
Ciências Biológicas Integral

Lucas Prado Leite

**Avaliação da Atividade Antimicrobiana de
Ramnolipídio Contra *Cutibacterium acnes*
(*Propionibacterium acnes*)**



Rio Claro - SP
2023

Lucas Prado Leite

**Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Ramnolipídio Contra *Cutibacterium acnes*
(*Propionibacterium acnes*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Rio Claro - SP
2023

L533a	Leite, Lucas Prado Avaliação da atividade antimicrobiana de ramnolipídio contra Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) / Lucas Prado Leite. -- Rio Claro, 2023 22 f. : tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Jonas Contiero 1. Biossurfactante. 2. Ramnolipídio. 3. Acne. 4. Cutibacterium acnes. 5. Antimicrobiano. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

LUCAS PRADO LEITE

Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Ramnolipídio Contra *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro,
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas Integral

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jonas Contiero

Prof. Dr. Roberta Barros Lovaglio

Prof. Dr. Vinicius Luiz da Silva

Aprovado em: 03 de Julho de 2023

Assinatura do discente



Assinatura do(a) orientador(a)



AGRADECIMENTOS

Por este trabalho agradeço, primeiramente, a Deus Pai todo poderoso, por permitir a minha vida e me conceder todos os meios para perseverar no dia a dia.

Agradeço a meus pais, André Leite e Fernanda Sbruzzi Prado pelo apoio financeiro para me manter em Rio Claro, pela motivação diária, pelo cuidado e educação que me deram.

Agradeço a meus irmãos, Pedro Blanc Leite e Ricardo Blanc Leite, que mesmo distantes servem diariamente como fonte de motivação e inspiração para eu ser melhor.

Agradeço minha namorada Eduarda Araujo dos Santos, por ser uma companheira gentil e compreensiva que me apoiou e ajudou na realização deste trabalho

Agradeço a República 7 Anões, minha primeira casa em Rio Claro, e seus moradores, Davis Larrubia (Gordo), Alécio (Maloca), Renan (Bolha), Lenin (Stalin), Rodrigo (Bolinho), Luigi (Kubanacan) e Lucas, por me receberem aqui e propiciado momentos de descontração e diversão todos esses anos.

Agradeço a meu amigo William Jay Han, que mesmo distante, me apoiou, conversou e continuou sendo meu grande amigo todos esses anos de faculdade, nas alegrias e nas dificuldades.

Agradeço ao professor Dr. Jonas Contiero, por ter me recebido, orientado e recomendado este tema de pesquisa.

Agradeço ao IPBEN por permitir a realização desse trabalho e aos meus colegas que me ajudaram com conhecimento teórico e prático, além de promover momentos de descontração tão relevantes. Devo citar, especificamente, Ingrid Yoshimura, que me ensinou e me auxiliou em tudo ao longo da pesquisa. Raphael Neves, Matheus Lacorte e Larissa Cavichioli, por serem, além de colegas de laboratório, serem meus amigos próximos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq e à Pró-Reitoria de Pesquisa- Unesp: PROPeIC/CNPQ por ter financiado esta pesquisa. Agradeço também ao Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro por ter concedido espaço e material suficientes para execução deste trabalho.

RESUMO

O debate e a preocupação ambiental aceleraram a necessidade de desenvolver produtos que substituam os derivados da indústria petroquímica, a fim de diminuir a poluição e a contaminação ambiental. Dentro do mercado de cosméticos, ainda se utiliza de matéria prima derivada do petróleo para confecção de produtos de higiene. Contudo, tais produtos têm causado reações alérgicas aos consumidores e, produtos destinados à saúde da pele não se mostram tão eficientes como antigamente. Nesse cenário, o ramnolipídio, um biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, pode ser utilizado tanto para formulações de cosméticos em geral, quanto para cuidados com a pele. Esse composto apresenta biodegradabilidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana contra algumas espécies, tornando-o um interessante substituto aos surfactantes químicos. Dessa forma, essa pesquisa visou analisar a atividade antimicrobiana do ramnolipídio contra a bactéria *Cutibacterium acnes*, causadora da acne. A concentração inibitória mínima do biossurfactante foi determinada a partir de ensaios *in vitro*, assim como os efeitos do mesmo na membrana celular da bactéria através de teste de hidrofobicidade com hexadecano. A concentração inibitória e bactericida mínima foi determinada sendo 100 mg/L e 400 mg/L, respectivamente, e apresentando alterações significativas na hidrofobicidade celular e na permeabilidade da membrana.

Palavras-chave: Biossurfactante; Ramnolipídio; Acne; *Cutibacterium acnes*; Antimicrobiano.

ABSTRACT

The debate and environmental concern accelerated the need to develop products that replace those derived from the petrochemical industry, in order to reduce pollution and environmental contamination. Within the cosmetics market, raw material derived from petroleum is still used to make hygiene products. However, such products have caused allergic reactions in consumers and products intended for skin health are not as efficient as they used to be. In this scenario, rhamnolipid, a biosurfactant produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, can be used both for cosmetic formulations in general and for skin care. This compound presents biodegradability, biocompatibility and antimicrobial activity against some species, making it an interesting substitute for chemical surfactants. Thus, this research aimed to analyze the antimicrobial activity of rhamnolipid against the bacterium *Cutibacterium acnes*, which causes acne. The minimum inhibitory concentration of the biosurfactant was determined from in vitro assays, as well as its effects on the bacterial cell membrane through a hydrophobicity test with hexadecane. The minimum inhibitory and bactericidal concentration was determined to be 100 mg/L and 400 mg/L, respectively, and showed significant changes in cell hydrophobicity and membrane permeability.

