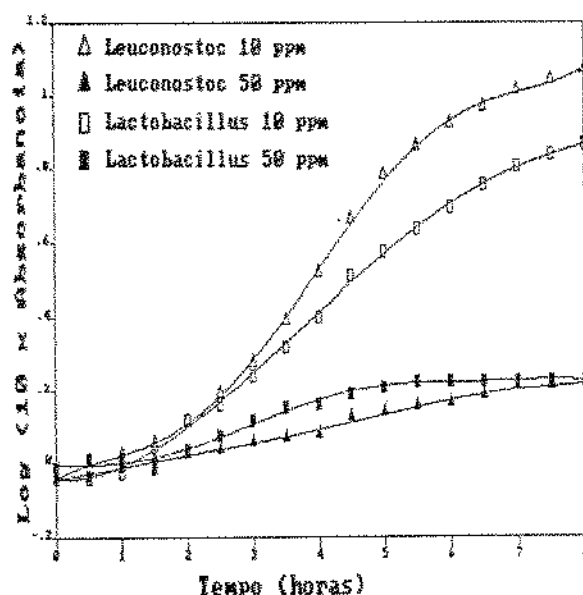
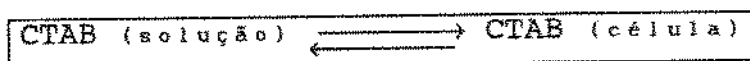


Fig. 17. Curvas de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum* em CANA 11 com diferentes concentrações de CTAB, a 30°C, cultura estática.

O efeito competitivo das micelas remove os monômeros da solução, alterando o equilíbrio:



reduzindo a quantidade de monômeros disponíveis para a inibição do crescimento. A inibição, entretanto, ocorre, o que nos leva a duas suposições:

- 1) As micelas têm ação inibitória sobre as células, contradizendo TOMLINSON et al., 1977, que afirmaram que somente as formas monoméricas são responsáveis pela inibição.
- 2) A presença das células causa uma mudança no equilíbrio micela $\rightleftharpoons$ monômero, resultando na liberação de monômeros e o estabelecimento de um novo balanço entre a tendência dos monômeros para formar micelas ou transferir-se para a superfície celular.

Acreditamos que as duas hipóteses não se excluem.

TABELA 9. Parâmetros cinéticos de crescimento dos microrganismos em meio de CANA 11 com diferentes concentrações de CTAB.

CTAB	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			<i>Lactobacillus fermentum</i>		
	μ	L	R	μ	L	R
0 ppm	0,71	0,88	0,54	0,43	0,93	0,67
10 ppm	0,63	1,94	0,30	0,36	1,21	0,65
20 ppm	0,43	4,13	0,17	0,27	0,91	0,78
30 ppm	0,21	2,57	0,58	0,25	1,04	0,77
40 ppm	0,13	1,47	0,83	0,19	3,65	0,73
50 ppm	0,12	1,57	0,83	0,185	3,75	0,77

	<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella terrigena</i>		
	μ	L	R	μ	L	R
0 ppm	0,63	0,0	1,0	0,60	0,0	1,0
50 ppm	0,59	0,0	1,0	0,56	0,0	1,0
100 ppm	0,38	0,0	1,0	0,49	0,0	1,0
150 ppm	0,38	0,0	1,0	0,24	0,0	1,0
200 ppm	0,38	0,0	1,0	-	-	-
250 ppm	0,38	0,0	1,0	-	-	-
300 ppm	0,11	0,0	1,0	-	-	-

	<i>Acetobacter aceti</i>			<i>Acetobacter pasteurianus</i>		
	μ	L	R	μ	L	R
0 ppm	0,61	0,42	0,77	0,62	0,0	1,0
1 ppm	0,63	0,59	0,69	0,58	0,0	1,0
2 ppm	0,58	0,55	0,72	0,55	0,0	1,0
4 ppm	0,33	0,0	1,0	0,51	0,0	1,0
6 ppm	0,28	0,0	1,0	0,47	0,0	1,0
8 ppm	0,25	0,0	1,0	0,43	0,0	1,0
10 ppm	0,20	0,0	1,0	0,21	0,0	1,0

	<i>Sacch. cerevisiae</i> FTPT 0472			<i>Sacch. cerevisiae</i> CBS 1171		
	μ	L	R	μ	L	R
0 ppm	0,47	0,0	1,0	0,32	0,54	0,85
20 ppm	0,40	0,0	1,0	0,32	0,39	0,86
40 ppm	0,37	0,0	1,0	0,33	0,0	1,0
60 ppm	0,36	0,0	1,0	0,30	0,24	0,93
80 ppm	0,36	0,0	1,0	0,24	-	-
100 ppm	0,32	0,70	0,79	-	-	-

continua

Tabela 9. continuação

CTAB	<i>Alcaligenes faecalis</i>		
	μ	L	R
0 ppm	0,47	0,04	0,97
100 ppm	0,48	0,0	1,0
150 ppm	0,41	0,46	0,84
200 ppm	0,38	0,0	1,0
250 ppm	0,32	0,0	1,0
300 ppm	0,29	0,0	1,0
350 ppm	0,28	0,48	0,88

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Pseudomonas cepacia</i>		
	μ	L	R	μ	L	R
0 ppm	1,05	0,0	1,0	0,60	0,67	0,66
500 ppm	0,76	0,03	0,97	0,65	0,62	0,67
1500 ppm	0,82	0,31	0,77	0,66	0,80	0,59

	<i>Pseudomonas acidovorans</i>		
	μ	L	R
0 ppm	0,54	0,48	0,77
50 ppm	0,53	0,15	0,92
100 ppm	0,11	0,73	0,8

	<i>Pseudomonas mendocina</i>		
	μ	L	R
0 ppm	0,89	0,12	0,90
200 ppm	0,74	0,59	0,65
400 ppm	0,72	1,83	0,27

μ -constante máxima de crescimento (h^{-1})
 L-latência (h)
 R-fator de latência (adimensional)
 (-)-não crescimento

Quanto aos dois representantes da família Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* e *Klebsiella terrigena* observamos comportamento semelhante frente ao CTAB, no que diz respeito ao crescimento, sendo que a *Klebsiella* apresentou maior sensibilidade em concentrações de CTAB superiores a 200 ppm (Figura 18, Tabela 9).

Concentrações abaixo de 50 ppm não interferiram no crescimento destas bactérias em meio de CANA 11.

No intervalo de concentração entre 0 e 150 ppm, o crescimento de *E. coli* apresentou-se afetado somente nos primeiros 90 minutos, o que acarretou as diferenças na velocidade máxima de crescimento. Após este período, o crescimento foi muito semelhante independente da concentração de CTAB, sendo que a população atingida na fase estacionária, com quaisquer das concentrações utilizadas, foi muito similar àquela observada na ausência do CTAB, o mesmo acontecendo com *Klebsiella terrigena* na presença de 50 e 100 ppm. Inibição mais drástica ocorreu somente em concentrações acima de 200 ppm. Portanto, a cápsula polissacarídica produzida por *Klebsiella terrigena* não a protege contra a ação do CTAB.

Verifica-se por estes resultados que não devem ser tomados como regra geral as afirmações da literatura, sobre a susceptibilidade dos microrganismos ao CTAB, que estaria relacionada com a divisão entre Gram-positivos e Gram-negativos, pois as células de *Acetobacter* sofreram inibição em concentrações aproximadamente 100 vezes menores do que os membros da família Enterobacteriaceae, enquanto os Gram-positivos *Lactobacillus* e *Leuconoctoc* apresentaram sensibilidade intermediária.

Acreditamos que a diferença na susceptibilidade esteja relacionada com a composição e permeabilidade do invólucro celular de cada microrganismo, ou ainda que o fato de *E. coli* e *Klebsiella* apresentarem metabolismo respiratório e

fermentativo, e *Acetobacter* apresentar metabolismo estritamente respiratório seja responsável pela diferença na susceptibilidade. As enzimas da respiração podem ser mais afetadas pelo CTAB do que as da fermentação. É possível que isto ocorra; todavia, *Alcaligenes faecalis*, cujo metabolismo é estritamente respiratório apresentou-se menos sensível do que as Enterobactérias.

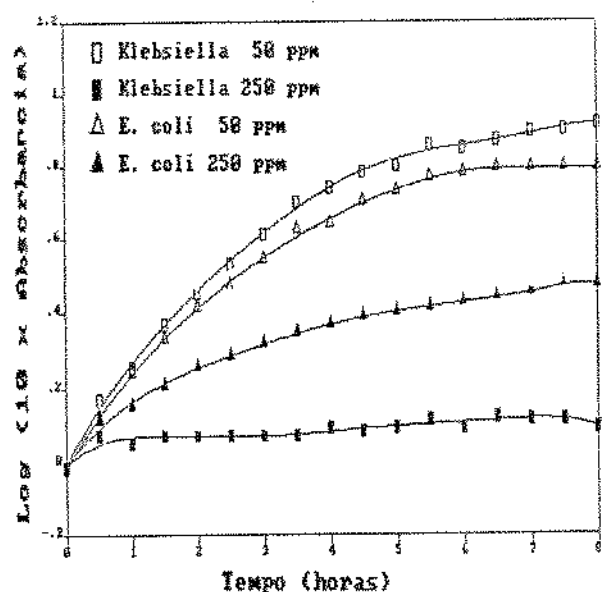


Fig.18. Curvas de crescimento de *Escherichia coli* e *Klebsiella terrigena* em CANA 11 com diferentes concentrações de CTAB, a 37° e 30°C, respectivamente, cultura estática.

O acréscimo de CTAB em concentrações acima da sua c.m.c. não aumenta a concentração da forma monomérica; porém, verificamos que, em concentrações acima de 150 ppm, o crescimento de *Escherichia coli* e *Klebsiella terrigena* sofre inibição crescente, o que nos leva a crer que as micelas também têm efeito na inibição do crescimento. Esta inibição tanto pode estar ocorrendo como uma ação direta das micelas no invólucro celular, como podemos inferir que estas podem estar complexando moléculas de caráter hidrofóbico como algumas vitaminas do

complexo B e aminoácidos, presentes no meio de cultura, causando inibição por exaustão desses nutrientes essenciais.

Com relação às *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 19) e *Ps. cepacia* (Tabela 9) observamos uma alta resistência ao CTAB, com resultados notáveis: *Pseudomonas cepacia* cresceu melhor na presença do que na ausência do CTAB, e *Pseudomonas aeruginosa* cresceu melhor na presença de 1.500 ppm de CTAB do que na presença de 500 ppm.

Esses resultados descartam a hipótese de que a inibição do crescimento possa ser decorrência da complexação de substâncias hidrofóbicas essenciais ao crescimento, uma vez, que, nessas concentrações muito maiores, o crescimento destas espécies de *Pseudomonas* não foi afetado.

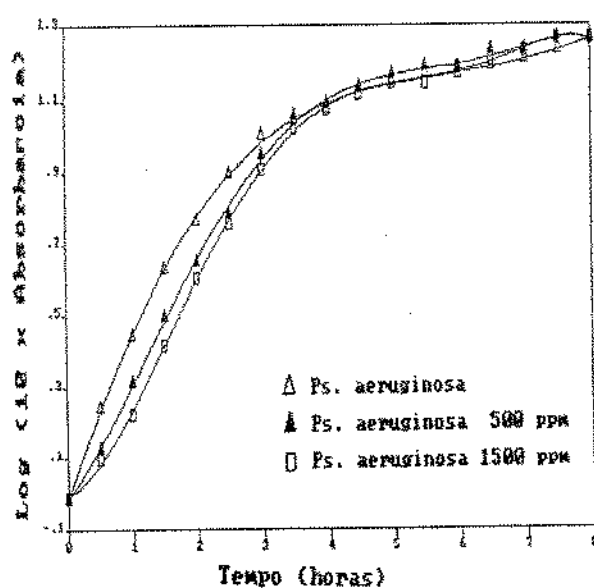


Fig. 19. Curvas de crescimento de *Ps. aeruginosa* em CANA 11 com CTAB, a 30°C, 100 rpm.

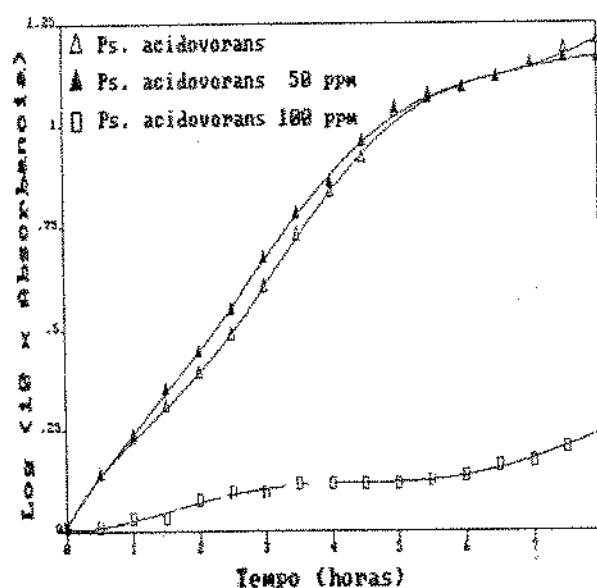


Fig. 20. Curvas de crescimento de *Ps. acidovorans* em CANA 11 com CTAB, a 30°C, 100 rpm.

Pseudomonas mendocina (Tabela 9) também apresentou resistência ao CTAB. O crescimento observado com 200 ppm foi

semelhante ao obtido com 400 ppm, com latência maior para este último; porém, sem variação na velocidade de crescimento. Em concentrações acima de 400 ppm as células aderiram à superfície do frasco, não sendo possível a determinação das curvas de crescimento.

Pseudomonas acidovorans (Figura 20), por outro lado, mostrou-se extremamente sensível ao CTAB. Em concentração de 100 ppm, o crescimento foi mínimo. Esses resultados indicam que as bactérias do gênero *Pseudomonas* constituem um grupo bastante heterogêneo, quanto à resistência ao CTAB.

Com relação à *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 21) a velocidade de crescimento sofreu alterações quando a concentração de CTAB variou entre 20 e 100 ppm, porém, apenas com 100 ppm foi observado período de latência (Tabela 9).

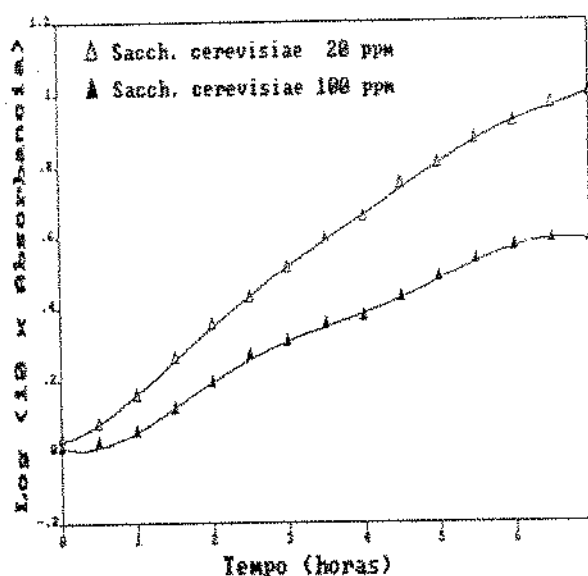


Fig. 21. Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em CANA 11 com diferentes concentrações de CTAB, a 30°C, cultura estática.

5.5. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE CTAB EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Através dos gráficos apresentados na Figura 22 pode-se observar uma grande diferença no efeito do CTAB sobre o crescimento dos microrganismos, em função do meio utilizado.

O efeito do CTAB sobre o crescimento de *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas acidovorans*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum* foi semelhante em Cana 11 e em MRS. A sensibilidade ao CTAB, entretanto, foi muito maior quando se utilizou o Caldo Nutriente.

A formulação do meio CANA 11 apresenta algumas semelhanças com o meio MRS: ambos são meios ricos, com alta concentração de proteína, embora o MRS apresente o dobro de proteína, em relação ao meio de CANA 11, e apresente diversos sais. O Caldo nutriente, por outro lado, é um meio de complexidade muito menor, além de não conter açúcar em sua composição; a adição de 2% de glicose, entretanto, não alterou o valor da concentração mínima de CTAB necessária para inibir o crescimento.

No caso de *Saccharomyces cerevisiae*, foram testados três meios: CANA 11, MRS e YEPD. A concentração inibitória mínima de CTAB em CANA 11 foi bem maior do que em MRS, porém, deve-se considerar que, na ausência de CTAB, o crescimento foi muito melhor em CANA 11 do que em MRS (Figura 23). O YEPD apresenta uma formulação bem mais simples do que o MRS e CANA 11, porém, a concentração de proteína é a mesma do MRS.

