



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE RAMNOLIPÍDIO CONTRA CUTIBACTERIUM ACNES (PROPIONIBACTERIUM ACNES)

LUCAS PRADO LEITE; JONAS CONTIERO

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. Por fim, o estudo demonstra que, apesar da boa atividade antimicrobiana e seus efeitos, mais análises devem ser feitas para averiguar todos seus efeitos na célula bacteriana e sugere-se que sejam feitas teste com outros compostos visando um sinergismo que potencialize seus efeitos e diminua a concentração de composto necessária para obter os efeitos antimicrobianos do composto.

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

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 acnes*, 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 biosurfactante ramnolipídios contra *Cutibacterium acnes*. Objetivos: Estudar a atividade antimicrobiana do ramnolipídio contra a bactéria *Cutibacterium acnes*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo de *Cutibacterium acnes*

2.1.1 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.

2.1.2 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, tripton- 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).

2.1.3 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.

2.2 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).

2.3 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):

$$1 - \frac{D.O \text{ fase aquosa}}{D.O. \text{Suspensão celular inicial}} \times 100$$

2.4 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:

$$\% \text{cristal violeta} = D.O. \frac{\text{Amostra final}}{\text{Solução de cristal violeta}} \times 100$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 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 18 não apresentaram efeito significativo. A concentração bactericida mínima foi de 400 µg/mL, onde cessou completamente o aparecimento de colônias comparado com o padrão. 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.

3.2 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.

3.3 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 20 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.

4 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

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_Rela_t4_ten_soativos.pdf. Acesso em: 20/04/2022

BORREL, V., THOMAS, P., CATOVIC, C., RACINE, P. J., KONTO-GHIORGHI, 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 NCBI 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. Biosurfactantes: 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>