Keywords: Biosurfactant; Rhamnolipid; Acne; *Cutibacterium acnes*; antimicrobial.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	Revisão Bibliográfica.....	7
2.1	Biossurfactante.....	7
2.1.1	<i>Ramnolipídio</i>	9
2.2	Cosméticos.....	10
2.3	<i>Acnes Vulgaris</i>	11
3	Objetivos.....	12
3.1	Objetivos Gerais.....	12
3.2	Objetivos Específicos.....	12
4	Metodologia.....	12
4.1	Produção de Ramnolipídio.....	12
4.1.1	Microrganismo.....	12
4.2	<i>Meios de Cultura</i>	13
4.2.1	Caldo Lisogênico(LB).....	13
4.2.2	Meio Mineral com Tampão Fosfato(MMTF).....	13
4.3	Condições de Cultivo das Fermentações.....	13
4.3.1	Preparo do Inóculo.....	13
4.3.2	Fermentação para produção de Tensoativo.....	13
4.3.3	Extração dos Ramnolipídios.....	14
4.3.3.1	Análise em HPLC(High Perfomance liquid Cromatography).....	14
4.4	Preparo da solução de Ramnolipídio.....	14
4.5	Cultivo de <i>Cutibacterium acnes</i>	15
4.5.1	Reativação da bactéria liofilizada.....	15
4.5.2	Meio de Cultura.....	15
4.5.3	Avaliação da Suscetibilidade da bactéria ao Ramnolipídio.....	15
4.6	Avaliação do Impacto do Ramnolipídio na Membrana Celular.....	15
4.7	Teste de Hidrofobicidade Celular.....	16
4.8	Teste de Permeabilidade da Membrana Celular.....	16
5	Resultados e Discussão.....	17
5.1	Ramnolipídio Obtido.....	17
5.2	Determinação da concentração inibitória mínima(CIM) e concentração bactericida mínima(CBM).....	17
5.3	Teste de Hidrofobicidade Celular.....	18
5.4	Teste de Permeabilidade da Membrana Celular.....	20
6	Conclusão.....	21

1. INTRODUÇÃO

A pele humana é o maior órgão do corpo e apresenta uma microbiota complexa que a habita provendo sua homeostase e funcionamento. Suas principais funções são atuar como uma barreira contra bactérias e evitar a perda de fluídos, assim como a entrada de toxinas. Contudo, a pele nem sempre é capaz de evitar a presença de patógenos, resultando na manifestação de algumas doenças, como a acne. (ADU *et al.*, 2020). A acne é uma doença de pele causada pela bactéria *Cutibacterium acne*, que age como um patógeno oportunista, inflamando e acumulando sebo em diversas regiões do corpo, principalmente aquelas que possuem muitas glândulas sebáceas (MOHIUDDIN, 2019). Manifestando-se principalmente entre adolescentes, a acne deixa cicatrizes na pele que podem durar a vida toda afetando tanto a saúde da pele, quanto a autoestima dos pacientes com graus severos da doença. Observou-se, em 2013 em média, uma procura anual de 3,5 milhões de pessoas em busca de tratamento para esse problema (DAWNSON; DELLAVALLE, 2013).

Os ramnolipídios(glicolipídios) são biossurfactantes, que apresentam cadeia de ácido graxo na região apolar e açúcar na região polar. São utilizados na indústria cosmética para formulação de soluções como cremes, shampoos e desodorantes devido a sua capacidade de misturar fases, reduzir tensão superficial, apresentar atividade antimicrobiana e bactericida e ainda possuírem compatibilidade com a pele, evitando reações alérgicas (MOLDES, *et al.*, 2020). O ramnolipídio é produzido principalmente pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, e já consta na literatura sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Supõe-se que essa propriedade está atrelada a sua natureza anfipática, capaz de ligar-se à camada lipídica da membrana celular alterando sua fluidez e permeabilidade ou, até mesmo, danificando sua estrutura causando dano celular (ELSHIKH *et al.*, 2017).

Nesse contexto, esse projeto visa avaliar a propriedade antimicrobiana do biossurfactante ramnolipídios contra *Cutibacterium acnes*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biossurfactante

Biossurfactantes são moléculas de origem biológica, produzidas por fungos, bactérias e leveduras. Esses compostos apresentam a capacidade de diminuir a tensão superficial e

interfacial de um meio líquido e são sintetizados pelos microrganismos a fim de possibilitar seu crescimento em meios hidrofóbicos e facilitar absorção de componentes, como hidrocarbonetos. Devido a sua composição anfipática, isto é, uma porção polar e uma porção apolar, a molécula torna-se solúvel em soluções água/óleo (SINGH, *et al.*, 2018).

Essas moléculas são classificadas de acordo com sua estrutura molecular, podendo ser: glicolipídio, lipopeptídeo, surfactante polimérico, ácido graxo e fosfolipídio (ROY, 2017). Glicolipídios são os biossurfactantes mais conhecidos, sendo constituídos por açúcar na região polar e cadeia de ácido graxo. Lipopeptídeos são biossurfactantes compostos por numerosas cadeias de polipeptídios ligados por um lipídio. No caso de surfactantes poliméricos, tem-se como exemplo o heteropolissacarídeo bioemulsificante, um composto extracelular anfipático poliiônico produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* para emulsificar e facilitar a dispersão de hidrocarbonetos no meio, facilitando seu crescimento. Por fim, os biossurfactantes compostos por ácido graxos e fosfolipídicos são produzidos por poucos fungos e bactérias durante o crescimento na presença de n-alcanos e não apresentam boa atividade emulsificante quando comparado com os outros biossurfactantes (ROY, 2017).