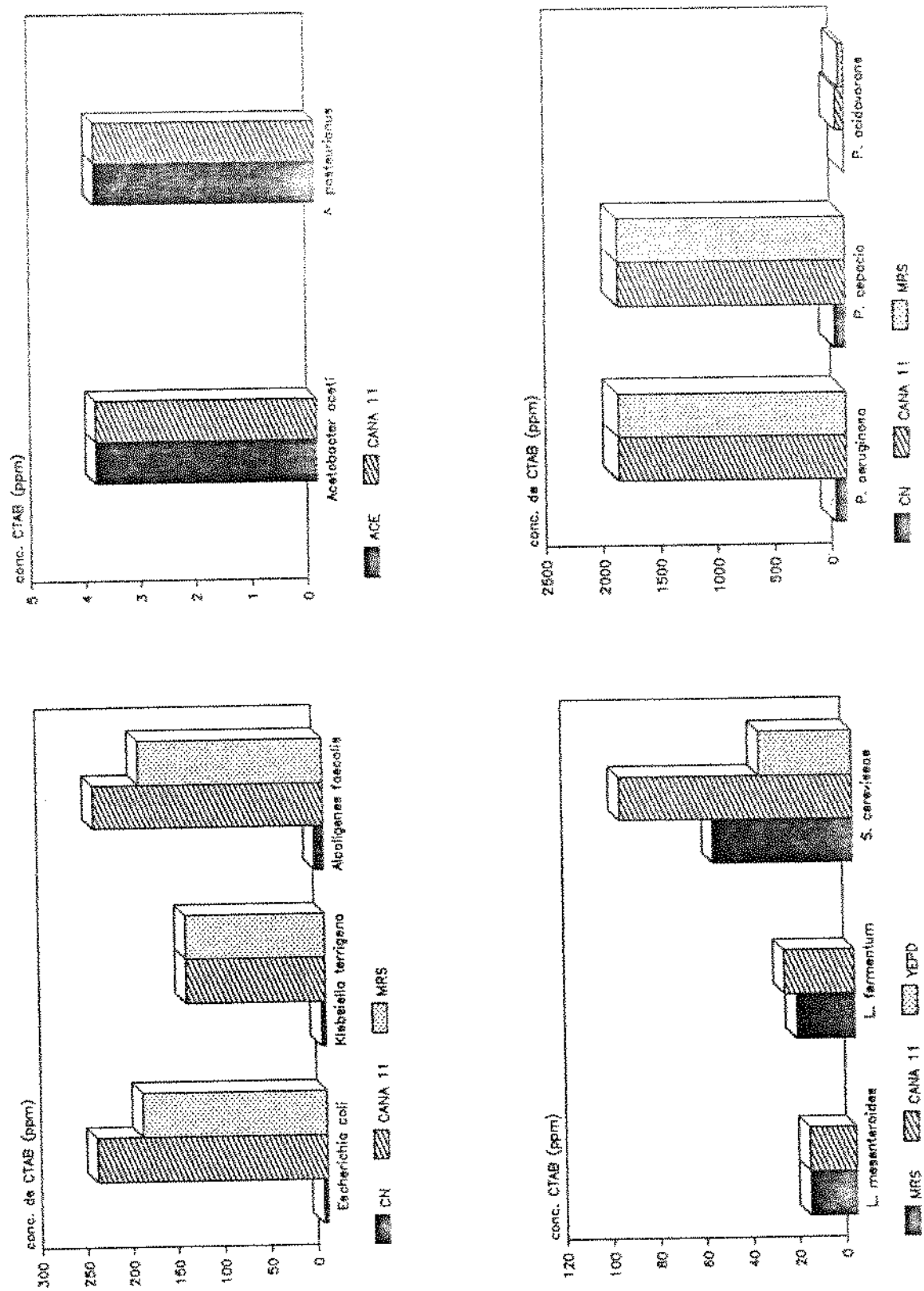


Fig. 22. Concentração mínima inibitória de CTAB em diferentes meios de cultura.

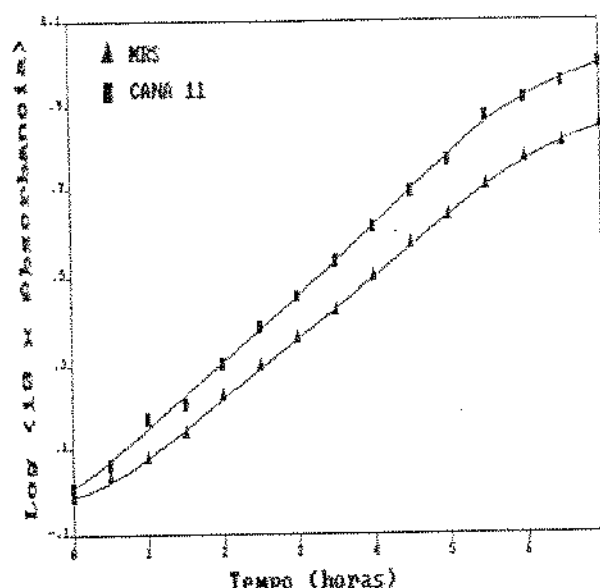
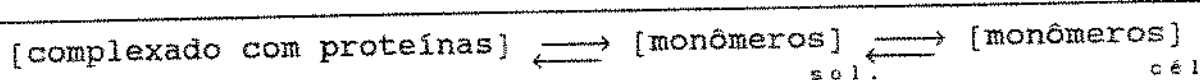


Fig. 23. Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em MRS e em CANA 11, a 30°C.

Acetobacter aceti e *A. pasteurianus* apresentaram comportamento idêntico em CANA 11 e em ACE, quanto à concentração inibitória mínima de CTAB; embora o ACE seja um meio muito mais rico em triptona.

Verificamos que existe uma interação do CTAB com os componentes do meio ACE, em concentração de 17 ppm e que a c.m.c. no mesmo foi de 166 ppm. No caso de CANA 11 essa primeira interação ocorreu com 0,5 ppm e a c.m.c. foi de 42 ppm.

As espécies de *Acetobacter* foram inibidas em concentrações abaixo de 17 ppm, mostrando que, apesar de haver moléculas comprometidas, pode também haver monômeros em solução, ou que as moléculas complexadas, na presença de células, deixam o complexo para se transferirem para a superfície da célula.



No meio de Caldo Nutriente, verificamos que concentrações de CTAB abaixo da concentração em que ocorre a interação com proteínas do meio, inibiram o crescimento das bactérias Gram-negativas. Entretanto, o mesmo não acontece com o meio CANA 11, onde as concentrações necessárias para a inibição do crescimento foram muito maiores do que a c.m.c. do CTAB neste meio.

As células de *Saccharomyces cerevisiae* foram inibidas com 100 ppm de CTAB em CANA 11 e com 40 ppm em YEPD. A c.m.c. do CTAB nestes meios é de 42 e 18 ppm, respectivamente, logo, a inibição ocorreu acima da c.m.c., nos dois casos.

As observações acima indicam que a c.m.c. do CTAB nos meio de cultura, obtido na ausência de células, tem pouco significado para a interpretação dos fenômenos que afetam o crescimento celular, se tomada como caráter isolado, uma vez que não explica as diferenças observadas nos diferentes meios de cultura.

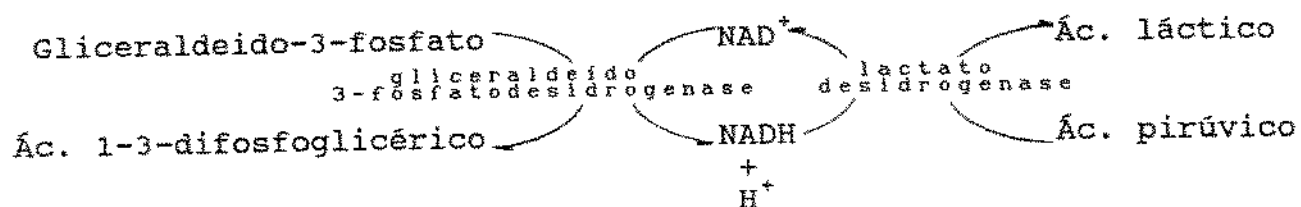
Na realidade cada meio de cultura proporciona condições diferenciadas para o crescimento, isto é, as células apresentam características fisiológicas e estruturais diferentes em diferentes meios, sendo estas características o que determinam a capacidade de crescer ou não diante do CTAB, independente se o agente encontra-se na forma micelar ou monomérica.

Assim, acreditamos que embora o meio de cultura não seja responsável direto pela proteção das células contra a ação de um agente bactericida, mas pode oferecer condições para que as células desenvolvam formas de se proteger.

5.6. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

5.6.1. LACTATO DESIDROGENASE.

O piruvato representa um ponto de junção importante no catabolismo dos carboidratos. Em condições de anaerobiose, o NADH gerado pela glicólise não pode ser diretamente reoxidado pelo O_2 , requerendo a ação do piruvato, que oxida o NADH ao converter-se em lactato. Nestas condições os elétrons, originalmente doados ao NAD^+ pelo gliceraldeído-3-fosfato, são transportados até o piruvato na forma de NADH. A redução do piruvato é catalisada pela lactato desidrogenase, que participa da formação do isômero L do lactato, de acordo com a seguinte reação:



5.6.1.1. Efeito do CTAB sobre a lactato desidrogenase de células intactas.

Na avaliação do efeito do CTAB sobre a enzima lactato desidrogenase de células intactas, cujos resultados estão apresentados na Tabela 10, observamos que 6 ppm de CTAB inibe completamente a atividade de lactato desidrogenase das bactérias, com exceção de *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cepacia* e *Ps. mendocina*, não inibidas nem mesmo na presença de 10 ppm.

TABELA 10. Tempo (em minutos) necessário para a redução do azul de metileno pela lactato desidrogenase de células intactas, em diferentes concentrações de CTAB.

Microrganismo	CTAB (ppm)				
	controle	0	3	6	10
<i>Escherichia coli</i>	-	10	30	-	-
<i>Klebsiella terrigena</i>	-	10	40	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	40	120	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	40	40	40	50
<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	40	40	40	50
<i>Pseudomonas cepacia</i>	-	40	50	50	60
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	-	30	40	-	-
<i>Acetobacter aceti</i>	-	40	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	-	40	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	10	150	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	10	120	-	-

(-) não redução do azul de metileno em 8 horas.

5.6.1.2. Efeito do CTAB sobre a lactato desidrogenase de células lisadas.

A enzima lactato desidrogenase no interior de células intactas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cepacia* e *Ps. mendocina* apresentou-se resistente à ação do CTAB (Tabela 10). Para a inibição da atividade dessa enzima, é necessário que as moléculas de CTAB atravessem a membrana da célula e atuem no seu interior. Para se verificar se a resistência à inibição é uma característica da própria enzima dessas bactérias, ou se estava relacionada à não permeabilidade da célula ao CTAB, foi realizada a determinação da atividade das enzimas livres. Observou-se que, com células lisadas, a sensibilidade da enzima lactato desidrogenase de diferentes microrganismos mostrou-se muito semelhante, independente do microrganismo testado (Tabela 11).

Tabela 11. Tempo (em minutos) necessário para a redução do azul de metileno pela lactato desidrogenase de células lisadas em diferentes concentrações de CTAB.

Microrganismo	controle	CTAB (ppm)			
		0	3	6	10
<i>Escherichia coli</i>	-	20	30	-	-
<i>Klebsiella terrigena</i>	-	20	40	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	30	40	-	-
<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	30	45	-	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	-	30	35	-	-
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	-	35	50	-	-

(-) não redução do azul de metileno em 6 horas.

Este resultado vem demonstrar que as células de *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. mendocina* e *Ps. cepacia* apresentam resistência à permeabilidade ao CTAB.

5.6.2. ÁLCOOL DESIDROGENASE.

Na reação final da fermentação alcoólica, o acetaldeído é reduzido a etanol pelo NADH, na presença de álcool desidrogenase.

5.6.2.1. Efeito do CTAB sobre a álcool desidrogenase de células intactas.

Na avaliação do efeito do CTAB sobre a álcool desidrogenase, cujos resultados estão apresentados na Tabela 12,

observou-se que a enzima álcool desidrogenase das bactérias foi inibida com 6 ppm de CTAB, enquanto que, no caso das leveduras, 10 ppm causaram um retardamento de 7 a 8 horas na velocidade de redução.

TABELA 12. Tempo (em minutos) necessário para redução do azul de metileno pela álcool desidrogenase de células intactas, em diferentes concentrações de CTAB.

microrganismo	controle	CTAB (ppm)			
		0	1	2	3
<i>Acetobacter aceti</i>	-	30	120	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	-	30	180	-	-
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	-	30	120	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	20	150	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	20	150	-	-
<i>Sacch. cerevisiae</i> FTPT 0472	-	10	10	60	420
<i>Sacch. cerevisiae</i> CBS 1171	-	20	20	60	480
<i>Sacch. cerevisiae</i> ATCC	-	20	20	90	480

(-) não redução do azul de metileno em 8 horas.

As concentrações necessárias para inibir a atividade das enzimas foram muito menores do que as concentrações requeridas para a inibição do crescimento.

A transformação da glicose a CO_2 e H_2O pelos organismos vivos usualmente envolve a formação de ácido lático como um produto intermediário. Em muitas bactérias, o composto chave produzido pela glicólise é o ácido pirúvico, que pode ser reduzido a ácido lático, seguir outras rotas fermentativas ou ainda ser completamente oxidado a CO_2 e H_2O .

O ácido pirúvico, produto final da glicólise, posteriormente vai dar origem à acetil-CoA, forma na qual entra

no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, durante o metabolismo de microrganismos não fermentativos. As enzimas lactato desidrogenase e álcool desidrogenase não fazem parte do metabolismo da glicose; porém, ainda assim observamos que o CTAB, em concentrações extremamente baixas, foi capaz de inibir não só essas duas enzimas, como também inibiu o crescimento da maioria das bactérias estudadas. Esses fatos parecem indicar que, assim como a álcool desidrogenase e a lactato desidrogenase são sensíveis ao CTAB, outras enzimas essenciais ao metabolismo também devem estar sendo inibidas.

5.7. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE METABÓLICA.

5.7.1. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE METABÓLICA DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Efetuando-se medidas de absorção de O_2 e da produção de CO_2 , conforme descrito no item 4.5. em células de leveduras na ausência de fonte exógena de glicose, observamos metabolismo respiratório, com coeficiente respiratório (QR) menor que 1. Neste caso a absorção de oxigênio aos 15 minutos foi 80% do valor da absorção quando a glicose está presente (Tabela 13).

As leveduras anaeróbias facultativas têm habilidade de crescer tanto na presença de oxigênio, como na completa ausência deste. Se disponível, o oxigênio é sempre utilizado, uma vez que resulta na produção de uma maior quantidade de energia na forma de ATP, durante a oxidação aeróbica da glicose (ROSE, 1987).

A degradação da glicose por *Saccharomyces cerevisiae* ocorre através de diferentes rotas, principalmente a

respiratória, a fermentativa e a respiro-fermentativa. O tipo de metabolismo depende das condições de cultivo (FIECHTER et al., 1981).

A mudança do metabolismo respiratório para metabolismo respiro-fermentativo é controlada pela capacidade respiratória das células. O metabolismo respiro-fermentativo ocorre, primeiramente, em consequência de um excesso, no nível de piruvato, quando a rota respiratória está saturada. O metabolismo exclusivamente fermentativo, por outro lado, só ocorre em condições de anaerobiose estrita (KÄPPELI, 1986).

TABELA 13. Produção de CO_2 e consumo de O_2 por *Saccharomyces cerevisiae* em presença de glicose.

Tempo (min.)	Produção de CO_2 (μl) Consumo de O_2 (μl)				
	CTAB (ppm)				
	controle	0	3	6	10
15	1,8	29,7	29,1	25,8	9,5
	4,2	5,3	2,4	2,4	1,2
60	6,2	164,1	164,3	117,3	42,9
	16,8	26,0	16,0	10,7	9,2
120	13,1	421,4	434,5	230,4	85,7
	34,7	70,8	62,0	22,5	28,9
180	14,5	561,4	595,3	282,8	98,0
	37,7	94,4	87,4	28,5	34,6
240	15,9	747,0	815,0	356,7	106,8
	41,3	129,8	122,9	37,4	42,7
300	16,6	928,5	1034,7	434,9	119,7
	43,1	167,0	159,5	48,0	49,6
360	18,0	1108,5	1239,2	511,7	131,9
	44,9	204,8	192,6	56,9	56,0
420	19,4	1275,5	1424,9	576,6	141,5
	47,3	224,2	222,7	67,6	61,8
450	19,4	1371,4	1521,9	620,6	145,5
	47,3	243,7	239,9	73,6	64,7

As células de *Sacch. cerevisiae* na presença de glicose, apresentaram metabolismo respiro-fermentativo, conforme evidenciado na Tabela 13. A produção de CO_2 foi muito maior que a absorção de O_2 . A velocidade de absorção de O_2 e produção de CO_2 manteve-se constante durante a fase de estabilização.

Em estudos regulatórios, é de grande importância conhecer a razão precisa para uma determinada reação celular. A questão de saber se um determinado tratamento está acarretando uma restrição externa à célula ou está causando limitações intrínsecas, relacionadas com o mecanismo de regulação metabólica, é de significância considerável.

Ao se avaliar a inibição de absorção de O_2 e produção de CO_2 em função de um determinado tratamento com CTAB, deve-se ter em mente que um determinado agente tanto pode interferir no metabolismo propriamente dito, isto é, na degradação da glicose a CO_2 e H_2O , através da ação sobre enzimas e coenzimas, como também pode estar interferindo no transporte do substrato para o interior da célula, ou ainda, pode estar agindo por destruição de determinadas estruturas celulares.

No tratamento realizado com glicose + 3 ppm de CTAB, verificou-se, no início, uma inibição de 55% na absorção de O_2 , pelas células de *Sacch. cerevisiae*; porém, esta inibição teve uma rápida queda e estabilizou-se na faixa de 5-10% após 135 minutos. Paralelamente, no início observou-se uma inibição de 1,8% na produção de CO_2 ; contudo, aos 60 minutos de experimento, começou a ocorrer um estímulo na produção de CO_2 . Como resultado final, observamos que as células, na presença de glicose + 3 ppm de CTAB, produziram maior quantidade de CO_2 do que as células na ausência de CTAB.

Nesse tratamento a taxa de degradação de glicose a ácido pirúvico foi muito semelhante a das células não tratadas, uma vez que pequenos decréscimos na absorção de O_2 acarretaram

também pequenos acréscimos na produção de CO_2 . Foi nessa etapa do metabolismo, entretanto, que ocorreram alterações, pois a rota do ácido pirúvico para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos foi levemente inibida, havendo portanto, um maior desvio para a produção de etanol. Cabe lembrar que as células não tratadas encontravam-se sob metabolismo respiro-fermentativo, entretanto com 3 ppm de CTAB a fermentação foi mais estimulada. Não se pode descartar, por outro lado a possibilidade de que, nesta concentração, o CTAB tenha estimulado a enzima álcool desidrogenase, sendo a menor absorção de O_2 uma consequência desse fato.

A presença de 6 ppm de CTAB causou uma inibição de 70% na absorção de O_2 e 50% na produção de CO_2 . Aumentando-se a concentração para 10 ppm, a inibição na absorção de O_2 foi semelhante ao tratamento com 6 ppm, porém houve um aumento significativo na inibição da produção de CO_2 , que atingiu 90%, ao final de 450 minutos.

Pode-se verificar, nos gráficos de inibição (Figura 24), que independente da concentração (6 ppm e 10 ppm), houve uma tendência de estabilização na taxa de absorção de O_2 , em torno de 70%, a partir de 135 minutos. A produção de CO_2 não seguiu este perfil: a inibição aumentou com o tempo e com a concentração de CTAB.