Na busca por produtos que não agredam o ambiente, os biossurfactantes se mostram candidatos a substituir os surfactantes químicos tradicionais devido a sua baixa toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Dessa forma, podem ser utilizados na indústria petrolífera, alimentícia, médica e cosmética (SINGH *et al.*, 2018).

Os biossurfactantes apresentam alto valor na indústria petrolífera e são utilizados para produção de petróleo, na formulação de óleos lubrificantes e, principalmente, como biorremediadores. A capacidade do biossurfactante emulsificar e dispersar hidrocarbonetos auxilia a degradação destes no ambiente, reduzindo o dano ecológico causado por derramamento de óleo. Na indústria médica, a surfactina é amplamente utilizada por apresentar atividade antifúngica assim como antiviral, e pode ser aplicada na prevenção de biofilme em cateteres (NITCHSCKE; PASTORE, 2002).

Na indústria cosmética, há uma preferência pelo uso de biossurfactantes glicolipídicos devido às suas propriedades físico-químicas, atividade biológica e compatibilidade com a pele. Eles têm sido usados como matéria prima na produção de cosméticos, visto que a quantidade de minerais na água não afeta a capacidade de emulsificação do produto. Além disso possuem atividade bacteriostática e bactericida, o que possibilita seu uso na formulação de desodorantes, cremes corporais e shampoos (MOLDES *et al.*, 2020). Em 2017, o mercado global de biossurfactantes movimentou 4,2 bilhões de dólares e, espera-se que chegue a

5,52% em 2022, com um crescimento anual de 5,6%. O aumento da demanda por biossurfactantes se deu, primariamente, na área de produtos de higiene pessoal, seguido por produtos de limpeza doméstica. Em relação aos tipos, os biossurfactantes glicolipídicos e lipopeptídicos apresentaram a maior demanda, com destaque para os glicolipídicos, cuja taxa de crescimento anual é a maior. Isso se dá devido ao seu nível de pureza e funcionalidade. Suas aplicações ocorrem principalmente na produção de produtos químicos voltados para agricultura, produtos farmacêuticos e produtos de cuidado pessoal (MARKETS; MARKETS, 2017).

2.1.1 Ramnolipídio

Ramnolipídio é um tipo de biossurfactante classificado como glicolipídio. Os ramnolipídios são classificados dessa maneira por apresentarem um açúcar na porção hidrofílica, podendo ser uma ou duas moléculas de ramnose, e uma ou duas cadeias de ácido graxo na parte hidrofóbica. Essas moléculas são produzidas, principalmente, pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, através de bioprocessos (YOSHIMURA, *et al* 2022).

O ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa* é caracterizado por uma mistura de homólogos, onde a quantidade de ramnoses pode variar, assim como a cadeia de ácido graxo, que pode apresentar número variado de carbonos e insaturações (LANG e WAGNER, 1987). As propriedades deste tensoativo são capacidade de emulsificação, baixa toxicidade e biodegradabilidade. Além disso, apresentam atividade antimicrobiana já constatada na literatura, principalmente em bactérias gram-positivas (ELSHIKH *et al.*, 2017).

Elshikh *et al.* (2017) demonstraram a atividade bacteriostática dos ramnolipídios e seus homólogos nas espécies: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Neisseria mucosa* e *Streptococcus sanguinis*. Haba *et al.* (2003) determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) de ramnolipídios para as bactérias Gram-positivas: *Arthrobacter oxydans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* var. *mycoide*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium phlei* e *Clostridium perfringens*. A maior CIM encontrada foi de 128 µg/mL para *A. oxydans*, *M. phlei*, *C. perfringens* e a menor foi de 16 µg/mL para *B. subtilis*.

A atividade antimicrobiana ainda não é bem entendida, contudo, sugere-se que devido sua natureza anfipática, a molécula consegue se ligar a membrana celular alterando sua permeabilidade e causando dano celular (ELSHIKH *et al.*, 2017). De acordo com Ortiz *et al.*

(2006), a espécie homóloga di-ramnolipídio (RhaRhaC₁₀C₁₀) é capaz de ligar-se à membrana celular bacteriana e alterar sua fluidez e permeabilidade, causando dano celular. A capacidade antimicrobiana dos ramnolipídios está atrelada ao pH, e apresenta melhor desempenho em meios ácidos. Isso se deve ao fato do ramnolipídio se comportar como um componente não iônico nessas condições, fato que facilita a ligação entre o seu terminal carboxílico com a porção aniônica da membrana celular (ADU *et al.*, 2020).

Outra propriedade antimicrobiana dos ramnolipídios é o seu efeito em biofilmes. Por conta da sua capacidade de emulsificar e solubilizar, o ramnolipídio é capaz tanto de dissolver biofilmes existentes, quanto de prevenir a fixação deles no meio. Por conta dessas propriedades, os ramnolipídios têm sido utilizados na prevenção de biofilmes em equipamentos médicos e industriais e na formulação de cosméticos para tratar e prevenir doenças de pele como a acne (ADU *et al.*, 2020).

2.2 Cosméticos

No Brasil, um produto cosmético é definido como: qualquer substância natural ou sintética utilizada nas regiões externas do corpo para fins estéticos, correção de odores, manutenção de bom estado e limpeza (GASPERI, 2015).

Em 2020, o Brasil concluiu o ano com um crescimento nas vendas de cosméticos em 4,7%, atingindo 122.408 bilhões de reais. Diversos produtos obtiveram crescimento nas vendas, mas deve-se destacar os produtos de cuidado com a pele, cuja alta foi de 21,9% (ABIHPEC. 2021). De acordo com Pachione (2021) o consumo de produtos de higiene e cuidado pessoal também foi afetado pela pandemia da Sars-CoV-2, que se iniciou no ano de 2019, com destaque para os produtos voltados para o tratamento da acne, que tiveram um aumento de 28% comparado ao primeiro trimestre do último ano. Isso se deve a intensificação de problemas emocionais estimulados pelo estresse da pandemia e o período de isolamento social.

Atualmente, os surfactantes sintéticos ainda são empregados na formulação de cosméticos, principalmente derivados da indústria petroquímica. Apesar de serem eficientes para formulações de produtos emulsificantes, sua composição pode ser prejudicial em altas concentrações devido a solubilização epidermal e intracelular dos lipídios da pele, afetando a estrutura da epiderme, causando irritação e inflamação (ADU *et al.*, 2020). Essas problemáticas demonstram a necessidade de substituir esses compostos em formulações

atuais, por componentes mais compatíveis com a pele humana. Tais requisições passaram a ser mais comuns e frequentes. No Brasil houve um aumento na demanda no mercado de cosméticos e de produtos de limpeza por produtos de alto desempenho e menos nocivos, que resultou em um aumento na produção de tensoativos anfóteros em uma média de crescimento de 5% ao ano entre 2012 e 2018 (BNDES, 2011).

2.3 *Acnes vulgaris*

A pele humana possui uma comunidade bacteriana necessária para sua manutenção e saúde, onde estão presentes três principais gêneros de bactéria, *Corynebacteria*, *Propionibacteria* e *Staphylococci* (DRÉNO *et al.*, 2018). No meio da microbiota encontra-se a *Cutibacterium acnes*, uma bactéria comensal que habita a pele e epitélios queratinizados. Elas são bactérias Gram-positivas, anaeróbios, aerotolerantes (BOJAR; HOLLAND, 2004). Essa espécie, que pertencia anteriormente ao gênero *Propionibacteria* spp, atua na homeostase e proteção contra a colonização de outros microrganismos. Contudo, em determinadas situações também pode agir como um patógeno oportunista, manifestando a acne (DRÉNO *et al.* 2018).

Acnes vulgaris ou acne, é uma doença de pele caracterizada pela inflamação da região, bem como pelo acúmulo de células mortas e óleos derivados da pele. Ela é causada pela união do óleo produzido pelas glândulas sebáceas com a reação metabólica da *Cutibacterium acnes*, embora a participação da bactéria na aparição da doença não esteja totalmente elucidada (MOHIUDDIN, 2019).

A acne afeta 90% dos adolescentes, e metade deles permanecem com sintomas na fase adulta. Estima-se que 1% dos homens e 5% das mulheres aos quarenta anos ainda terão lesões decorrentes da acne. A acne também afeta o psicológico dos pacientes, em relação à aparência e autoestima. Dados do Reino Unido revelam que essa condição movimenta 3,5 milhões visitas anuais a consultórios médicos para tratamento (DAWNSON; DELLAVALLE, 2013).

Análises genômicas permitiram diferenciar *Cutibacterium acnes* nas seguintes linhagens: IA (IA1, IA2), IB, II, III (DRENÓ *et al.*, 2018). As linhagens foram separadas baseadas em sequência genética, atividade biológica referente a enzimas extracelulares produzidas (lipases, RNases, neuraminidases) e associação com diferentes doenças clínicas como acne e hipomelanose (PLATSIDAKI; DESSINIOTI, 2018). Essas diferentes linhagens foram associadas com diferentes graus de lesões causadas por acne, sendo a linhagem IA1

associado aos casos mais graves de acne e a linhagem III associada com a manifestação da hipomelanose macular (PLATSIDAKI; DESSINIOTI, 2018).

C. acnes também apresenta em seus genes, os mecanismos para produção de biofilme microbiano, um tipo de organização dos microrganismos encontrada na patofisiologia da acne (DRÉNO *et al*, 2018). Um biofilme é um agregado de microrganismos envolvidos por matriz extracelular. No caso da *C. acnes* é sugerido que o biofilme penetre na camada de sebo dos folículos e funcione como um adesivo. Dessa forma, uma vez estabelecido o biofilme, a *C. acnes* terá acesso a um substrato nutricional, aumentando sua atividade metabólica e, por sua vez, a ação inflamatória (PLATSIDAKI; DESSINIOTI, 2018).

Devido ao uso de antibióticos para tratamento desde 1960, nota-se que nos últimos anos a *C. acnes* adquiriu resistência aos tratamentos tradicionais. Embora ainda seja vulnerável a alguns antibióticos, como a penicilina, os tratamentos utilizando pomadas e cremes anti-acne já não se mostram tão eficazes quanto antes (BOJAR; HOLLAND, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Estudar a atividade antimicrobiana do ramnolipídio contra a bactéria *Cutibacterium acnes*.

3.2 Objetivos Específicos

2. Determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos ramnolipídios;
3. Avaliar os efeitos do ramnolipídio na hidrofobicidade celular;
4. Avaliar os efeitos do ramnolipídio na permeabilidade celular.

4. METODOLOGIA

4.1 Produção de Ramnolipídios

4.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado para a produção dos ramnolipídios foi *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 (mutante-randômico) proveniente do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) – UNESP – Rio Claro. O microrganismo está armazenado em ultrafreezer à -80°C em tubos criogênicos contendo caldo lisogênico com glicerol 20 %.