As concentrações de 6 ppm e 10 ppm provocaram uma drástica redução no metabolismo da glicose. Não somente a respiração e a fermentação foram afetadas, como também a glicólise foi comprometida. Ou talvez tenha ocorrido uma inibição no nível de transporte da glicose para o interior da célula. É possível ainda que os dois fatos tenham ocorrido simultaneamente.

Os íons uranila inibem o transporte de açúcar (ROTHSTEIN, 1965), urea, glicerol, vitamina e aminoácidos (CIRILO & WILKINS, 1964; MAXWELL et al., 1971) em *Saccharomyces cerevisiae*. O cátion não penetra na membrana plasmática, mas

liga-se aos grupos fosfato e carboxílico no lado externo da membrana. GILBY & FEW (1960) demonstraram que o tratamento com uranila protege os protoplastos da lise causado por detergentes catiônicos; logo é válido supor que o CTAB deve ter os mesmos sítios de ligação da uranila na inibição do transporte de glicose.

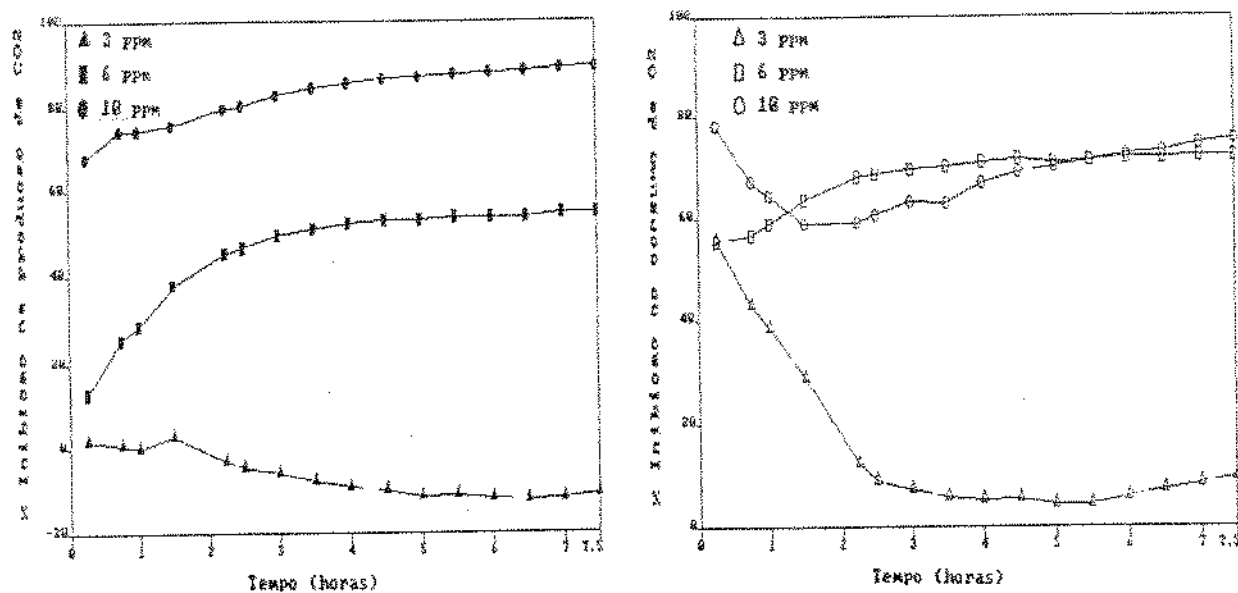


Fig. 24. Inibição da produção CO_2 e do consumo de O_2 por *Saccharomyces cerevisiae* em presença de glicose e CTAB.

O experimento realizado com as células de *Sacch. cerevisiae* (sem fonte de glicose exógena) mostrou que a absorção de O_2 foi sempre menor na ausência da glicose do que na sua presença.

Durante os primeiros 60 minutos de experimento realizado com 3 ppm de CTAB, a absorção de O_2 foi maior nas células sem glicose do que nas células com glicose + 3 ppm de CTAB. Esse fato vem demonstrar que o CTAB penetrou nas células, atingindo a mitocôndria e interferindo no metabolismo

respiratório, independente de atuar ou não no lado externo da célula. Nos tratamentos com 6 ppm e 10 ppm de CTAB, a absorção de O_2 também foi menor que a observada com as células sem glicose durante 240 e 300 minutos, respectivamente.

Com respeito à produção de CO_2 , verificou-se que, sem fonte de carbono, as células produzem quantidades muito menores do que sob quaisquer outros tratamentos.

Através do gráfico da Figura 25 pode-se verificar que a partir de 135 minutos, o Quociente Respiratório (QR) apresentou uma nítida tendência para a estabilização, em patamares muito inferiores aos obtidos nos momentos iniciais do experimento. Este fato demonstra que a respiração foi mais sensível ao contato inicial com o agente, embora esta ocorra na mitocôndria, local menos acessível aos agentes externos que a enzima álcool desidrogenase, no citosol.

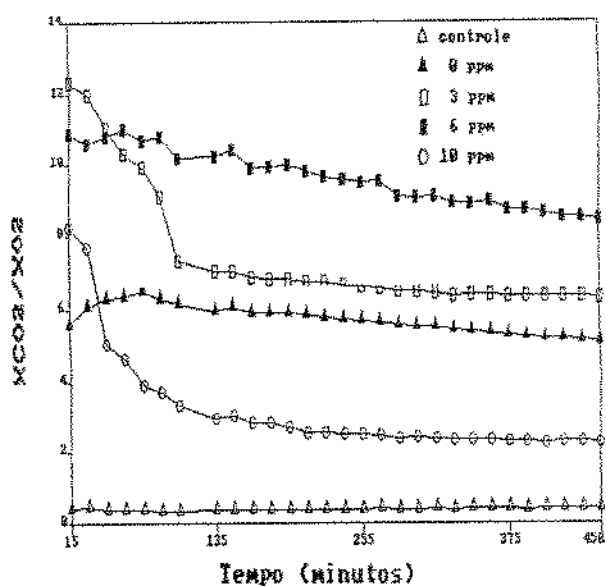


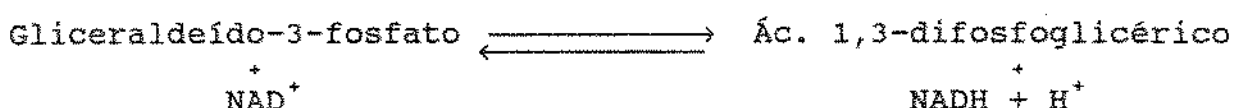
Fig. 25. Quociente respiratório de *Saccharomyces cerevisiae* em presença de glicose e CTAB.

Após a estabilização, o QR observado na presença de 3 ppm foi maior do que o obtido com células sem tratamento. Na presença de 6 ppm de CTAB foi maior do que com 10 ppm, demonstrando que a respiração foi mais afetada que a fermentação, na presença de 3 e 6 ppm de CTAB enquanto que, com 10 ppm, a fermentação passou a sofrer inibição mais acentuada.

Na reação final da fermentação alcoólica, o acetaldeído é reduzido a etanol pelo NADH, na presença de álcool desidrogenase.



e a reoxidação do NADH é compensada pela produção de NADH na reação:



Assim, numa situação em que haja a inibição da álcool desidrogenase, não haverá reoxidação do NADH. Na ausência do NAD⁺ oxidado não haverá oxidação do gliceraldeído-3-fosfato e, conseqüentemente, a glicólise estará comprometida.

Sob o ponto de vista da respiração, para que o ciclo dos ácidos tricarboxílicos funcione, é necessário um fornecimento contínuo de NAD⁺ oxidado. Esse afluxo é garantido pelas enzimas da cadeia de transporte de elétrons que efetuam esta atividade concomitantemente com a fosforilação oxidativa. O CTAB, em qualquer concentração inibe a absorção de O₂, comprometendo o transporte de elétrons e, conseqüentemente, o afluxo de NAD⁺ oxidado.

O controle da respiração, entretanto, está sujeito a um controle muito mais elaborado. Se o NADH não está sendo oxidado, este se acumula na célula. Esse acúmulo causa inibição

do complexo piruvato desidrogenase que garante o suprimento de acetil-CoA para a sua entrada no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Esse fato pode explicar o comportamento das células na presença de 3 ppm de CTAB, estimulando a fermentação em detrimento da respiração.

A análise do efeito de CTAB na atividade de álcool desidrogenase revelou que, na concentração de 3 ppm, não houve alteração na atividade da enzima em *Saccharomyces cerevisiae*. Cabe lembrar que pequenos estímulos ou inibições não estão ao alcance de detecção por esse método. A concentração de 10 ppm, por outro lado, retardou por várias horas a reação.

5.7.2. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE METABÓLICA DE *Acetobacter aceti*

Os membros do gênero *Acetobacter* são aeróbios estritos e metabolizam os açúcares através do ciclo das pentoses fosfato. O metabolismo do piruvato não segue a forma usual; enquanto na maioria dos aeróbios o piruvato é oxidado a acetil-CoA e CO₂, as bactérias do ácido acético o descarboxila a acetaldeído, que é então oxidado a ácido acético pelo NAD⁺, na presença da aldeído desidrogenase.



Como o acetaldeído é também o primeiro intermediário do metabolismo do etanol, este é o ponto de convergência entre os substratos metabolizados através do piruvato e da oxidação do etanol.

Ao realizar medidas de absorção de O₂ e produção de CO₂ (Tabela 14), verificou-se que as células de *Acetobacter*, na

ausência de substrato exógeno apresentaram metabolismo respiratório, isto é, completa oxidação do substrato endógeno a CO_2 e H_2O .

TABELA 14. Produção de CO_2 e consumo de O_2 por *Acetobacter aceti* em presença de glicose.

Tempo (min.)	Produção de CO_2 (μl) Consumo de O_2 (μl)				
			CTAB (ppm)		
	controle	0	2	3	
15	0,7	4,7	2,1	1,4	
	0,6	2,4	1,2	0,6	
60	0,8	11,8	7,0	4,1	
	3,0	9,4	5,3	2,9	
120	2,3	18,1	9,7	6,1	
	6,6	14,2	8,3	5,2	
180	5,2	24,3	13,2	8,2	
	11,4	19,5	13,0	8,1	
240	5,2	29,9	16,0	8,2	
	13,2	23,6	16,0	11,0	
300	6,0	35,5	20,1	14,3	
	15,0	27,7	19,6	14,5	
360	6,7	43,1	25,0	16,3	
	16,3	33,6	24,3	15,6	
420	6,7	48,0	27,8	17,0	
	16,9	37,8	27,3	16,8	

Na presença de glicose, o Quociente Respiratório aumentou, mostrando que a oxidação do substrato é incompleta. A oxidação do acetato no metabolismo da glicose é governado pela necessidade de produção de ATP, o que não ocorre com o metabolismo do etanol. WILLIAMSON et al. (1969), mostraram que o NADH formado no curso da oxidação do etanol inibe a atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, principalmente no nível da

citrato sintase e da isocitrato desidrogenase. As enzimas do ciclo glicoxílico e ciclo dos ácidos tricarboxílicos têm atividade aumentada quando o etanol é substituído pelo acetato no meio de cultura (DIVIES, 1972).

Com a adição de 2 ppm de CTAB observou-se uma inibição inicial de 50% na absorção de O_2 , valor que decresceu a 30% ao longo do experimento, enquanto a produção de CO_2 foi inibida em 40-50% (Figura 26).

Com 3 ppm de CTAB a inibição na absorção de O_2 foi de 75,5%, valor que diminuiu para 50% ao longo do experimento. No caso de CO_2 a inibição mostrou-se mais constante, entre 70 e 60%.

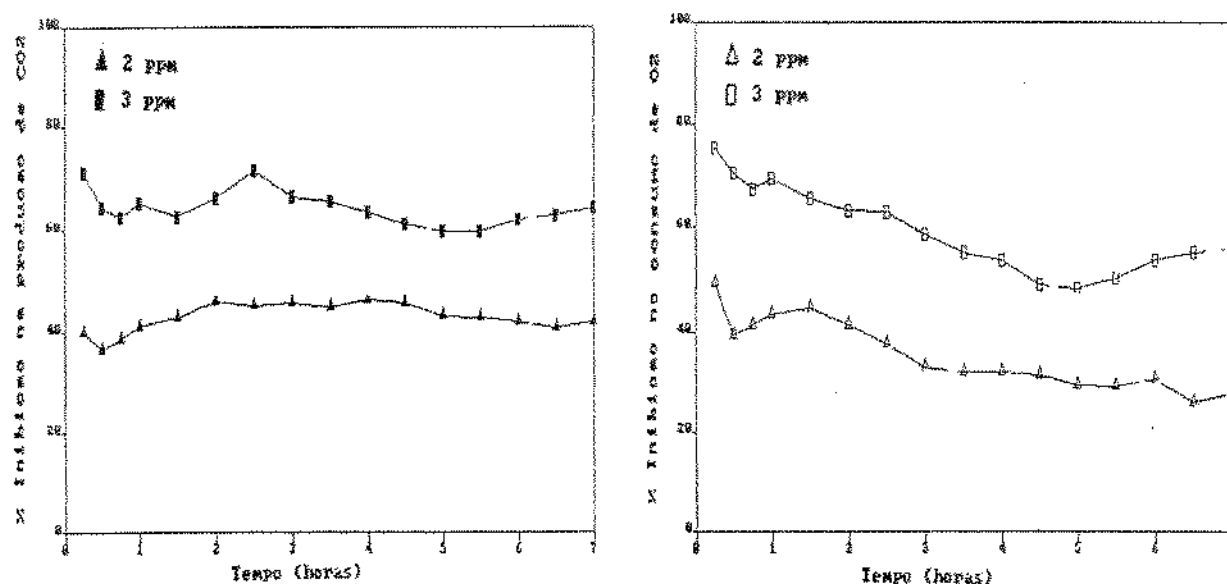


Fig. 26. Inibição da produção de CO_2 e do consumo de O_2 por *Acetobacter aceti* em presença de glicose e CTAB.

Assim, os resultados indicam que as células de *A. aceti*, tratadas com CTAB nas concentrações de 2 e 3 ppm, têm a respiração inibida; com redução na atividade de transporte de elétrons. Cabe destacar que, nas células tratadas com 3 ppm de

CTAB a absorção de O_2 mostrou-se sempre menor do que a observada em células sem glicose exógena, portanto nesta concentração de CTAB ocorre completa inibição da oxidação da glicose a gluconato.

Tanto *Acetobacter aceti* como *Acetobacter pasteurianus* tiveram inibição completa da enzima lactato desidrogenase com 3, 6 e 10 ppm de CTAB. A enzima álcool desidrogenase foi parcialmente inibida com 3 ppm e completamente inibida com 6 e 10 ppm de CTAB.

5.7.3. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE METABÓLICA DE *Leuconostoc mesenteroides*

Os membros do gênero *Leuconostoc* tem a capacidade de utilizar a glicose anaerobicamente produzindo ácido láctico, etanol e CO_2 . Algumas linhagens apresentam um mecanismo oxidativo produzindo ácido láctico, ácido acético e CO_2 .

Os resultados de consumo de O_2 e produção de CO_2 na presença de glicose e diferentes concentrações de CTAB encontram-se na Tabela 15.

Nos experimentos realizados com *Leuconostoc mesenteroides*, observamos que não houve consumo de O_2 e produção de CO_2 , em células sem fonte de glicose exógena.

Na presença de 1 ppm de CTAB, observou-se uma inibição inicial de 27% na absorção de O_2 , decrescendo e estabilizando em 15% no final do experimento. A produção de CO_2 apresentou uma inibição de 55% no início, porém chegando a 0,64% ao final (Figura 27).

Aumentando a concentração de CTAB para 2 ppm o perfil de inibição foi o mesmo observado com 1 ppm iniciando com valores altos e diminuindo gradativamente.

TABELA 15. Produção de CO_2 e consumo de O_2 por *Leuconostoc mesenteroides* em presença de glicose.

Tempo (min.)	Produção de CO_2 (μl) Consumo de O_2 (μl)			
	CTAB (ppm)			
	0	1	2	3
15	6,2	2,8	2,8	3,4
	6,5	4,7	3,6	5,2
30	15,3	8,3	6,9	8,1
	14,8	10,6	7,1	11,1
90	70,0	52,7	39,7	34,6
	49,0	39,6	23,7	32,3
150	139,7	120,6	90,6	51,6
	82,0	69,1	40,9	42,1
210	212,2	190,6	142,9	71,4
	105,0	90,4	54,0	46,2
270	279,9	270,3	200,1	79,5
	122,2	109,9	68,2	48,5
330	328,8	322,3	242,6	83,6
	134,0	118,2	85,4	52,5
390	350,9	350,7	268,3	87,7
	139,3	124,1	99,6	54,8
450	359,9	357,6	286,4	89,7
	144,6	126,4	113,9	57,2

Com 3 ppm de CTAB a inibição da absorção de O_2 iniciou-se com 20% e atingiu 60% ao final de 420 minutos. A produção de CO_2 apresentou inibição inicial de 45% e atingiu 75% no final do experimento.