4.2 Meios de Cultura

4.2.1 Caldo Lisogênico (LB)

A composição do meio utilizado para o pré-cultivo do microrganismo em (g/L): triptona – 10; extrato de levedura – 5,0; NaCl – 10 (MÜLLER *et al.*, 2010).

4.2.2 Meio Mineral com Tampão Fosfato (MMTF)

Este meio foi utilizado para o preparo do inóculo e condução das fermentações em frascos Erlenmeyer. Sua composição consiste em (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl – 1; NaNO_3 - 10; K_2HPO_4 – 0,3; óleo de semente de goiaba - 100 e 1 mL/L da solução de elementos traços. A solução traço é composta por (g/L): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,28; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,4; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,8 (MÜLLER *et al.*, 2010).

4.3 Condições de Cultivo das Fermentações

4.3.1 Preparo do Inóculo

Primeiramente os microrganismos foram pré-cultivados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de caldo lisogênico e 100 μL da cultura estoque de *P. aeruginosa* LBI 2A1. A incubação foi feita em mesa agitadora tipo “shaker” Multitron Standard Infors HT, durante 24 horas à 37°C e 200 rpm. Em seguida, 2,5 mL do caldo foram transferidos para o inóculo contendo meio mineral e metade da concentração da fonte de carbono usada no meio de fermentação. O cultivo ocorreu em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio sob as mesmas condições citadas anteriormente. Foram realizadas leituras de absorbância ($\lambda = 580 \text{ nm}$) através de espectrofotômetro Bel Spectro SP-2000. Estas medidas foram utilizadas para inoculação dos meios de fermentação resultando em uma densidade óptica inicial de 0,1.

4.3.2 Fermentação para produção do tensoativo

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio mineral. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e em mesa agitadora tipo “shaker” a 200 rpm, 37°C por 96 horas. A solução de elementos traços foi adicionada nos tempos 0, 20, 40 e 70 h, seguindo Müller *et al.* (2010; 2011).

4.3.3 Extração dos Ramnolipídios

A porção hidrofílica foi acrescida de ácido fosfórico 85% 1:100 (v/v) e acetato de etila 1:1,25 (v/v), que possibilitaram a precipitação e extração do tensoativo. As amostras foram centrifugadas por 30 min, 10.000 rpm a 10°C. A extração com acetato de etila foi realizada novamente (MÜLLER *et al.*, 2010; 2011). Em seguida, o surfactante foi evaporado a 40°C em evaporador rotativo Fisatom mod. 802 e bomba a vácuo.

4.3.3.1 Análise em HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

O biossurfactante produzido e coletado foi analisado por HPLC para confirmação do mesmo a partir da comparação dos tempos de retenção com padrões de ramnolipídios da AGAE Technologies. Para a análise, o composto foi acrescido de um anel aromático pelo processo de derivatização, tornando possível a sua visualização em detector UV. O ramnolipídio foi diluído em acetonitrila 0,5 mg/mL e 360 µL dessa solução foram acrescidos de 20 µL de trietilamina 67,5 mM e 20 µL de brometo de 4-bromo-fenacil 135 mM. A solução foi mantida a 1400 rpm, 60°C por 1,5 horas em banho seco com agitação AG-100 Agimaxx.

As análises de quantificação foram feitas com um equipamento HPLC Shimadzu acoplado a um detector UV SPD 20-A, de acordo com o descrito por Müller *et al.* (2010). Para a calibração do HPLC utilizou-se solução padrão de mono- e di-ramnolipídio – 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 g/L. Para a fase estacionária, utilizou-se a coluna de fase reversa NST 18 100 – C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm) a 30°C. As fases móveis foram Solução A – água ultrapura/ metanol (v/v) 95:5 e Solução B – metanol/ água ultrapura (v/v) 95:5. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/ min durante 35 min e os tempos de retenção foram $24,7 \pm 0,1$ min para RhaRhaC₁₀C₁₀ e $25,9 \pm 0,1$ min para RhaC₁₀C₁₀.

4.4 Preparo da Solução de Ramnolipídio

Com o ramnolipídio extraído, foi-se pesado 1 grama que foi diluído em água destilada com Hidróxido de Sódio(NaOH) para se ter uma solução do composto. Ao final do preparo, a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 20 min. e utilizada durante todo o projeto.

4.5 Cultivo de *Cutibacterium acnes*

4.5.1 Reativação da Bactéria Liofilizada

A cepa de *Cutibacterium acnes* foi reativada em meio líquido RCM e armazenada em jarra de anaerobiose a 37°C por 72 horas.

4.5.2 Meio de Cultura

A bactéria *Cutibacterium acnes* foi inoculada em placa de Petri contendo meio sólido RCM, cuja formulação consiste em (g/L): extrato de carne - 10, extrato de levedura – 3,0, triptona - 10, glicose - 10, cloreto de sódio 5,0, cisteína (cloridrato) – 0,50, amido solúvel – 1,0, acetato de sódio 3,0, ágar bacteriológico – 0,5. O pH foi ajustado para 7,1 a 25°C. As placas foram armazenadas em jarras de anaerobiose a 37°C por 7 dias (BORREL, *et al.* 2019).

4.5.3 Avaliação da suscetibilidade da bactéria ao Ramnolipídio

Foram realizados testes para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do ramnolipídio frente a cultura de bactéria Gram-positiva *Cutibacterium acnes*. Para as amostras em que foram encontradas a CIM, também foi medida a concentração bactericida mínima (CBM).