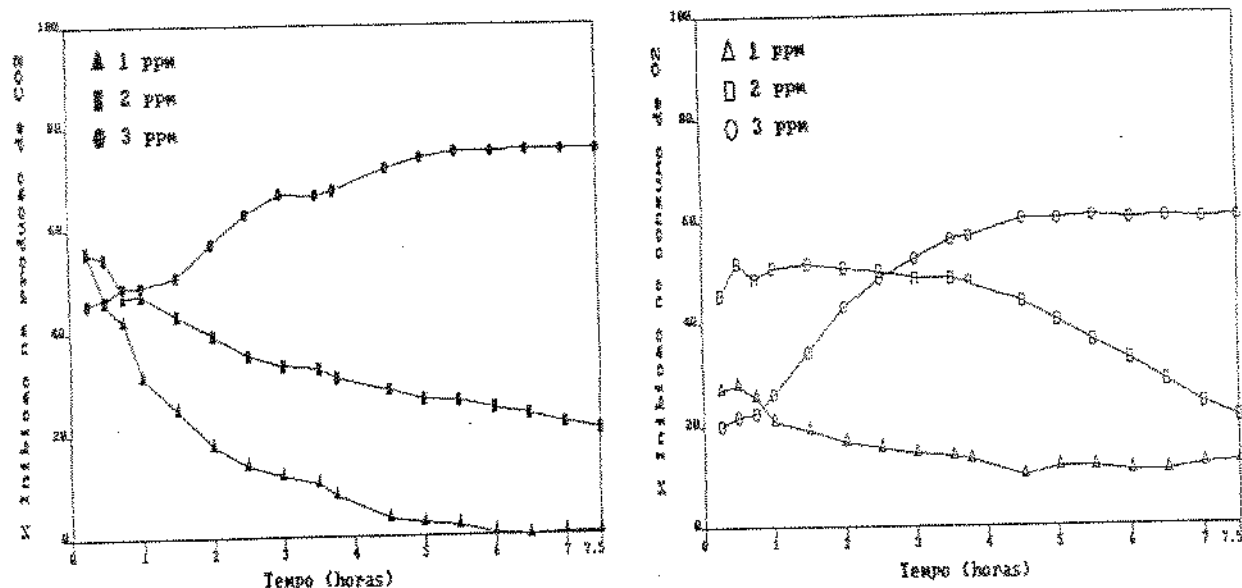


Fig. 27. Inibição da produção de CO₂ e do consumo de O₂ por *Leuconostoc mesenteroides* em presença de glicose e CTAB.

5.7.4. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE METABÓLICA DE *Escherichia coli* E *Klebsiella terrigena*.

Escherichia coli e *Klebsiella terrigena* fazem parte da família Enterobacteriaceae, são anaeróbias facultativas, apresentando metabolismo respiratório e fermentativo. O metabolismo fermentativo da *Escherichia coli* é do tipo ácido misto, enquanto *Klebsiella terrigena* apresenta fermentação butileno glicólica.

Os resultados dos experimentos conduzidos com estas espécies, encontram-se nas Tabelas 16 e 17.

TABELA 16. Produção de CO₂ e consumo de O₂ por *Escherichia coli* em presença de glicose.

Tempo (min.)	Produção de CO ₂ (μl) Consumo de O ₂ (μl)				
	CTAB (ppm)				
	controle	0	3	6	10
15	1,3	6,1	1,3	1,3	0,6
	2,9	11,5	8,6	7,5	1,1
60	4,0	37,2	13,9	4,5	1,9
	6,4	67,6	51,0	25,9	2,2
120	6,0	89,0	45,6	8,3	1,9
	9,9	152,9	119,9	51,2	2,8
180	7,3	141,4	80,6	19,5	2,6
	12,8	234,8	186,9	79,4	3,4
240	8,0	203,0	120,8	34,6	2,6
	13,4	320,2	253,5	110,0	3,9
300	8,0	261,3	155,8	51,1	2,6
	13,9	399,8	312,0	139,3	3,9
360	8,6	318,9	193,5	70,2	2,6
	15,1	477,1	376,0	169,3	3,9
420	9,3	375,8	223,9	87,3	2,6
	15,7	549,3	411,7	196,3	3,9
480	10,6	436,7	262,2	107,7	2,6
	17,4	626,6	462,8	225,7	3,9

Com 3 ppm de CTAB, a inibição inicial na absorção de O₂ foi de 40% para *Escherichia coli* e de 25% para *Klebsiella terrigena*. O efeito inicial na produção de CO₂ foi muito maior, atingindo 80% nos dois casos. Este valor, todavia, diminuiu para 40% ao final do experimento.

TABELA 17. Produção de CO_2 e Consumo de O_2 por *Klebsiella terrigena* em presença de glicose.

Tempo (min.)	Produção de CO_2 (μl) Consumo de O_2 (μl)			
	CTAB (ppm)			
	controle	0	3	6
15	0,7	6,3	1,4	0,7
	2,4	12,4	7,7	1,2
60	3,5	25,1	13,2	2,1
	7,2	45,4	31,9	3,0
120	5,6	53,7	31,2	4,8
	12,0	93,8	68,5	6,5
180	7,6	85,0	53,4	6,9
	16,8	144,0	105,6	8,9
240	8,3	129,5	82,5	7,6
	18,0	206,5	153,6	10,7
300	9,7	158,7	101,2	9,0
	19,2	246,7	184,3	13,0
360	10,4	203,2	123,4	9,7
	21,5	301,5	224,5	16,0
420	11,1	247,7	146,9	10,4
	22,1	359,4	267,6	19,0
480	11,1	297,0	166,3	11,7
	22,1	417,8	309,0	23,1

A inibição na absorção de O_2 causada por 6 ppm de CTAB foi de 45% no início, estabilizando-se em 65% para *Escherichia coli* e em 90% para *Klebsiella terrigena*. A inibição do CO_2 foi de 80 a 90% para ambas.

Com 10 ppm de CTAB *Escherichia coli* sofre uma inibição que chegou a 99,4%, tanto para O_2 como para CO_2 , sendo que qualquer troca de gases cessou com 240 minutos.

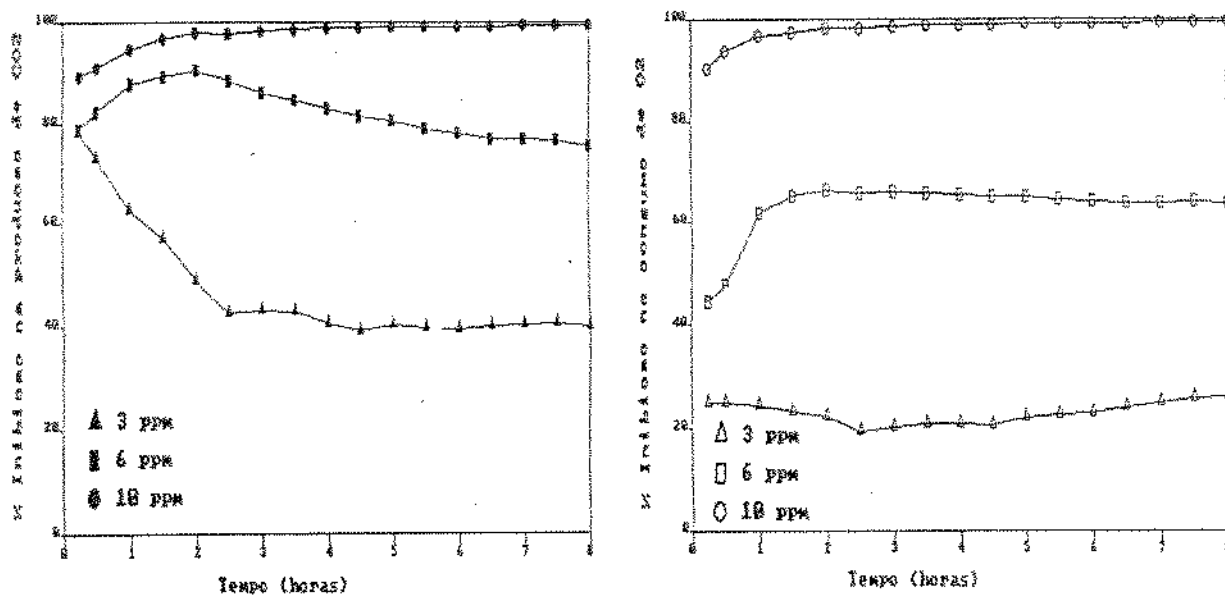


Fig. 28. Inibição da produção de CO₂ e do consumo de O₂ por *Escherichia coli* em presença de glicose e CTAB.

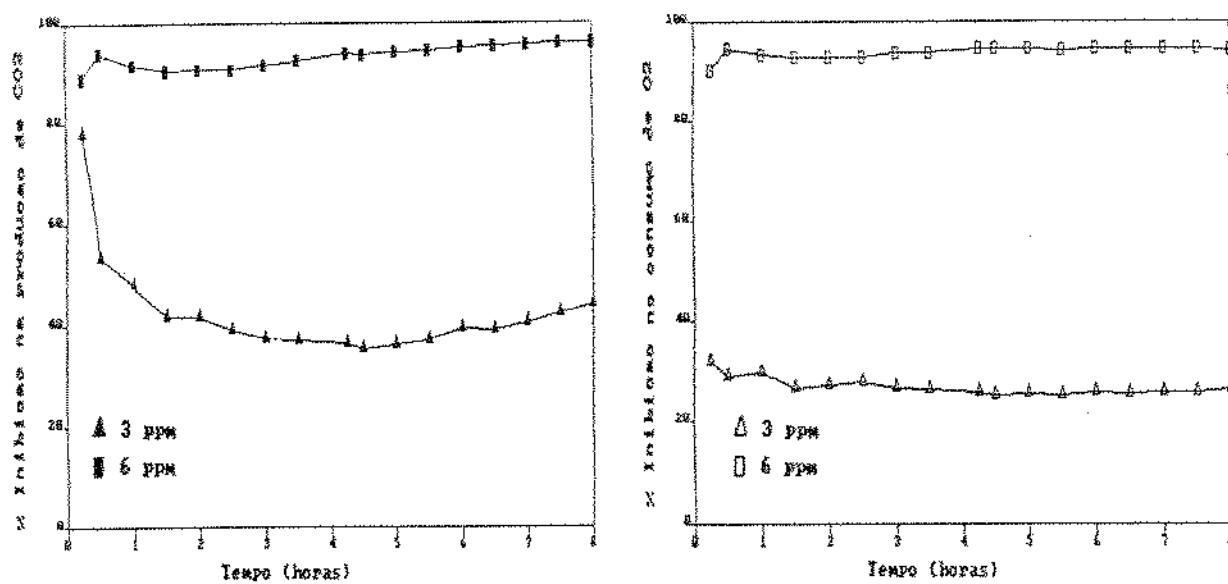


Fig. 29. Inibição da produção de CO₂ e do consumo de O₂ por *Klebsiella terrigena* em presença de glicose e CTAB.

5.7.5. EFEITO DO CTAB NA ATIVIDADE METABÓLICA DE *Pseudomonas aeruginosa*

Para a maioria das bactérias e leveduras estudadas, verificou-se que concentrações de 1 a 10 ppm de CTAB provocaram grandes alterações no metabolismo das células. No caso de *Pseudomonas aeruginosa*; entretanto, as alterações só foram observadas na presença de concentrações muito maiores de CTAB (Tabela 18).

TABELA 18. Produção de CO₂ e consumo de O₂ por *Pseudomonas aeruginosa* em presença de glicose.

Tempo (min.)	Produção de CO ₂ (μl) Consumo de O ₂ (μl)				
	CTAB (ppm)				
	controle	0	100	500	1.000
15	2,1	4,2	0,8	0,7	0,7
	6,6	12,4	3,0	2,4	2,3
60	5,5	14,1	4,2	2,8	0,7
	15,0	41,3	10,0	5,3	2,9
120	8,3	26,7	11,8	6,2	0,7
	21,5	77,3	20,1	8,3	4,0
180	9,7	42,1	25,6	10,4	2,0
	25,1	114,5	31,3	10,7	4,6
240	10,4	60,3	39,5	14,6	2,7
	27,5	152,8	44,3	14,2	5,2
300	11,1	79,1	56,1	16,0	2,7
	29,9	191,2	57,9	14,8	5,2
360	11,8	100,8	71,4	18,1	2,7
	30,5	228,4	69,7	16,0	5,2
420	13,8	122,4	92,2	22,2	2,7
	33,5	272,0	88,6	19,6	5,2
480	13,8	144,0	110,9	25,7	2,7
	34,7	312,8	105,2	22,5	5,2

Verificou-se que a presença de 100 ppm de CTAB provocou uma inibição inicial de 76% na absorção de O_2 , inibição esta que decresceu lentamente, atingindo 66% ao final de 480 minutos. A produção de CO_2 sofreu uma inibição inicial de 80% decrescendo para 23% no final do experimento.

Aumentando a concentração de CTAB para 500 ppm, a inibição do consumo de O_2 foi de 80 a 93%, enquanto que a inibição na produção de CO_2 equivalente a 80%. Na presença de 1.000 ppm de CTAB, a inibição atingiu 98%, tanto para o O_2 como para o CO_2 (Figura 30).

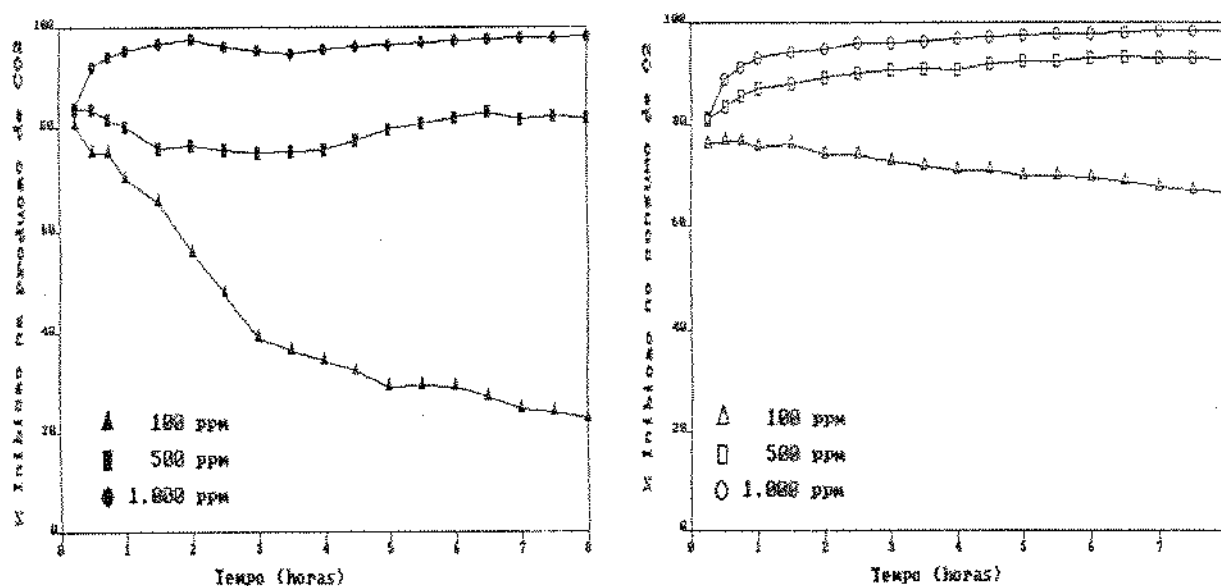


Fig. 30. Inibição da produção de CO_2 e do consumo de O_2 por *Pseudomonas aeruginosa* em presença de glicose e CTAB.

As *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. mendocina* e *Ps. cepacia* apresentaram alta resistência ao CTAB (Tabela 9).

A *Pseudomonas aeruginosa* apresenta resistência intrínseca a muitos antibióticos, fato hoje claramente

estabelecido como decorrência da baixa permeabilidade da membrana externa (ANGUS et al, 1982; NICAS & HANCOCK, 1983a; NICAS & HANCOCK, 1983b). Embora as maiores proteínas do tipo porinas de *Pseudomonas aeruginosa* formem canais substancialmente mais largos que os existentes nos organismos entéricos, sua atividade é substancialmente menor (HANCOCK et al., 1979; BENZ & HANCOCK, 1981; ANGUS et al, 1982).

As proteínas da membrana externa, Omp F e Omp C de *E. coli* apresentam diâmetros de 1,2 e 1,1 nm, respectivamente (NIKAIDO & ROSEMBERG, 1983), enquanto a porina de *Pseudomonas aeruginosa* PA 01 tem diâmetro aproximado de 2 nm (YOSHIMURA et al, 1983). *Pseudomonas aeruginosa*, entretanto, é intrinsecamente resistente a uma grande variedade de antibióticos, apresentando uma membrana externa com permeabilidade pelo menos 100 vezes menor que *E. coli*. Portanto, as evidências sugerem que a maioria dos canais de porina em *Pseudomonas aeruginosa* estão fechados (ANGUS et al., 1982; YOSHIMURA & NIKAIDO, 1982), razão da menor permeabilidade de sua membrana externa a tão ampla variedade de compostos inibidores.

A resistência de *Pseudomonas aeruginosa* ao CTAB, foi observada em concentrações capazes de provocar lise de protoplastos e alteração no metabolismo de outros microrganismos, o que parece indicar que a maior barreira contra a ação do agente encontra-se no mecanismo de transporte do agente através da membrana externa.

5.8. ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS.

5.8.1. AÇÃO DO CTAB EM PROTOPLASTOS.

O CTAB na concentração de 10 ppm, não foi capaz de provocar lise de protoplastos dos microrganismos testados (Tabela 19). Não descartamos, entretanto, a possibilidade de modificação da permeabilidade e desorganização da membrana celular, cuja integridade depende sobretudo do arranjo ordenado entre proteínas e lipídios. O fenômeno de desorganização da membrana, entretanto, não foi possível de ser verificada em microscopia de fase.

A concentração de 10 ppm não foi suficiente para saturar a membrana (R_e^{sat}) dos protoplastos e, portanto, não acarretou lise.

Concentrações de 100 e 1 000 ppm de CTAB causaram lise de protoplastos em todos os microrganismos testados. Em água destilada a c.m.c. do CTAB é de 277 ppm, portanto, com 100 ppm todo CTAB está na forma de monômero, complexado com os lipídeos e proteínas da membrana e nas micelas mistas, em concentração suficiente para saturar a membrana e provocar lise dos protoplastos. Na concentração de 1.000 ppm além da interação dos monômeros de CTAB com a membrana, temos a presença de micelas de surfatante.

Em ambos os casos, não observamos solubilização das membranas (R_e^{sol}), que ocorre com surfatantes aniônicos como o SDS (JONES, 1992), podendo ser observadas como grandes aglomerados em microscopia de contraste de fase.

Não podemos, entretanto, afirmar que o CTAB não solubiliza as membranas, talvez isto ocorra em concentrações maiores do que as utilizadas.