Primeiramente foram preparadas 8 placas com meio RCM com adição de ramnolipídio nas concentrações: 5,10,20,30,40,50,100,250,500 µg/mL, além de uma placa controle (sem adição de biosurfactante). Em seguida, uma alíquota de 10 µL da cultura de bactéria reativada foi transferida para as placas, as quais foram armazenadas em jarras de anaerobiose a 37°C por 72 horas. Passado o tempo de armazenamento, foi realizada uma avaliação visual para constatar se houve crescimento. Foram realizados testes para determinação da CBM nas placas que apresentaram inibição de crescimento microbiano. A CBM foi determinada como a menor concentração utilizada em que não houve crescimento bacteriano.

4.6 Avaliação do Impacto do Ramnolipídio na Membrana Celular

O microrganismo foi cultivado em tubos de vidro contendo meio líquido RCM a 37°C até atingir a densidade óptica (D.O) de 0,5 a 600 nm. A suspensão foi então tratada com RL na CBM por 1 hora, 150 rpm a 37°C. Um tubo foi mantido sem adição do tensoativo para ser usado como controle. Os testes foram realizados em triplicata. (CERESA *et al.*, 2021).

4.7 Teste de Hidrofobicidade Celular

Para avaliação da aderência celular ao hexadecano as células bacterianas foram centrifugadas (4000 rpm por 15 minutos), lavadas e ressuspensas em uma solução tampão PUM (pH 7.1, cuja composição consiste em (g/L): K₂HPO₄ 3H₂O 22,2; KH₂PO₄ 7,2; uréia 1,8; MgSO₄ 7H₂O 0,2. Houve transferência de 4 mL da suspensão para tubos contendo 1 mL de hexadecano. Os tubos foram agitados por 2 minutos em vórtex. Após a agitação, quando as fases foram separadas, coletou-se a fase aquosa, para mensuração da D.O a 550nm. (ROSENBERG *et al.*, 1980; ALLEGRONE *et al.*, 2021).

A hidrofobicidade celular foi determinada de acordo com a Equação 1, segundo Ceresa *et al.* (2021):

$$1 - \left(\frac{D.O. fase aquosa}{D.O. Suspensão celular inicial} \right) \times 100$$

4.8 Teste de Permeabilidade da Membrana Celular

A permeabilidade da membrana foi avaliada através da penetração de cristais violetas. As células foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e ressuspensas em solução PBS (Phosphate Buffer Saline) contendo cristal violeta a 10 µg/mL para obtenção da absorbância em espectrofotômetro. Depois foram incubadas a 37°C, 150 rpm por 20 minutos. Após esse tempo, as células serão coletadas por centrifugação 4000 rpm por 15 minutos e sua absorbância foi medida a 590nm. (CERESA *et al.*, 2021).

A permeabilidade da membrana foi calculada de acordo com a Equação 2:

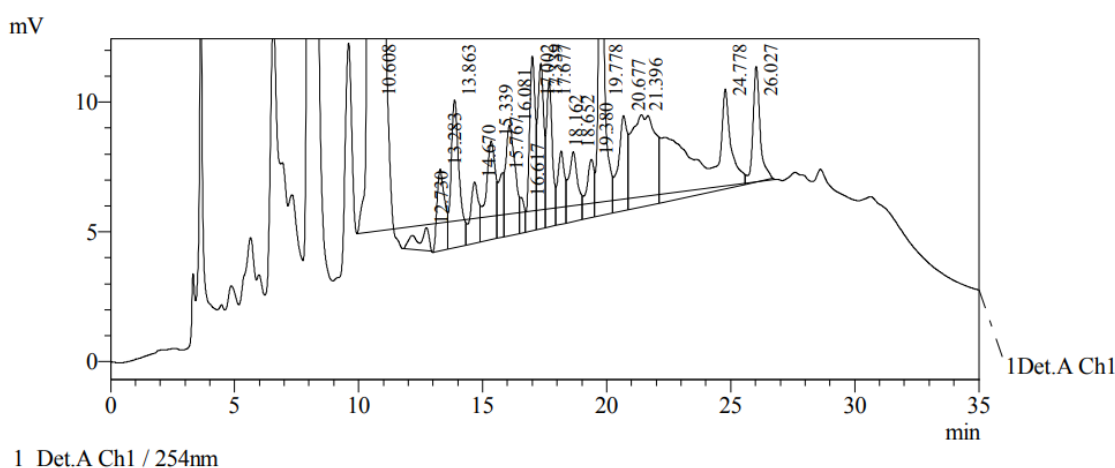
$$\% \text{cristal violeta} = D.O. \left(\frac{\text{Amostra final}}{\text{Solução cristal violeta}} \right) \cdot 100$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ramnolipídio obtido

O biossurfactante produzido pelo processo fermentativo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* resultou em um líquido viscoso de cor âmbar e a comparação dos mesmo obtidos por HPLC pode ser visualizada conforme a figura a seguir:

Figura 1- Cromatograma por HPLC-UV (254 nm) da amostra de ramnolipídios obtidas do cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando óleo de semente de goiaba.



Fonte: Elaborada pelo autor.