TABELA 19. Tempo (em minutos) requerido para lise de protoplastos dos diferentes microrganismos em diferentes concentrações de CTAB

microrganismos	CTAB (ppm)			
	0	10	100	1000
<i>Escherichia coli</i>	-	-	20	10
<i>Klsbsiella terrigena</i>	-	-	20	10
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-	20	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	30	20
<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	-	30	10
<i>Pseudomonas cepacia</i>	-	-	20	10
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	-	-	20	10
<i>Acetobacter aceti</i>	-	-	40	10
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	-	-	40	10
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	30	20
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	40	30
<i>Sacch. cerevisiae</i> FTPT 0472	-	-	30	10

5.8.2. AÇÃO DO CTAB EM CÉLULAS INTACTAS.

As mesmas concentrações utilizadas na verificação do efeito do CTAB sobre os protoplastos, foram aplicadas na verificação do efeito do CTAB em células intactas. Verificou-se que nenhuma das concentrações provocou lise de células.

Concentrações de 100 ppm e 1.000 ppm de CTAB causaram aglomeração de células, efeito mais acentuado na maior concentração.

A rígida parede celular das bactérias desempenha um papel importante na sua resposta ao tratamentos com agentes líticos. A remoção da parede torna a membrana do protoplasto sensível e susceptível de rápida lise. A lise induzida por agentes líticos é a fase terminal de uma série de eventos, que

se iniciam com a desorganização da membrana, seguida da ruptura e conseqüente perda do conteúdo celular.

A parede celular dos microrganismos testados no trabalho foi capaz de proteger a membrana, não permitindo a lise nas concentrações de CTAB estudadas. A parede, entretanto, não impediu a passagem do CTAB para o interior das células, uma vez que, em concentrações muito menores, foi capaz de inibir a atividade enzimática da lactato desidrogenase e da álcool desidrogenase e alterar o metabolismo da glicose.

5.9. AÇÃO DO CTAB NAS PROTEÍNAS CELULARES.

O cultivo dos microrganismos na presença de CTAB provocou mudanças no perfil de proteínas da membrana e do citosol (Tabela 20), no caso das células sensíveis.

As propriedades de qualquer célula microbiana são determinadas pelas características do seu genoma, que não só guarda informações que permitem ao organismo manter sua integridade estrutural e funcional, como também contém informações que lhes garante a potencial capacidade de responder às mudanças no seu ambiente. Essas informações não são afetadas pela entrada de substâncias estranhas à célula, com exceção das substâncias mutagênicas e da energia requerida para a sua reprodução.

Uma das maiores limitações na capacidade das células microbianas para responder às alterações no ambiente são os receptores externos, que respondem pela indução da série de eventos decorrentes das mudanças ambientais, que resultam em alterações nas próprias células. Em princípio isto pode ocorrer de duas maneiras: a) por mudanças na sua constituição genética ou b) por adaptação fenotípica. Mudanças genéticas resultam da

ocorrência de mutações espontâneas no processo de reprodução e, portanto, pertencem ao potencial natural de adaptação das células. Adaptações fenotípicas, entretanto, podem obviamente ser influenciadas pelas condições ambientais.

TABELA 20. Alteração na composição de proteínas celulares em crescimento com CTAB.

microrganismo	Peso molecular (KDa)			
	1	2	3	4
<i>E. coli</i> membrana	75,0 48,0 37,6	77,7 57,1	53,1	94,1 52,1
<i>E. coli</i> citosol	33,2 26,3	53,6		
<i>K. terrigena</i> membrana			77,8 62,5	43,7
<i>Ps. acidovorans</i> membrana		71,9 42,6	54,5 53,4 50,7 45,6	55,6 52,7
<i>Ps. acidovorans</i> citosol			33,1	
1-Proteínas que apresentam concentração maior com CTAB				
2-Proteínas que apresentam concentração menor com CTAB				
3-Proteínas presentes somente com crescimento com CTAB				
4-Proteínas presentes somente com crescimento sem CTAB				

O crescimento se processa através de um esquema inerente à célula, enquanto o fenótipo das células é influenciado pelos fatores ambientais. A grande variedade de respostas fenotípicas encontradas dentro de um certo genótipo claramente mostra que nenhuma espécie microbiana expressa o genoma inteiro, sob qualquer condição ambiental definida.

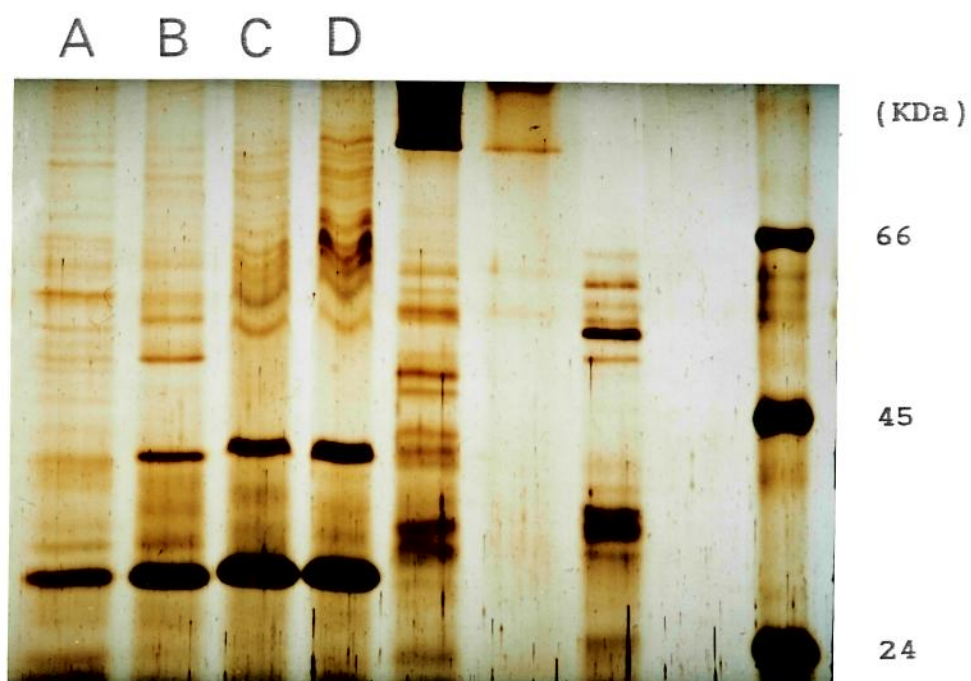
A expressão do genoma celular é dependente das condições ambientais. Em células em crescimento, centenas de proteínas devem ser sintetizadas e devem atuar de uma maneira integrada. Para tanto, as células contam com mecanismos regulatórios que garantem que apenas as proteínas necessárias sejam sintetizadas e nas quantidades requeridas.

As células de *E.coli* e de *Klebsiella terrigena* cultivadas na presença de CTAB, apresentaram muitas diferenças no perfil de proteínas de membrana (Figura 31) e proteínas do citosol (Figura 33) em gel de eletroforese, quando comparadas com as células cultivadas na ausência de CTAB.

Pseudomonas aeruginosa quando cultivada na presença e na ausência de CTAB não apresentou diferença no perfil de proteínas celulares. *Ps. cepacia* apresentou uma proteína de membrana de peso molecular 70,5 Kda em concentração superior na presença de CTAB e *Ps. acidovorans* apresentou várias alterações (Figuras 32 e 34).

Com estes resultados podemos verificar que os microrganismos sensíveis ao CTAB, na presença deste, expressam alguns gens e reprimem outros, para a síntese de proteínas, assim como aumentam ou diminuem as concentrações de algumas proteínas existentes, para conseguir crescer e se multiplicar.

A resistência ao CTAB, entretanto, não está ligada à expressão ou repressão de partes do genoma, uma vez que *Ps. aeruginosa* não apresentou alterações no perfil de proteínas. Podemos supor que a resistência está relacionada com a permeabilidade inerente da membrana celular ao composto.



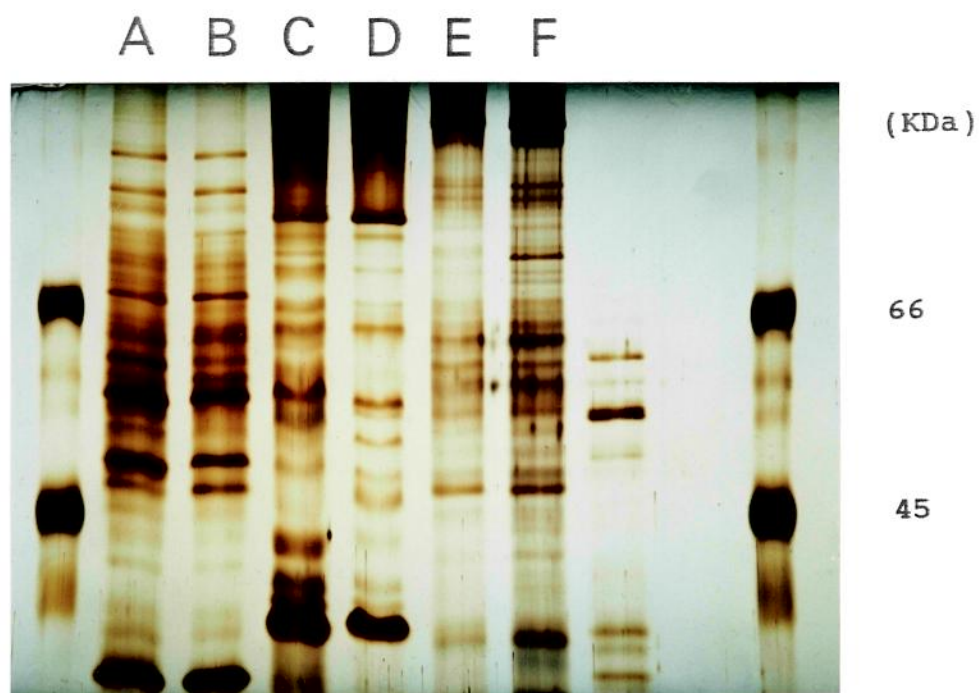
A. *Escherichia coli*^{*}
 B. *Escherichia coli*^{**}

C. *Klebsiella terrigena*^{*}
 D. *Klebsiella terrigena*^{**}

* cultivada em CANA 11.

** cultivada em CANA 11 com 100 ppm de CTAB.

Fig. 31. Perfil de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 10%, corado com prata.



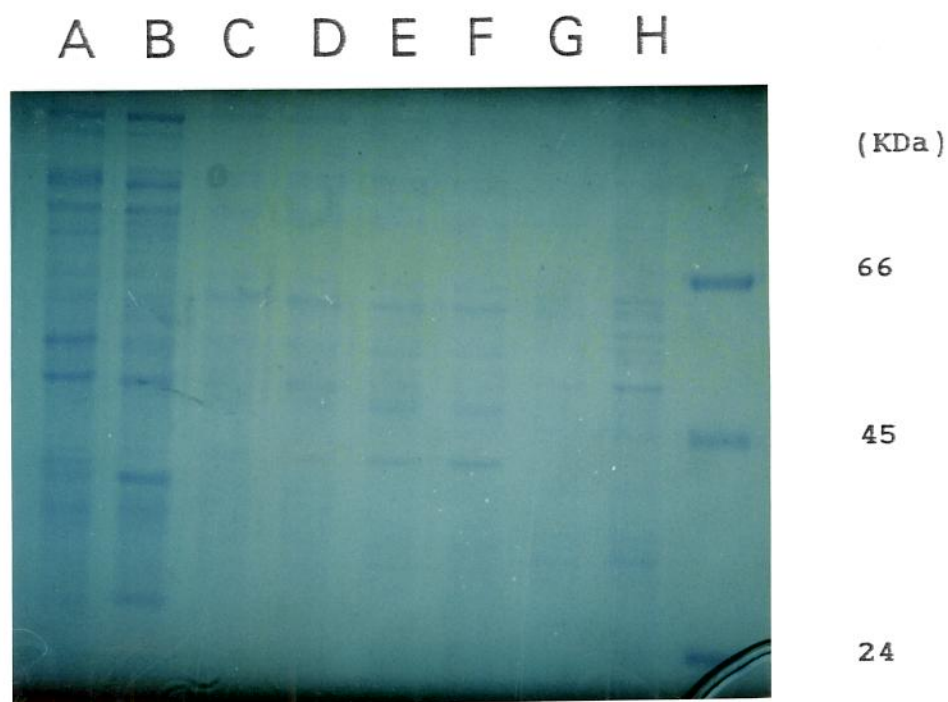
A. *Pseudomonas aeruginosa*^{*} C. *Ps. acidovorans*^{*} E. *Ps. cepacia*^{*}
 B. *Pseudomonas aeruginosa*^{**} D. *Ps. acidovorans*^{***} F. *Ps. cepacia*^{**}

* cultivada em CANA 11.

** cultivada em CANA 11 com 500 ppm de CTAB.

*** cultivada em CANA 11 com 50 ppm de CTAB

Fig. 32. Perfil de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 10%, corado com prata.



A. *Escherichia coli*^{*}
 B. *Escherichia coli*^{**}
 C. *Klebsiella terrigena*^{*}
 D. *Klebsiella terrigena*^{**}

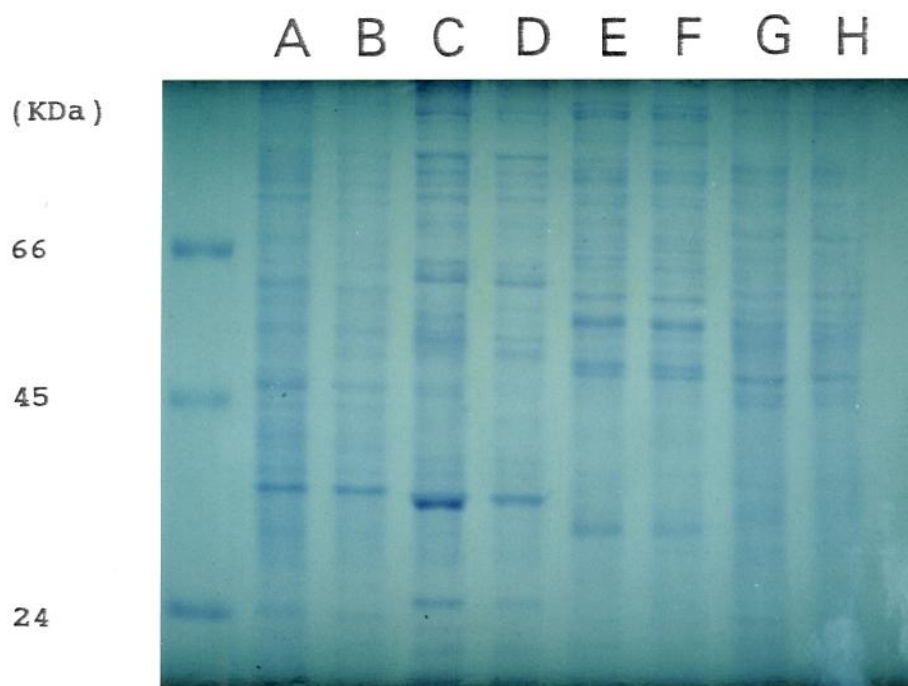
E. *Alcaligenes faecalis*^{*}
 F. *Alcaligenes faecalis*^{**}
 G. *Acetobacter aceti*^{*}
 H. *Acetobacter aceti*^{***}

* cultivada em CANA 11.

** cultivada em CANA 11 com 100 ppm de CTAB.

***cultivada em CANA 11 com 3 ppm de CTAB

Fig. 33. Perfil de proteínas do citosol em gel de poliacrilamida-SDS 10%, corado com coomassie blue.



A. <i>Pseudomonas cepacia</i> ^{**}	E. <i>Pseudomonas mendocina</i> ^{**}
B. <i>Pseudomonas cepacia</i> [*]	F. <i>Pseudomonas mendocina</i> [*]
C. <i>Pseudomonas acidovorans</i> ^{***}	G. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^{**}
D. <i>Pseudomonas acidovorans</i> [*]	H. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [*]

* cultivada em CANA 11.

** cultivada em CANA 11 com 500 ppm de CTAB.

***cultivada em CANA 11 com 50 ppm de CTAB

Fig. 34. Perfil de proteínas do citosol em gel de poliacrilamida-SDS 10%, corada com coomassie blue.

5.10. ANÁLISE MORFOLÓGICA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA.

Observações morfológicas realizadas através de microscopia eletrônica, revelaram que as células de *E. coli* cultivadas na presença de 100 ppm de CTAB apresentaram-se sensivelmente menores, confirmando os resultados de WASHAN et al., 1976c.

As células crescidas na presença de CTAB apresentaram superfície rugosa (Figura 35), enquanto as células com crescimento normal apresentaram superfície mais homogênea (Figura 36 e 37).

As fotomicrografias de SALTON et al., 1951 realizadas através da técnica de sombreamento mostraram que as células de *S. aureus* e *E. coli* tratadas com CTAB apresentavam contração do citoplasma verificada por um espaço vazio entre o citoplasma e a parede celular e esta contração era acompanhada de liberação de solutos.

A concentração de CTAB utilizada no meio de cultura, permitiu um bom crescimento de *E. coli* e portanto, esta concentração não foi suficiente para causar danos físicos às células como no trabalho de SALTON et al., 1951. Entretanto, nossas observações, realizadas com técnica de coloração negativa e com aumentos substancialmente maiores, evidenciaram mudanças estruturais marcantes no envelope celular.

As células cultivadas na presença de CTAB apresentaram tendência a formar aglomerados de células maiores do que as cultivadas na ausência de CTAB (Figura 38).



Fig. 35. Fotomicrografia de *Escherichia coli* cultivada com 100 ppm de CTAB. (aumento 19.000 x).