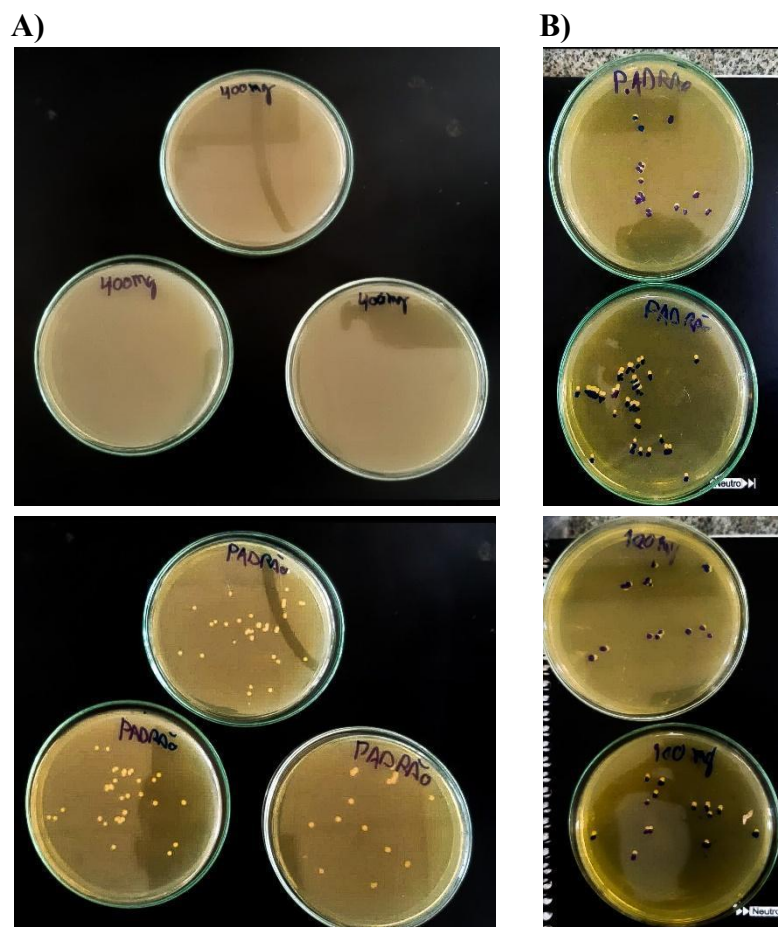
Os picos produzidos no gráfico no tempo 24.778 e 26.027 representam o mono di-ramnolipídio e o mono-ramnolipídio, respectivamente. Dessa forma, confirma-se que o composto é, de fato, ramnolipídio.

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima determinada foi 100 µg/mL, concentração esta que apresentou uma redução de 50% no crescimento da colônia, já concentrações inferiores a esta

não apresentaram efeito significativo. A concentração bactericida mínima foi de 400 $\mu\text{g/mL}$, onde cessou completamente o aparecimento de colônias comparado com o padrão.

Figura 2 - Placas de Petri na concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. A) Placa controle e com ramnolipídio 400 mg/L. B) Placa de grupo controle e com ramnolipídio 100 mg/L.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Com o resultado obtido e, baseando-se na literatura, especula-se que tanto a redução do número de colônias quanto a inibição completa aconteçam em função da propriedade anfipática dos ramnolipídios. A presença de uma porção polar e outra apolar torna capaz de se ligar à membrana celular das bactérias e causando alteração da fluidez da membrana, prejudicando sua seletividade de componente, ou causando uma lesão na membrana celular,

levando a morte da bactéria. A elucidação das ações do ramnolipídio sobre a membrana celular foram analisadas nos testes posteriores à determinação da CIM e CBM. O teste realizado, até o momento, foi o de hidrofobicidade.

5.3 Teste de Hidrofobicidade Celular

Após determinar a CIM e CBM, foram analisados os efeitos das mesmas sobre a bactéria. O teste de hidrofobicidade permitiu analisar o quanto o ramnolipídio reduziu a hidrofobicidade da membrana celular na concentração bactericida mínima, através da interação da célula com o hexadecano, um componente hidrofóbico. A densidade ótica da suspensão celular inicial foi, para ambos, grupo controle e grupo tratado com ramnolipídio 400 mg/L, com uma absorbância de 0,3. Com a adição da fase aquosa, a densidade ótica foi novamente medida, resultando em uma absorbância de 0,007 e 0,109 para grupo controle e com ramnolipídio, respectivamente.

Foi constatada uma aderência ao hexadecano de 98% no grupo controle, enquanto no grupo tratado com ramnolipídio 400 mg/L, a aderência foi de 63%.

Com esse resultado, é notável uma grande alteração nas propriedades na membrana celular após a adição de ramnolipídio na CBM. A redução na aderência ao hexadecano mostra que a capacidade hidrofóbica da membrana celular foi afetada. Esse efeito acarreta alterações bioquímicas que comprometem a bactéria e seu funcionamento comum, podendo-se explicar tanto a redução de colônias formadas e eventualmente, com o aumento da concentração de ramnolipídio presente, a morte total da bactéria.

5.4 Teste de Permeabilidade da Membrana Celular

Utilizando a CBM, determinada previamente, foi avaliado se houve aumento na permeabilidade da membrana, após o tratamento com ramnolipídio 400 mg/L. O teste foi realizado em triplicata, com um grupo controle e um na presença do ramnolipídio. O grupo controle apresentou pequenas variações na D.O, tendo com D.O inicial, os seguintes resultados: 0,713; 0,784 e 1,0. Passado o tempo de interação com o cristal violeta, foi

novamente medido e os resultados foram: 0,14; 0,147 e 0,2. O grupo ramnolipídio apresentou uma D.O inicial de: 0,780; 0,813 e 1,20. e a D.O final de: 0,304; 0,324 e 0,493.

Dessa maneira, foi calculada a permeabilidade da membrana de ambos os grupos, mostrando um aumento de 18% de permeabilidade no grupo controle para 40% no grupo com ramnolipídio 400 mg/L.