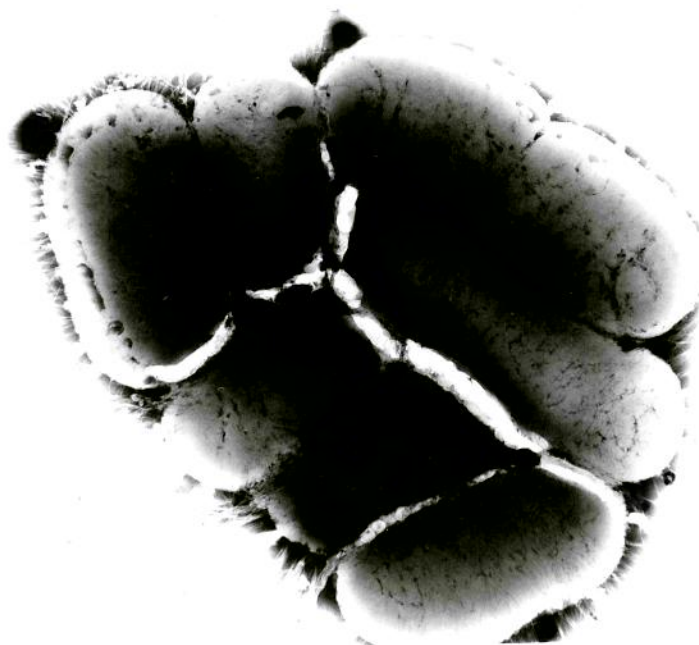


Fig. 36. Fotomicrografia de *Escherichia coli* cultivada sem CTAB. (aumento 19.000 x).



Fig. 37. *Escherichia coli* cultivada sem CTAB, formação de pequenos grupos de células (aumento 16.500 x).



Fig. 38. *Escherichia coli* cultivada com 100 ppm de CTAB, formação de grandes aglomerados de células (aumento de 9.500 x).

6. CONCLUSÕES

1-A concentração micelar crítica (c.m.c) do CTAB em meio de cultura é menor do que em água.

2-Em concentrações abaixo da c.m.c., o CTAB interage com as proteínas do meio de cultura.

3-*Klebsiella terrigena*, utilizada como representante das bactérias Gram-negativa, mostrou-se pouco exigente quanto aos requerimentos nutricionais, tendo bom crescimento em todas as formulações de meio de cultura, o que não ocorreu com as bactérias Gram-positivas e com as bactérias acéticas.

4-Altas concentrações de magnésio causam fase de latência extensa para os microrganismos utilizados e nos meios testados.

5-No meio de CANA 11, o CTAB inibiu o crescimento de *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus*, em concentrações abaixo da c.m.c.. As formas monoméricas, portanto, atuam na célula.

6-A inibição do crescimento dos demais microrganismos, em meio de CANA 11 ocorreu em concentrações acima da c.m.c.. As micelas de CTAB, portanto atuam nas células.

7-O CTAB não inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cepacia* e *Ps. mendocina* em meio de CANA 11, porém inibiu *Ps. acidovorans*. Os membros do gênero *Pseudomonas*, portanto, constituem um grupo heterogêneo quanto à sensibilidade ao CTAB.

8-Em nosso trabalho os microrganismos que apresentaram maior resistência e maior sensibilidade ao CTAB, foram espécies Gram-negativas. Essa divisão, portanto, não pode ser tomada como parâmetro na avaliação da sensibilidade. A sensibilidade está relacionada com características intrínsecas à cada célula.

9-A concentração mínima inibitória de CTAB para cada microrganismo varia com o meio de cultura e pode estar abaixo ou acima da c.m.c.

10-As concentrações de CTAB necessárias para provocar inibição no metabolismo da glicose são menores do que as necessárias para inibir o crescimento.

11-Concentrações de CTAB abaixo de 10 ppm provocam grande comprometimento dos mecanismos da respiração, fermentação e glicólise, por alteração na atividade de enzimas. Por outro lado, parece não provocar danos físicos às células uma vez que células e protoplastos permaneceram intactos nestas condições. Não se pode, entretanto, desprezar a hipótese de que a redução do metabolismo se deva ao comprometimento do mecanismo de transporte de glicose para o interior das células, em função da adsorção do CTAB na membrana celular, com o conseqüente impedimento dos sítios ativos de transporte. Essa hipótese é possível, porém, é certo que o CTAB ultrapassa a barreira da parede celular atingindo o citosol e mitocôndria, pois as células, na ausência de glicose exógena absorvem mais O_2 do que as células na presença de glicose e CTAB.

12-Para *Pseudomonas aeruginosa* a concentração de CTAB necessária para causar inibição do metabolismo é muito maior que 10 ppm.

13-Concentração de CTAB igual a 3 ppm causa estímulo, que atinge 12%, no mecanismo de fermentação alcoólica em *Sacch.cerevisiae*.

14-Concentrações abaixo de 10 ppm inibem a atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase intracelular, exceto em *Pseudomonas aeruginosa*. *Ps. cepacia* e *Ps. mendocina*, porém a enzima lactato desidrogenase liberada destas células através de lise, é igualmente sensível.

15-*Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cepacia* e *Ps. mendocina* têm menor permeabilidade ao CTAB do que os demais microrganismos testados.

16-A parede celular protege as células de lise causada por CTAB. Concentrações iguais a 100 e 1.000 ppm de CTAB provocam lise de protoplastos, mas não de células intactas.

17-A cápsula de polissacarídeo de *Klebsiella terrigena* não a protege contra a ação do CTAB, apresentando sensibilidade semelhante à *Escherichia coli* em todos os experimentos realizados.

18-Concentrações de 100 e 1.000 ppm de CTAB não causam solubilização de membrana.

19-*Pseudomonas aeruginosa* não apresentou alteração no perfil eletroforético de proteínas celulares, em função da presença ou ausência do CTAB, o que ocorreu no caso dos microrganismos sensíveis. Este fato sugere que a resistência ao CTAB é intrínseca devendo-se, provavelmente, aos canais de porinas, que apresentam baixa permeabilidade ao CTAB.

20-As células de *Escherichia coli* cultivadas na presença de CTAB são menores do que as cultivadas na sua ausência, apresentam superfície rugosa e formam aglomerados muito maiores do que na ausência de CTAB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABUIN, E.B. & J.C. SCAIANO, 1984. Exploratory study of the effect of polyelectrolyte-surfactant aggregates on photochemical behavior. J. Am. Chem Soc. 106: 6274-6283.
- ADAIR, F.W., S.G. GEFTIC & J.GELZER, 1969. Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds: I- Growth in benzalkonium chloride solution. Appl. Microbiol. 18 (3): 299-302.
- ADAIR, F.W., S.G. GEFTIC & J. GELZER, 1971. Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. II- Cross-resistance characteristics of a mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. 21 (6): 1058-1063.
- AIBA, S., M. NAGATAMI & H. FURUSE, 1967. Some analysis of lag phase in the growth of microbial cells. J. Ferment. Technol. 45(6):475.
- ALMGREN, M., J.ELÖFROTH & R. RYDHOLM, 1979. Co-existence of rod-like and globular micelles in the CTAB-CTAC-H₂O system. Evidence from the fluorescence of solubilized pyrene. Chem. Phys. Lett. 63: 265-268.
- AMATO, A., A.L. COSTA & A. MISEFARI, 1968. Attività micostatica in vivo di un sale quaternario d' ammonio. ATTI Soc. Peloritana Sci Fis. Mat. Natur. 14 (1/2): 109-116.
- AMORIM, H.V.; A.J. OLIVEIRA & H. CAMPOS, 1981. Infecção, problema sério na produção de álcool. Anais do 2º Congresso Nacional da Sociedade de Técnicos Açucareiros do Brasil IV: 158-168.
- AMORIM, H.V. & A.J. OLIVEIRA, 1982. Infecção na fermentação: como evitá-la. Açúcar e álcool 5:12-18.
- ANDERES, E.A., W.E. SANDINE & P.R. ELLIKER, 1971. Lipids of antibiotic-sensitive and resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Can J. Microbiol. 17 (11): 1357-1365.
- ANGUS, B.L., A.M. CAREY, D.A. CANON, A.M.B. KROPINSKI & R.E.W. HANCOCK, 1982. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild type with an antibiotic-supersusceptible mutant. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 299-309.
- ARMBRUSTER, E.H. & G.M. RIDENOUR, 1949. Effect of various water ions on the bactericidal properties of quaternaries. Soap San. Chem. 25 (7): 103-105.

- ARMSTRONG, W. McD., 1957. Surface active agents and cellular metabolism. I. The effect of cationic detergents on baker's yeast. Arch. Biochem. Biophys. 71:137.
- AUERBACH, M.E., 1944. Colorimetric assay of quaternary ammonium salts. Ind. Eng. Chem. 16:739.
- BAKER, Z., R.W. HARRISON, & B.F. MILLER., 1941a. Action of synthetic detergents on the metabolism of bacteria. J. Exp. Med. 73: 249-271
- BAKER, Z., R.W. HARRISON & B.F. MILLER, 1941b. The bactericidal action of synthetic detergents. J. Exp. Med. 74:611-620.
- BAKER, Z., R.W. HARRISON & B.F. MILLER, 1941c. Inhibition by phospholipids of the action of synthetic detergents on bacteria. J. Exp. Med. 74: 621-637.
- BARFORD, J.P., N.B. PAMMENT & R.J. HALL. Lag phases and transients In: BAZIN, M.J., ed. Microbial population dynamics. CRC Press. Florida, 1982. cap. 3, p. 55-89.
- BARNES, J.M., 1942. A new disinfectant and cleaning agent. Lancet 242 (6192):531-532.
- BARR, T, J. OLIVER & W.V. STUBING, 1948. The determination of surface active agents in solutions. J. Soc. Chem. Ind. 67: 45-48.
- BASTIDE, M., E. HADIBI, D. SCHEIBER, M. MIEGEVILLE, C. VERMEIL & J.-M. BASTIDE, 1979. Modalités de libération des protoplastes de *Saccharomyces cerevisiae*: étude en microscopie électronique à balayage. Ann. Microbiol. Inst. "Pasteur" 130 A (4): 419-433.
- BENEDETTI, CELSO EDUARDO. Análise eletroforética de proteínas de membrana de Pseudomonas avenae e Pseudomonas rubrilineans patogênicas a gramíneas. Campinas. 1991 76 p. Tese (Mestre em Biologia)-Inst. Biol.- Universidade Estadual de Campinas.
- BENNETT, F.W. & F.E. NELSON., 1954. Action on certain viricidal agents on lactic *Streptococcus* bacteriophage in liquids. J. Dairy Sci. 37 (3): 847-856.
- BENZ, R., R.E.W. HANCOCK, 1981. Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta 646:298-308.
- BIHLER, I., A. ROTHSTEIN & L. BIHLER, 1961. The mechanism of stimulation of aerobic fermentation in yeast by quaternary ammonium detergent. Biochem. Pharmac. 8:289.

- BLANK, I.H. & M.H. COOLIDGE, 1950. Degerming the cutaneous surface. I-Quaternary ammonium compounds. J. Invest. Dermatol. 15:249-256.
- BLOIS, D.W. & J. SWARBRICK, 1972a. Interaction of quaternary ammonium bactericides with biological materials. I-Conductometric studies with cephalin. J. Pharm Sci. 61 (3): 390-392.
- BLOIS, D.W. & J. SWARBRICK, 1972b. Interaction of quaternary ammonium bactericides with biological materials. II-Insoluble monolayer studies. J. Pharm Sci. 61 (3): 393-399.
- BLUM, H., H. BEIR & H.J. GROSS, 1987. Improved silver staining plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99.
- BOCKHOTT, S., K.H. HELLWALD & H. BUCHENAWER, 1989. Investigation of the influence of two quaternary ammonium compounds on some viruses and their mode of action. J. Phytopathol. 127 (4): 331-340.
- BORNET, H. & H. EDELHOCH, 1971. Polypeptide hormone interaction. I. Glucagon detergent interaction. J. Biol. Chem. 248 (6):1785-1792.
- BRADLEY, D.E. The preparation of specimen support films. In: KEY, D.K. ed. Techniques for electron microscopy. Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1965. cap. 3, p. 58-74.
- BRAUN, V. & K. HANTKE, 1974. Biochemistry of bacterial cell envelopes. Ann. Rev. Biochem. 43:89-121.
- BUTTERFIELD, C.T., E. WATTII & C.W. CHAMBERS, 1950. Bactericidal efficiency of quaternary ammonium compounds. Publ. Health Repts. 65 (33): 1039-1056.
- BUSTA, F.F., E.H. PETERSON, D.M. ADAMS & M.G. JOHNSON. Colony count methods In: SPECK, M.L., ed. Compendium of methods for the examination of foods 2nd ed. American Public Health Association. Washington, 1984. cap. 4, p. 62-83.
- CELLA, J.A., D.N. EGGENBERGER, D.R. NOEL, L.A. HARRISON & H.J. HARWOOD, 1952. The relation of structure and critical concentrations to the bactericidal activity of quaternary ammonium salts. J. Am. Chem. Soc. 74: 2061-2062.
- CHAMBERS, C.W., P.W. KABLER, A.R. BRYANT, L.A. CHAMBERS & M.B. ETTINGER, 1955. Bactericidal efficiency of quaternary ammonium compounds in different waters. Public Health Rpts. 70 (6): 545-553.

- CHAPLIN, C.E., 1951. Observations on quaternary ammonium disinfectants. Can. J. Bot. 29 (4): 373-382.
- CHAPLIN, C.E., 1952. Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants. J. Bacteriol. 63 (4):453-458.
- CIRILLO, V.P. & P.O. WILKINS, 1964. Use of uranyl ion in membrane transport studies. J. Bacteriol. 87:232-233.
- CORRIN, M.L. & W.D. HARKINS, 1947. Determination of the critical concentration for micelle formation in solutions of colloidal electrolytes by the spectral change of a dye. J. Am. Chem. Soc. 69:679-683.
- CROCKER, C.K., 1951. Variations in characteristics of *Escherichia coli* induced by quaternary ammonium compounds. J. Milk Food Technol. 14:138-141.
- CUCCI, M.W., 1949. Quaternary ammonium compounds, a review. Soap Sanit. Chem. 25(10): 129-134, 145.
- CUPKOVA, V., D. MLYNARCIK, F. DEVINSK & I. LACKO, 1981. The effect of quaternary ammonium compounds and amine oxides on spore of *Bacillus cereus*. Folia Microbiol. 26 (3): 189-195.
- CURRY, J.C. & F.W. BARBER, 1952. Inhibition of *Streptococcus lactis* by a quaternary ammonium compound in cheese milks. J. Milk Food Technol. 15 (6): 278-281, 299.
- DAGLEY, S. & C.N. HINSHELWOOD, 1938. Physicochemical aspects of bacterial growth. Part I. Dependence of growth of *Bact. lactis aerogenes* on concentration of medium. J. Chem Soc.:1930-1936.
- DAVIES, G.E., 1949. Quaternary ammonium compounds. A new technique for the action and the results obtained with Cetavlon (cetyltrimethylammonium bromide). J. Hyg. 47 (3): 271-277.
- DAWSON, I. M., I. LAMINSKI & H. STERN, 1953. An electron-microscope study of the action of cetyl-trimethylammonium bromide on *Staphylococcus aureus*. J. Pathol. Bacteriol. 66 (2):513-526.
- DENNIS, E.A., 1974. Formation and characterization of mixed micelles of the non ionic surfactant triton X-100 with egg, dipalmitoyl, and dimyristoyl phosphatidyl choline. Arch. Biochem. Biophys. 165:764-773.
- DILL, K.A. & P.J. FLORY, 1981. Molecular organization in micelles and vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:676-680.

- DI RIENZO, J.M., K. NAKAMURA & M. INOUE, 1978. The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: Biosynthesis, assembly, and functions. Ann. Rev. Biochem. 47:481-532.
- DIVIES, C., 1972. Action de l' ethanol sur l'oxydation de l'acetate par *Acetobacter rancens*. Biochimie 54: 1073-1083.
- DIXON, R.E., R.A. KASLOW, D.C. MACKEL, C.C. FULKERSON & G.F. MALLISON, 1976. Aqueous quaternary ammonium antiseptics and disinfectants. J. Am. Med. Assoc. 236:2415-2417.
- DOMAGK, G., 1935. Eine neue klasse von desinfektionsmitteln. Dtsch Med. Wochenschr. 61:829-832.
- DORKOVITZ, V. & C.K. CROCKER, 1950. Quaternaries vs hypochlorites. Soap San Chem. 26 (9): 114-115, 117, 119, 137.
- DORSON, M. & C. MICHEL, 1987. An evaluation of the activity of five quaternary ammonium compounds on main viruses and bacteria pathogenic for salmonids. Bull. Fr. Peche Piscic. 0 (305): 61-66.
- DUBOIS, A.S. & D.D. DIBBLEE, 1947. The influence of pretreating bacteria with anionic agents on the antibacterial action of cationic germicides. J. Bacteriol. 53:254-252.
- DUNN, C.G., 1936. A mixture of high molecular alkyl-dimethyl benzyl ammonium chlorides as an antiseptic. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 35:427-429.
- DUNN, C.G., 1938. Fungicidal properties of alkyldimethylbenzylammonium chlorides. Proc. Soc. Exp. Med. Soc. 37: 661-663.
- DYAR, M.T. & E.J. ORDAL, 1946. Electrokinetic studies of bacterial surface. I. The effects of surface active agents on the electrophoretic mobilities of bacteria. J. Bacteriol. 51:149
- DYAR, M.T., 1947. A cell wall stain employing a cationic surface active agents as a mordant. J. Bacteriol. 53: 498.
- EINSMAN, P.C. & R.L. MAYER, 1947. The antimicrobial aspects of phenoxyethyldimethyldodecylammonium bromide (PDDB). J. Bacteriol. 54 : 668-669.
- EL-SAYED, M.Y. & M.F. ROBERTS, 1985. Charged detergents enhance the activity of phospholipase C (*Bacillus cereus*) towards micellar short-chain phosphatidilcholine. Biochim. Biophys. Acta 831:133-141.