Esse resultado, mostra outra grande alteração nas propriedades funcionais da célula, podendo responder a causa da inibição do crescimento da mesma, por aumentar a permeabilidade da membrana e impedir que suas funções de barreira seletiva funcionem normalmente, prejudicando completamente suas funções metabólicas ao permitir a entrada de diversos compostos que não compõe seu metabolismo natural.

6. CONCLUSÃO

Ao final, através de testagens por placa de Petri, a CIM e CBM da bactéria *Cutibacterium acnes* foram determinadas sendo, 100 mg/L e 400 mg/L, respectivamente. A presença de ramnolipídio mostrou não funcionar como um princípio ativo que diminui e cessa o crescimento da bactéria, mas como um composto que altera as propriedades hidrofóbicas e de permeabilidade da membrana, de forma considerável, através de interações moleculares do ramnolipídio com a membrana celular bacteriana, que levam a ineficiência do funcionamento pleno da célula, impedindo o microrganismo de se sustentar e desenvolver. A partir disso, a expectativa é de usar o ramnolipídio não como um composto principal para atividade antimicrobiana, mas em adjunto com outros fármacos, auxiliando na eficiência e diminuindo as quantidades necessárias para um uso eficiente contra bactérias.

Referências Bibliográficas

ABIHPEC. Vendas de HPPC Crescem em 4,7% em 2020 e totalizam R\$ 122, 4 Bilhões. **Abihipec.org.br**. 27 maio 2021.

ADU, S. A., NAUGHTON, P. J., MARCHANT, R., & BANAT, I. M. Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. **Pharmaceutics**, 12(11), 1099, 2020.

AK, M. A. comprehensive review of acne vulgaris. **J. Clin. Pharm**, 1(1), 17-45, 2019.

ALLEGRONE, G., CERESA, C., RINALDI, M., & FRACCHIA, L. Diverse Effects of Natural and Synthetic Surfactants on the Inhibition of Staphylococcus aureus Biofilm. **Pharmaceutics**, 13(8), 1172, 2021.

BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social) 2011, https://www.bndes.gov.br/arquivos/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_tensoativos.pdf. Acesso em: 20/04/2022

BORREL, V., THOMAS, P., CATOVIC, C., RACINE, P. J., KONTO-GHIOGHI, Y., LEFEUVRE, L., ... & FEUILLOLEY, M. G. Acne and stress: impact of catecholamines on Cutibacterium acnes. **Frontiers in medicine**, 155, 2019.

CERESA, C., RINALDI, M., TESSAROLO, F., MANIGLIO, D., FEDELI, E., TAMBONE, E. & Fracchia, L. Inhibitory effects of lipopeptides and glycolipids on C. albicans–Staphylococcus spp. Dual-Species Biofilms. **Frontiers in microbiology**, 11, 3516, 2021.

DAWSON, A. L., & DELLAVALLE, R. P. Acne vulgaris. **Bmj**, 346, 2013.

DRÉNO, B., PÉCASTAINGS, S., CORVEC, S., VERALDI, S., KHAMMARI, A., & ROQUES, C. Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 32, 5-14, 2018.

ELSHIKH, M., MOYA-RAMÍREZ, I., MOENS, H., ROELANTS, S. L. K. W., SOETAERT, W., MARCHANT, R., & BANAT, I. M. Rhamnolipids and lactonic sophorolipids: natural antimicrobial surfactants for oral hygiene. **Journal of applied microbiology**, 123(5), 1111-1123, 2017.

GASPERI, Elaine neves de. Cosmetologia I. UNIASSELVI. 2015

HABA, E., PINAZO, A., JAUREGUI, O., ESPUNY, M. J., INFANTE, M. R., & MANRESA, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCIM 40044. **Biotechnology and bioengineering**, 81(3), 316-322, 2003.

MARKETS AND MARKETS. Biosurfactants market by type (glycolipids (sophorolipids, rhamnolipids), lipopeptides, phospholipids, polymeric biosurfactants), application (detergents, personal care, agricultural chemicals, food processing), and region—**Global forecast to 2022**, 2017.

MOLDES, A., VECINO, X., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, L., RINCÓN-FONTÁN, M., & CRUZ, J. M. Biosurfactants: The use of biomolecules in cosmetics and detergents. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 163-185). **Elsevier**, 2020.

MÜLLER, M. M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [s.l.], v. 87, n. 1, p. 167-174, 9 mar. 2010. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2513-7>.

NITSCHKE, M., & PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, 25(5), 772-776, 2002.

PLATSIDAKI, E., & DESSINIOTI, C. Recent advances in understanding *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) in acne. **F1000Research**, 7, 2018.

Renata Pachione. Cosméticos-Consumo de itens de alto valor irá aumentar. 2021. Disponível em: <https://www.quimica.com.br/cosmeticos-consumo-de-itens-de-alto-valor-aumentara/>. Acesso em 21 de agosto. 2021.

ROSENBERG, M., GUTNICK, D., & ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS microbiology letters**, 9(1), 29-33, 1980.

ROY, A. Review on the biosurfactants: properties, types and its applications. **J. Fundam. Renew. Energy Appl**, 8, 1-14, 2017.

SINGH, P., PATIL, Y., & RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal of applied microbiology**, 126(1), 2-13, 2019.

YOSHIMURA, I; SALAZAR-BRYAN, A; M; Faria, A; LEITE, L; LOVAGLIO, R and CONTIERO, J. Guava Seed Oil: Potential Waste for the Rhamnolipids Production. **Fermentation** 2022, 8, 379. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080379>.