- EMSLIE, K.R., D.E. TOWNSEND & W.B. GRUBB, 1986. Isolation and characterization of a family of small plasmids encoding resistance to nucleic acid-binding compounds in *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 22 (1): 9-16.
- EPTON, S.R. 1947. A rapid method of analysis for certain surface active agents. Nature 160:795-796.
- FAIRBANKS, G. & J. AVRUCH, 1972. Four gel systems for electrophoretic fractionation of membrane proteins using ionic detergents. J. Supramol. Struct. 1:66-75.
- FEDERAL REGISTER, 1969. Part 121-Food additives; Subpart F Food additives resulting from contact with containers or equipment and food additives otherwise affecting food. 11/26/1969; Fed. Reg. 34/117, 18556. 12/13/1969; Fed. Reg. 34/239, 19655. 8/9/1974; Fed. Reg. 39/155, 28627. apud: PETROCCI, A.N. Surface active agents: Quaternary ammonium compounds In: BLOCK, S. ed. Disinfection, Sterilization and Preservation. 1983. Cap. 14, p. 309-329.
- FENDLER, J.H. Physical and chemical properties of surfactants and micelles in aqueous solutions In: FENDLER, J.H. & E.J. FENDLER, ed. Catalysis in micellar and macromolecular systems. Academic Press, N.Y., 1975. cap. 2, p. 19-41.
- FENDLER, J.H. Surfactants in water. In: FENDLER, J.H., ed. Membrane mimetic chemistry. John Wiley & Sons, N.Y. 1982. cap 2, p. 6-47.
- FERLAZZO, A., A. LONDRILLO, & G. LOMBARDO, 1959. Ricerche sull' azione in vitro dei sali di ammonio quaternari su alcune Enterobacteriaceae. Giorn. Mal. Infett. Parassit. 11 (11): 967.
- FEW, A.V., R.H. OTTEWILL & H.C. PARREIRA, 1955. The interaction between bovine plasma albumin and dodecyltrimetil ammonium bromide. Biochim. Biophys. Acta 18 (1):136-137.
- FIECHTER, A., G.F. FURMANN & O. KÄPPELI, 1981. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. Adv. Microb. Physiol. 22:123-183.
- FRANK, M.J. & W. SCHAFFNER 1976. Contaminated aqueous benzalkonium chloride. J. Am. Med. Assoc. 236:2418-2419.
- FREEDLANDER, B.L., 1940. Bacteriostatic action of various agents upon growth of tubercle bacilli in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 44:51-53.

- FROMHERZ, P., 1980. Micelle structure: A surfactant-block model. Chem. Phys. Lett. 77:460-466.
- FRONTY, C.C., 1949. Inactivation of bacteriophage of the lactic acid streptococci of starters by quaternary ammonium compounds. J. Milk Food Technol. 12 (4): 214-218.
- GALE, E.F. & E.S. TAYLOR, 1946. 2. The action of tyrocidin and detergents in liberating amino-acids from bacterial cells. Nature 157:549-550.
- GALLI, Z.F., 1961. Fermentação do mel final das Usinas de Açúcar. Anais da II Semana de Fermentação alcoólica, II: 297-304. Instituto Zimotécnico-Piracicaba.
- GAULTIER, J.A., S. LAMBIN, J. RABIAN, C. CARRERE & M. BEIGNOT-DEVALMONT, 1970. Activité bacteriostatique de nouveaux sels d'ammonium quaternaires. Ann. Pharm. Fr. 28 (1): 49-55.
- GERSHELFELD, L. & D. PERLSTEIN, 1941. Significance of hydrogen ion concentration in the evaluation of bactericidal efficiency of surface tension depressants. Am. J. Pharm. 113:89-92.
- GERSHELFELD, L. & V.E. MILANICK, 1941. Bactericidal and bacteriostatic properties of surface tension depressants. Am. J. Pharm. 113:306-326.
- GILBY, A.R. & A.V. FEW, 1960. Lysis of protoplasts of *Micrococcus lysodeikticus* by ionic detergents. J. Gen. Microbiol. 23:19-25.
- GLASMAN, H.N., 1948. Surface active agents and their application in bacteriology. Bacteriol. Rev. 12:105-148.
- GMEINER, J., H. BERGMAN & S. SCHLECHT, 1980. Molecular organization of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Different release of lipopolisaccharide from wild type and lipopolisaccharides mutant cells by EDTA treatment. Arch. Microbiol. 124: 69-71.
- GUITERAS, A.F. & R.L. SHAPIRO. 1946. A bactericidal detergent for eating utensils. J. Bacteriol. 52:635-638.
- HAGAN, M. H., C.H. MAGUIRE & W.H. MILLER, 1946. Cetyl pyridinium chloride as a cutaneous germicide in major surgery. Arch. Surg. 52:149-159.

- HANCOCK, R.E.W., G.M. DECAD & H. NIKAIDO, 1979. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Biochim. Biophys. Acta 554:323-331.
- HANCOCK, R.E.W., K. POOL & R. BENZ, 1982. Outer membrane protein P of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes. J. Bacteriol. 150: 730-738.
- HANCOCK, R.E.W., 1984. Alterations in outer membrane permeability. Ann. Rev. Microbiol. 38:237-264.
- HARDAWAY, K.L. & C.S. BULLER, 1979. Effect of ethylenediaminetetraacetate on phospholipids and outer membrane functions in *Escherichia coli*. J. Bacteriol 137 (1): 62-68.
- HARDY, P.C., G.M. EDERER & J.M. MATSEN, 1970. Contamination of commercially packaged urinary catheter kits with the pseudomonad EO-1. N. Engl. J. Med. 282: 33-35.
- HARTLEY, G.S., 1934. Effect of long chain salts on indicators-valence type of indicators and the protein error. Trans Faraday Soc. 30:444-450.
- HARTLEY, G.S., 1935. The application of Debye-Hichel theory of colloidal electrolytes. Trans. Faraday Soc. 31:31-50.
- HARTLEY, G.S., 1948. State of solution of colloidal electrolytes. Quart. Rev. Chem. Soc. 2: 153-183.
- HASIN, M., S. ROTTER & S. RAZIN, 1975. The outer membrane of *Proteus mirabilis*. I-Isolation and characterization of the outer and cytoplasmic membrane fractions. Biochim. Biophys. Acta 375: 381-394.
- HAUSER, E.D.W. & W.W. CUTTER, 1944. Cationic detergents as antiseptics. A. J. Surg. 64 (13): 352-358.
- HAYAKAWA, K. & J.C.T. KWAK, 1982. Surfactant-Polyelectrolyte interactions. 1. Binding of dodecyltrimethylammonium ions by sodium dextransulfate and sodium Poly styrenesulfonate in aqueous solution in the presence of sodium chloride. J. Phys. Chem. 86:3866-3870.
- HELENIUS, A. & K. SIMONS, 1975. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta 415:29-79.
- HELENIUS, A., D.R. MCCASLIN, E. FRIES & C. TANFORD, 1979. Properties of detergents. Methods in Enzimology 56:734-749.

- HIRSCH, J.G., 1954. The resistance of tubercle bacilli to the bactericidal action of benzalkonium choride (Zephiran). Am. Rev. Tuberc. 70 (2): 312-319.
- HOBOT, J.A., E. CARLEMAM, W. VILLIGER & E. KELLENBERGER 1984. Periplasmic gel: New concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. J. Bacteriol. 160:143-152.
- HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS. Hoefer eletrophoresis catalog and exercises San Francisco 1990-1991 (catálogo)
- HOOGERHEIDE, J.C., 1945. The germicidal properties of certain quaternary ammonium salts with special reference to cetyltrimetilammonium bromide J. Bacteriol. 49: 277-289.
- HORNE, R.W. Negative staining methods. In: KAY, D.H. ed. Techniques for electron microscopy. Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1965. cap. 3, p. 58-74.
- HOTCHKISS, R.D., 1944. Gramicidin, Tyrocidin and tyrothricin. Adv. Enzymol. 4:655.
- HOTCHKISS, R.D., 1946 The nature of the bactericidal action of surface active agents. Ann. N. Y. Acad. Sci. 46: 479.
- HUCKER, G.J., D. METCALF & C. COOK, 1948a. The rate of germicidal action of the quaternary ammonium compounds. Tech. Bull. New York State Agric. Expt. Sta 280: 1-20.
- HUCKER, G.J., S. WATKISS, D. METCALF & J. STONE, 1948b. Effect of hydrogen-ion and temperature on the activity of quaternary ammonium compounds. Tech. Bull. New York State Agric. Exptl. Sta 281: 1-21, 24.
- HUECK, H.J., D.M.M. ADEMA & J.R. WIEGMANN, 1966. Bacteriostatic, fungistatic, and algistatic activity of fatty nitrogen compounds. Appl. Microbiol. 14:308-319.
- HUGO, W.B., 1952. Observations on the manometric estimation of bacterial activity. Proc. Soc. Appl. Bact. 15 (1): 29-33.
- HUGO, W.B. & A.R. LONGWORTH, 1964. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. J. Pharm. Pharmac. 16:655.
- HUGO, W.B., 1967. The mode of action of antibacterial agents. J. Appl. Bacteriol. 30 (1):17-50.
- IBARRA, J.J. & YOKOYA, F., 1986. Estimation of chicken microbial load using the growth curve parameters of chicken microflora. Poultry Sci. 65: 58-62.

- JACOBS, W.A., 1916 The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylenetetramine. I. The problem of the chemotherapy of experimental bacterial infections. J. Exp. Med. 23: 563.
- JACOBS, W.A., M. HEIDELBERGER & H.L. AMOS, 1916a. The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylenetetramine. II. The relation between constitution and bactericidal action in the substituted benzylhexamethylenetetramonium salts. J. Exp. Med. 23: 569.
- JACOBS, W.A., M. HEIDELBERGER & C.G. BULL, 1916b. The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylenetetramine. III. The relation between constitution and bactericidal action in the quaternary salts obtained from halogenacetyl compounds. J. Exp. Med. 23: 577.
- JACKSON, M.L., C.F. SCHMIDT, D. LICHTENBERG, B.J. LITMAN & A.D. ALBERT, 1982. Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside. Biochemistry 21:4576-4582.
- JERCHEL, D. & F. HOFFMEISTER, 1958. Investigations to the influence of carbon-14-labelled dodecyl-dimethyl-benzyl-ammonium bromide on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Proc. First (UNESCO) Internat. Conf. Sci Res. 3: 15-23.
- JONES, M.N., P. MANLEY & A. WILKINSON, 1982a. The dissociation of glucose oxidase by sodium n-dodecyl sulphate. Biochem. J. 203:285-291.
- JONES, M.N., P. MANLEY, P.J.W. MIDGLEY & A.E. WALLER, 1982b. Dissociation of bovine and bacterial catalases by sodium n-dodecyl sulphate. Biopolymers 21(7):1435-1450.
- JONES, M.N., A. FINN, A. MOSAVI-MOVAHEDI & B.J. WALLER, 1987. The activation of *Aspergillus niger* catalase by sodium n-dodecyl sulphate. Biochim. Biophys. Acta 913:395-398.
- JONES, M.N., 1992. Surfactant interactions with biomembranes and proteins. Chem. Soc. Rev. 21 (3):127-136.
- JUANG, R.H., Y.D. CHANG, H.Y. SUNG & J.C. SU, 1984. Oven drying method for polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich. Anal. Biochem. 141:348-350.
- KALYANASUNDARAM, K & J.K. THOMAS. 1976. On the conformation state of surfactant in the solid state and micellar form. A laser-excited Raman scattering study. J. Phys. Chem. 80(13): 1462-1473.

- KALYANASUNDARAM, K., 1978. Photophysics of molecules in micellar forming surfactant solutions. Chem. Soc. Rev. 7: 1418-1424.
- KAMIO, Y. & H. NIKAIIDO, 1977. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Identification of proteins exposed on cell surface. Biochim. Biophys. Acta, 464:589-601.
- KÄPPELI, O., 1986. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeast. Adv. Microbiol. Physiol., 28:181-209.
- KEOWN, K.K., R.A. GILMAN & C.P. BAILEY, 1957. Open heart surgery - anesthesia and surgical experiences. J. Am. Med. Ass. 165: 781-787.
- KIRCHHOFF, H. 1968. Die Wirkung quaternärer Ammoniumverbindungen auf das Newcastle Disease-Virus und das Parainfluenza-Virus. Deut. Tierärztl. Wochenscher. 75(7): 160-165.
- KIRCHHOFF, H. 1970. The quaternary ammonium compounds and their inactivating effect on viruses. Gesundheitsn Desinfek. 59 (12): 171-180.
- KLEIN, M. & Z.G. KARDON, 1947. The "reversal" neutralization and selectivity of germicidal cationic detergents. J. Bacteriol., 54:245-251.
- KLIMEX, J.W. & J.H. BAILEY, 1956. Factors influencing the rate of killing of *Escherichia coli* exposed to Benzalkonium chloride. Appl. Microbiol. 4 (1): 53-59.
- KLORMANN, E.G. & E.S. WRIGHT, 1950. Are quaternary ammonium sporicidal? Am. J. Pharm. 122: 330-336.
- KNOX, W.E., V.H. AUERBACH, K. ZARUDNAYA & M. SPIRITES, 1949. The action of cationic detergents on bacteria and bacterial enzymes. J. Bacteriol. 58:443.
- KOLLOFF, H.G., A.P. WYSS, R.E. HIMELICK & F. MANTELE, 1942. Germicidal activity of some quaternary ammonium salts. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. 31:51-53.
- KOLTHOFF, I.M. & W. STRICKS, 1948. Solubilization of dimethylamino benzeno in solutions of detergents. I. The effect of temperature on the solubilization and upon the critical concentration. J. Phys. & Colloid. Chem. 52: 915-941.

- KRAVITZ, E. & R.L. STEDMAN, 1957. Retention of disinfectant activity in the presence of hard water. Appl. Microbiol. 5(1):34-35.
- KROG, A.J. & C.G. MARSHALL, 1940. Alkyl-dimethyl-benzyl ammonium chloride for sanitization of eating and drinking utensils. Am. J. Pub. Health., 30:341-347.
- KUDSIN, R.B. & C.W. WALTER, 1961. In use testing of bactericidal agents in hospitals. Appl. Microbiol. 9: 167-170.
- KUHN, R. & H.J. BIELIG, 1940. Uber invertseifen. I: die Einwirkung von Invertseifen auf Eiweiss-stoffe. Ber. dt. Chem. Ger. 73:1080.
- KUTSCHER, A.H., L. SEGUIN, S. LEWIS, J.D. PIRO & E.V. ZEGARELLI. 1954. Growth inhibitory properties of phenoxyethyl dimethyldodecyl ammonium bromide (PDDB) (Bradosol) against *Candida albicans* in vitro-Preliminary report. Antibiot. and Chemother. 4 (10): 1045-1049.
- KUTSCHER, A.H., L. SEGUIN, S. LEWIS, J.D. PIRO & E.V. ZEGARELLI, 1956. Fungicidal properties of phenoxyethyl dimethyldodecyl ammonium bromide (PDDB) against *Candida albicans* in vitro II. Antibiot. and Chemother. 6: 400-403. .
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 610.
- LAWRENCE, C.A. 1946. Roclima-A quaternary ammonium compound of high germicidal activity. Acta Med. Orientalia 5 (11): 363-372.
- LAWRENCE, C.A., C.E. KWARTLER, V.L. WILSON & E.W. KIVELA, 1947. Germicidal action of some benzyl quaternary ammonium compounds having substituents in the aromatic nucleus. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 36 (11): 353-358.
- LEE, J.C. & P.J. FIALKOW, 1961. Benzalkonium chloride source of hospital infection with Gram-negative bacteria. J. Am. Med. Assoc., 177:708-720.
- LICHTENBERG, D., V. ZILBERMAN, P. GREENZAID & S. ZAMIR, 1979. Structural and kinetic studies on the solubilization of lecithin by sodium deosycholate. Biochemistry 18:3517-3525.
- LICHTENBERG, D., R.J. ROBSON & A. DENNIS, 1983. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. Biochim. Biophys. Acta 737:285-304.

- LICHTENBERG, D., 1985. Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. Biochim. Biophys. Acta 821 (3): 470-478.
- LODGE, R.M. & C.N. HINSHELWOOD, 1939a. Physicochemical aspects of bacterial growth. Part IV. Conditions determining stationary populations and growth rates of *Bact. lactis aerogenes* in synthetic media. J. Chem Soc.: 1683-1692.
- LODGE R.M. & C.N. HINSHELWOOD, 1939b. Physicochemical aspects of bacterial growth. Part V. Influence of magnesium on the lag phase in the growth of *Bact. lactis aerogenes* in synthetic media containing phosphate. J. Chem Soc.: 1692-1697
- LODGE, R.M. & C.N. HINSHELWOOD, 1943. Physicochemical aspects of bacterial growth. Part IX. The lag phase of *Bact. lactis aerogenes*. J. Chem. Soc.: 213-219.
- LOWBURY, E.J.L. 1951. Contamination of Cetrinide and other fluids with *Pseudomonas pyocynea*. Br. J. Ind. Med. 8 (1): 22-25.
- Mac GREGOR, D.R. & P.R. ELLIKER, 1958. A comparison of some properties of *Pseudomonas aeruginosa* sensitive and resistant to quaternary ammonium compounds. Can. J. Microbiol., 4 (5): 499-503.
- MAKINO, S., J.A. REYNOLDS & C. TANFORD, 1973. The binding of deoxycholate and triton X-100 to proteins. J. Biol. Chem. 248: 4926-3932.
- MALEZIA, W.F. E.J. GANGAROSA & A.F. GOLEY, 1960. Benzalkonium chloride as a source of infection. N. Engl. J. Med. 263: 800-802.
- MARVIN, H.J., M.B.A. BEEST & B. WITHOLT, 1989. Release of outer membrane fragments from wild type *Escherichia coli* and from several *E. coli* lipopolisaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments. J. Bacteriol. 171 (10): 5262-5267.
- MAXCY, R.B., N.P. TIWARI & P.R. SOPREY, 1971. Changes in *Escherichia coli* associated with acquired tolerance for quaternary ammonium compounds. Appl. Microbiol., 22(2): 229-232.
- MAXWELL, W.A., R. METZLER & E. SPOERL, 1971. Uranyl nitrate inhibition of transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 105(3): 1205.
- MCCALLA, T.M., 1940. Cation adsorption by bacteria. J. Bacteriol. 40: 23-32.

- McCALLA, T.M., 1941. The adsorption on H^+ by bacteria as measured by glass electrode. J. Bacteriol. 41:775-784.
- McQUILLEN, K., 1950. The bacterial surface. I. Effect of cetyltrimethylammonium bromide on the electrophoretic mobility of certain Gram positive bacteria. Biochim. et Biophys. Acta 5 (3/4):463-471.
- MEGGISON, D.L. Jr. & W.S. MUELLER. 1956. Effect of a quaternary ammonium germicide on electrophoretic mobility of *Escherichia coli* in various salt solutions. Appl. Microbiol. 4(3): 119-121.
- MENGER, O. 1979. On the structures of micelles. Acc. Chem. Res. 12:111-117.
- MILLER, B.F., Z. BAKER & R.W. HARRISON, 1939. Action of a quaternary ammonium type of wetting agent on metabolism of microorganism associated with dental caries. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 42: 705.
- MILLER, B.F. & Z. BAKER, 1940. Inhibition of bacterial metabolism by synthetic detergents. Science 91: 624.
- MILLER, B.F., R. ABRAMS, D.A. HUBER & M. KLEIN, 1943. Formation of invisible non perceptible films on hands by cationic soaps. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 54:174-176.
- MITCHELL, P.D. & G.R. CROWE, 1947. A note on electron micrographs of normal and tyrocidin-lysed *Streptococci*. J. Gen. Microbiol. 1:85.
- MIURA, T, & S. MIZUSHIMA, 1969. Separation and properties of outer and cytoplasmic membrane in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 193:268-479.
- MIZUNO, T. & M. KAGEYAMA, 1978. Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biochim. 84:179-191.
- MUELLER, W.S. & D.B. SEELEY, 1951. Effect of metallic ions on germicidal activity of quaternary ammonium germicide. Soap Sanit. Chem. 27 (11):131-143.
- MYSELS, K.J. & P. MUKERJEE, 1979. Reporting experimental data dealing with critical micelization concentration (c.m.c.'s) of aqueous surfactant systems. Pure Applied Chem. 51 (5): 1085-1089.

- NAKAE, T. & H. NIKAIDO, 1975. Outer membrane as a diffusion barrier in *Salmonella typhimurium*. Penetration of oligo- and polyssaccharides into isolated outer membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer. J. Biol. Chem. 250:7359-7365.
- NAKAE, T. & J. ISHII, 1980. Permeability properties of *Escherichia coli* outer membrane containing pore-forming proteins: comparison between lambda receptor protein and porin for saccharide permeation. J. Bacteriol. 142: 735-740.
- NELSON, C.A., 1971. The binding of detergents to proteins. The maximum amount of dodecyl sulphate bound to proteins and the resistance to binding of several proteins. J. Biol. Chem. 246 (12):3895-3901.
- NELSON, J.W. & J.C. LYSTER, 1946. The toxicity of myristyl-gamma picolinium chloride. J. Am. Pharm. Assoc. 35:89-94.
- NICAS, T.I. & R.E.W. HANCOCK, 1980. Outer membrane protein H₁ of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in abortive and mutational resistance to ethylenediaminetetracetate, polymyxin B, and gentamicin. J. Bacteriol. 143:872-878.
- NICAS, T.I. & R.E.W. HANCOCK, 1983a. Alteration of susceptibility to EDTA, polymyxin B and gentamicin in *Pseudomonas aeruginosa* by divalent cation regulation of outer membrane protein H₁. J. Gen. Microbiol. 129:509-517.
- NICAS, T.I. & R.E.W. HANCOCK, 1983b. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. Isolation of a porin protein protein F deficient mutant. J. Bacteriol. 153:281-285.
- NIKAIDO, H., 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*, transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. Biochem. Biophys. Acta. 433:118-132.
- NIKAIDO, H. & T. NAKAE, 1979. The outer membrane of Gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. 20:163-250.
- NIKAIDO, H. & E. Y. ROSEMBERG, 1981. Effect of solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of *Escherichia coli*. J. Gen. Physiol. 77: 121-135.
- NIKAIDO, H. & E.Y. ROSEMBERG, 1983. Porin channels in *E. coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. J. Bacteriol. 153:241-252.
- NIKAIDO, H. & M. VAARA, 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microb. Rev., 49:1-32.

- NISHIKAWA, K.; S. OI & T. YAMAMOTO, 1979. A bacterium resistant to benzalkonium chloride. Agric. Biol. Chem. 43: 2473-2478.
- NOZAKI, Y., J.A. REYNOLDS & C. TANFORD, 1974. The interaction of a cationic detergent with bovine serum albumin and other proteins. J. Biol. Chem. 249 (14): 4452-4459.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE AOAC, 1965. Quaternary ammonium compounds (QAC). Quantitative methods. Final Action. 10th ed. 458-460. Association of Official Analytical Chemists. Washington.
- ORDAL, E.J. & H.O. HARVORSON, 1939. A comparison of hydrogen production from sugars and formic acid by normal and variant strains of *Escherichia coli*. J. Bact. 38 (2):199-220.
- ORDAL, E.J. & A.F. BORG, 1942. Effect of surface active agents on oxidations of lactate by bacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 50: 332-336.
- OSBORN, M.J., I.E. GANDER, E. PARISI, & J. CARSON 1972. Mechanism and assembly of the outer membrane of *Salmonella thyphimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane proteins. J. Biol. Chem. 247: 3962-3972.
- OSBORN, M.J. & H.C.P. WU, 1980. Proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34:369-422.
- PETROCCI, A.N. Surface-active agents: Quaternary ammonium compounds. In: BLOCK, S. ed. Disinfection, Sterilization and Preservation. Lea & Febiger, 1983. cap. 14, p. 309-329
- PHILLIPS, I., S. EYKYN, M.A. CURTIS & J.J.S. SNELL, 1971. *Pseudomonas cepacia* (multivorans) septicemia in an intensive care unit. Lancet 1:375-377.
- PICARD, M., R. CLUZEL & J.B. BOYER, 1971. Lipophilic character and antibacterial activity in two series of quaternary ammonium compounds. C.R. Seances Soc. Biol. Fil. 165 (2): 305-309.
- PIRT, S.J. Lag phase In: Principles of microbe and cell cultivation. Blakwell Scientific. Oxford, 1975. cap. 19, p. 194-198.
- PITT-RIVERS, R. & F.S.A. IMPIOMBATO, 1968. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. Biochem J. 109: 825-830.

- PLOTKIN, S.A. & R. AUSTRIAN, 1958. Bacteremia caused by *Pseudomonas* sp. following the use of material stored in solutions of a cationic surface active agent. Am. J. Med. Sci., 235:621-627.
- PROUTY, C.C., 1949. Quaternary ammonium compound in dairy sanitation. Milk Plant Month 38 (9):46-48.
- QUISNO, R.; I.W. GIBBY & M.J. FOTER, 1946 The effect of agar upon the germicidal potency of the quaternary ammonium salts. J. Bacteriol., 51: 602.
- QUISNO, R. & M.J. FOTER, 1946. Cetyl pyridinium chloride. I. Germicidal properties. J. Bacteriol., 52:111-117.
- RAHN, O., 1946. Protection of dry bacteria against cationic detergents. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 62:2-4.
- RAHN, O. & W.E.ESELTINE, 1947. Quaternary ammonium compounds. Ann. Rev. Microbiol., 1:173-192.
- RAWLINS, A.L., L.A. SWEET & D.A. JOSLYN, 1943. Relationship of chemical structure to germicidal activity of a series of quaternary ammonium salts. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. 32:11-16.
- REYNOLDS, J.A. & C. TANFORD, 1970. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding rates. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. 66 (3):1002-1007.
- RIBEIRO, A.A. & E.A. DENNIS, 1974. Effect of thermotropic phase transitions of dipalmitoyl phosphatidylcholine on the formation of mixed micelles with triton X-100. Biochem. Biophys. Acta 332:26-35.
- RICHARDS, R.W.E. & K.H. CAVIL, 1976. Electron microscope study of effect of benzalkonium chloride and edetate disodium on cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Pharm. Sci. 65:76-80.
- ROSE, A.H. Responses to the chemical environment In: ROSE, A.H. & J.J. HARRISON ed. The Yeasts. Academic Press, 1987. vol 2, cap. 2, p. 5-40.
- ROTHSTEIN, A. Uptake and translocation. In: AINSWORTH, G.C. & A.S. SUSSMAN, eds. The Fungi. Academic Press, N. Y., 1965. vol. 1, cap. 15, p. 429-455.
- RUSSEL, A.D. & G.W. GOULD, 1988. Resistance of *Enterobacteriaceae* to preservatives and disinfectants. J. Appl. Bacteriol., 64:167s-167s.

- SAKAGAMI, Y, H. YOKOYAMA, H. NISHIMURA, Y. OSE & H. TASHIMA, 1989. Mechanism of resistance to chloride benzalkonium by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 55 (8): 2036-2040.
- SALTON, M.R.J., 1950. The bactericidal properties of certain cationic detergents. Aust. J. Sci. 3(1): 45-60.
- SALTON, M.R.J. & A.E. ALEXANDER, 1950. The release of cellular constituents from *Staphylococcus aureus* treated with cetyltrimethylammonium bromide. J. Gen. Microbiol. 4:11.
- SALTON, M.R.J., 1951. The absorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing constituents and its bactericidal effects. J. Gen. Microbiol. 5 (2): 391-404.
- SALTON, M.R.J., R.W. HORNE & V.E. COSSLETT, 1951. Electron microscopy of bacteria treated with cethylmethylammonium bromide. J. Gen. Microbiol. 5: 405.
- SALTON, M.R.J., 1968. Lytic agents, cell permeability, and monolayer penetrability. J. Gen. Physiol. 52:227s-252s.
- SCHARFF, T.G. & J.L. BECK, 1959. Effects of surface active agents on carbohydrate metabolism in yeast. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 100:307.
- SCHARFF, T.G. & W. C. MAUPIN, 1960. Correlation of the metabolic effects on benzalkonium chloride with its membrane effects in Yeasts. Biochem. Pharmacol. 5:79-86.
- SCHNAITMAN, C.A., 1970a. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 104:890-901.
- SCHNAITMAN, C.A., 1970b. Comparison of the envelope protein compositions of several Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 104:1404-1405.
- SCHNAITMAN, C.A., 1971a. Solubilization of cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X-100. J. Bacteriol. 108(1):545-552.
- SCHNAITMAN, C.A., 1971b. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, triton X-100, and lysosyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 100 (1): 553-563.
- SEVAG, M.G. & O.A. ROSS, 1944. Studies on the mechanism of the inhibitory action of zephiran on yeast cells. J. Bacteriol. 48: 677-682.

- SHELTON, R.S., M.G. van CAMPEN, C.H. TILFORD, H.C. LANG, L. NISONGER, F.J. BANDELIN & H.L. RUBERBOENIG, 1946a. Quaternary ammonium salts as germicides I. Non acylated quaternary ammonium derived from aliphatic amines. J. Am. Chem. Soc. 68:753-755.
- SHELTON, R.S., M.G. van CAMPEN, C.H. TILFORD, H.C. LANG, L. NISONGER, F.J. BANDELIN & H.L. RUBERBOENIG, 1946b. Quaternary ammonium salts derived from cyclic amines. J. Am. Chem. Soc. 68:757-759.
- SHEPPARD, S.E. & A.L. GEDDS, 1945. Amphipathic character of proteins and certain lyophilic colloids as indicated by absorption spectra of dyes. J. Chem. Phys. 13:63-65.
- SHERE, L., 1948. Some comparisons of the disinfecting properties of hypochlorites and quaternary ammonium compounds. Milk Plant Month 37 (3): 66-69.
- SHINODA, K. The formation of micelles In: SHINODA, K., T. NAKAGAWA, B.I. TAMAMUSHI & T. ISEMURA, eds. Colloidal Surfactants. Some physicochemical properties. Academic Press N. Y. cap. I, p. 1-96.
- SIDWELL, R. W., G. J. DIXON & E. Mc. NEIL, 1967. Quantitative studies on fabrics as disseminators of viruses: III. Persistence of vaccinia virus on fabrics impregnated with a virucidal agent. Appl. Microbiol. 15 (4): 921-927.
- SLADE, H.D., 1957. Studies on *Streptococcus pyogenes* III. The effect of trypsin and a cationic detergent on the structure, permeability and metabolism of the cell. J. Gen. Physiol. 41 (1): 63-76.
- SOIKE, K.F., D.D. MILLER & P.R. ELLIKER, 1952. Effects of pH of solutions on germicidal activity of quaternary ammonium compounds. J. Dairy Sci. 25: 764.
- SOPREY, P.R. & R.B. MAXCY, 1968. Tolerance of bacteria for quaternary ammonium compounds. J. Food Sci., 33:536.
- SOTIER, A.L., 1951. The control of microorganism population Part III. Modern Brewery Age. 45 (2): 61-63.
- STEPHEN, E.R. & A. NASIN, 1981. Production of protoplasts in different yeasts by mutase. Can. J. Microbiol. 27: 550.
- STOLS, A.L. & H. VELDSTRA. 1965. Interactions of turnip yellow mosaic virus with quaternary ammonium salts. Virology 25 (4):508-515.

- SWAN, H., 1949. Use of a quaternary ammonium compound for the surgical scrub. Am. J. Surg. 77:24-37.
- TANFORD, C. & J.A. REYNOLDS, 1976. Characterization of membrane proteins in detergent solutions. Biochim. Biophys Acta 457: 133-170.
- TENNENT, J.M., B.R. LYON, M.T. GILLESPIE, J.M. MAY & R.A. SKURRAY, 1985. Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* plasmid-mediate quaternary ammonium resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother., 27:79-83.
- TOMCSIK, J., 1955. Effect of disinfectants and surface active agents on bacterial protoplasts. Proc. Soc. Exp. Biol Med. 89: 459.
- TOMLINSON, E., M.R.W. BROWN & S.S. DAVIS, 1977. Effect of colloidal association on the activity of alkylbenzyltrimethyl ammonium chlorides against *Pseudomonas aeruginosa*. J. Med. Chem. 20:1277.
- TOWNSEND, D.E., N. ASDOWN, L.C. GREED & W.B. GRUBB, 1984. Analysis of plasmids mediating gentamicin resistance in methicillin-resistant *S. aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 13: 347-352.
- TSO, I-FU, H.Y. WANG & C. SHIPMAN Jr., 1989. Interactions of infectious viral particles with a quaternary ammonium chloride (QAC) surface. Biotechnol. Bioeng. 34 (5): 639-646.
- TURRO, N.J., M. GRÄTZEL & A.M. BRAUM, 1980. Photophysical and photochemical processes in micellar systems. Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 19:675-696.
- TWOMEY, A. 1966. Limitations in the use of Q.A.C. detergent-sanitisers. Aust. J. Dairy Technol. 21 (3): 100-103.
- VALKO, E.I. & A.S. DUBOIS, 1944. The antibacterial action of surface active cations. J. Bacteriol. 47:15-25.
- VALKO, E.I. & A.S. DUBOIS, 1945. Correlation between antibacterial power and chemical structure of higher alkyl ammonium ions. J. Bacteriol. 50:481-490.
- VAN ESELTINE, W.P. & G.J. HUCKER, 1948. The effect of organic matter on germicidal action of the quaternary ammonium compounds. Tech. Bull. New York State Agric. Expt Sta 282: 1-20.

- VENTURI, R., 1954. Sull' attività di alcuni detergenti cationici nei confronti di Bac. di Koch. Boll. Inst. Sieroterap. Milan 33 (3/4): 203-208.
- WALDRON, C. & F.LACROUTE, 1975. Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. J. Bacteriol. 122:855-865.
- WASHAM, C.J., W.E. SANDINE & P.R. ELLIKER, 1976a. A strain of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to a quaternary ammonium compound. I. Physiological properties. J. Milk Technol. 39:101-106.
- WASHAM, C.J., W.E. SANDINE & P.R. ELLIKER, 1976b. A strain of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to a quaternary ammonium compound. II. Factor influencing degree of resistance. J. Milk Technol. 39:273-279.
- WASHAM, C.J., W.E. SANDINE & P.R. ELLIKER, 1976c. A strain of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to a quaternary ammonium compound. III. Electron microscopy. J. Milk Technol. 39: 546-550.
- WATKINS, S.H., H. HAYS & P.R. ELLIKER, 1957. Virucidal activity of hypochlorites, quaternary ammonium compounds and iodophors against bacteriophage of *Streptococcus cremoris* J. Milk Food Technol. 20 (3) : 84-87.
- WATKINS, S.H. & P.R. ELLIKER, 1960. Effect of chelating agents on destruction of *Streptococcus cremoris* bacteriophage by quaternary ammonium compounds. J. Milk Food Technol. 23 (12): 360-362.
- WEINER, N.D., F.AART & G. ZOGRAFTI, 1965. Application of the Ferguson principle to the antimicrobial activity of quaternary ammonium salts. J. Pharm. Pharmacol. 17 (6): 350-355.
- WHITE, J., 1953. Effects of common bactericidal substances and of heat on yeast growth and viability. J. Inst. Brewing 58(6):470-479.
- WILLIAMS, J. G. & W.B. GRÄTZER, 1971. Limitations of the detergent-polyacrylamide gel electrophoresis method for molecular weight determination of protein. J. Chromat. 57:121-125.
- WILLIAMS, P., 1988. Role of cell envelope in bacterial adaptation to growth *in vivo* in infections. Biochimie 70:987-1011.

- WILLIAMS, R.E.O., B.C. COOPER, J. MCK DUNCA & E.M. MILES, 1943
Observation on CTAB (cetavlon): its use in surgery.
Lancet 244 (6243): 522-525.
- WILLIAMS, R.E.O., B.C. COOPER, H.C. FAULKNER, & H.E. THOMAS,
1944. Further observations on the use of Cetavlon (CTAB) in
surgery. Lancet 246 (6303): 787-788.
- WILLIAMSON, J.R., R. SCHOLZ, E.T. BROWING, R.G. THURMAN & M.H.
FUKAMI, 1969. Metabolic effects of ethanol in perfused rat
liver. J. Biol. Chem. 244:5044-5054.
- YOSHIMURA, F. & H. NIKAIDO, 1982. Permeability of *Pseudomonas*
aeruginosa outer membrane to hydrophilic solutes.
J. Bacteriol. 152:636-642.
- YOSHIMURA, F., L.S. ZALMA & H. NIKAIDO, 1983. Purification and
properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin.
J. Biol. Chem. 258:2208-2314.
- ZIMMERMANN, W. & A. ROSSELET, 1977. Function of the outer
membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to
beta lactam antibiotics.
Antimicrob. Agents Chemother. 12:368-372.