



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA CLARA MORAIS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus*
sp. TIM10 EM FORMULAÇÃO DE SHAMPOO**

FORTALEZA-CE

2022

MARIA CLARA MORAIS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE BIODERIVADOS PRODUZIDOS POR *Bacillus*
sp. TIM10 EM FORMULAÇÃO DE SHAMPOO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará como requisito final à obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa Dra. Vânia Maria Maciel Melo

FORTALEZA-CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48a Oliveira, Maria Clara Morais de.

Avaliação de biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp. TIM10 em formulação de shampoo / Maria Clara Morais de Oliveira. – 2022.

28 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. *Malassezia furfur*. 2. Atividade antifúngica. 3. Atividade tóxica. I. Título.

CDD 570

MARIA CLARA MORAIS DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE BISSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus*
sp. TIM10 EM FORMULAÇÃO DE SHAMPOO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito final à obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Microbiologia

Aprovada em: 12/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Mirella Leite Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

RESUMO

Surfactantes são agentes ativos de superfície amplamente utilizados na indústria cosmética. A maioria dessas substâncias são sintetizadas a partir de derivados do petróleo e estão associadas a distúrbios ambientais e problemas na saúde humana. Os biossurfactantes são compostos naturais não tóxicos e biodegradáveis que aparecem como alternativas com melhores atividades tensoativas e emulsificantes, capazes de integrar formulações de cosméticos de forma mais segura e eficaz. O objetivo desse trabalho foi avaliar o controle da *Malassezia* pelos biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus* sp. Tim10. Para verificar a eficiência da preparação realizaram-se testes de emulsão utilizando a preparação autoclavada e não autoclavada e de redução da tensão superficial utilizando o tensiômetro automático. Para aferir a toxicidade foi observado a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) submetidas a diferentes concentrações da preparação de biossurfactante. Foi utilizado o método pour-plate para avaliar o controle da *Malassezia* pelos shampoos comerciais e pela preparação de biossurfactantes na concentração de 400 mg/L. Através dos ensaios realizados, observou-se que a atividade emulsificante dos biossurfactantes autoclavados alcançaram o índice médio de 69,33% de emulsão, e o não autoclavado apresentou 70%. Como resultado do teste de redução da tensão superficial, a preparação de biossurfactantes reduziu em 40% a tensão superficial da água Milli-Q que atingiu valor de 28,9 mN/m. Observou-se que a preparação de biossurfactantes mesmo na concentração mais alta não inibiu a germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa*). Avaliando os shampoos comerciais como controle da *Malassezia* observou-se halo de inibição do crescimento de cada amostra em cada estirpe e foi medido o diâmetro. A preparação de biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus* Tim10 não apresentou atividade de inibição no crescimento dos isolados clínicos de *Malassezia*. Dessa forma, a preparação de biossurfactantes apresenta-se como promissor tensoativo capaz manter sua característica emulsificante após submissão de pressão e calor, além da capacidade de redução da tensão superficial e não toxicidade na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*).

Palavras-chave: *Malassezia furfur*; Atividade antifúngica; Atividade tóxica.

ABSTRACT

Surfactants are active interface agents widely used in the cosmetic industry. Most of these substances are synthesized from petroleum derivatives and are associated with environmental disturbances and human health problems. Biosurfactants are non-toxic and biodegradable natural compounds that appear as alternatives with better surface-active and emulsifying activities, able to integrate cosmetic formulations in a safer and more effective way. The objective of this work was to evaluate the control of *Malassezia* by biosurfactants produced by *Bacillus* sp. Tim10. To verify the efficiency of the preparation, emulsion tests were carried out using the autoclaved and non-autoclaved preparation and the reduction of surface tension using an automatic tensiometer. To assess the toxicity, the germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa*) was observed in different concentrations of the biosurfactant preparation. The pour-plate method was used to evaluate the control of *Malassezia* by commercial shampoos and by the preparation of biosurfactants at a concentration of 400 mg/L. Through the tests carried out, it was observed that the emulsifying activity of the autoclaved biosurfactants reached an average index of 69.33% of emulsion, and the non-autoclaved one presented 70%. As a result of the surface tension reduction test, the biosurfactant preparation showed a surface tension of 40% of the Milli-Q water that consumes a value of 28.9 mN/m. Note that the biosurfactant preparation even at the highest concentration did not inhibit lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination. Evaluating the commercial shampoos as *Malassezia* control, the growth halo of each sample in each strain was observed and the diameter was measured. The biosurfactant preparation produced by *Bacillus* Tim10 did not show follow-up activity on the growth of clinical *Malassezia* isolates. Thus, the preparation of biosurfactants presents itself as a promising surfactant capable of maintaining its emulsifying characteristic after being subjected to pressure and heat, in addition to the ability to reduce surface tension and non-toxicity in the germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa*).

Keywords: *Malassezia furfur*, Antifungal activity; Toxic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química da Surfactina A.....	13
Figura 2- Atividade no controle do crescimento dos isolados clínicos de <i>Malassezia</i> 154DR8, 153DR5, PQBR17 e Procot96 pela difusão das amostras de shampoos comerciais.	19
Figura 3- Teste de suscetibilidade da <i>Malassezia</i> aos biossurfactantes produzidos pelo Bacillus Tim10.	20
Figura 4- Emulsificação do querosene pelo biossurfactante não autoclavado e controle.....	21
Figura 5- Emulsificação do querosene pelo biossurfactante autoclavado e controle.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cepas produtoras de lipopeptídeos e suas aplicações	12
Tabela 2- Identificação molecular das estirpes clínicas de <i>Malassezia spp.</i>	16
Tabela 3- Diâmetro médio em cm do halo de inibição do crescimento do crescimento de <i>M.furfur</i> 154DR8, 153DR5, PQBR17 e Procot96 pela difusão das amostras de shampoo em meio sólido.....	20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Biossurfactantes	11
2.2 Potencial dos biossurfactantes como antimicrobianos	12
2.3 Surfactina.....	13
2.4 <i>Malassezia furfur</i>	14
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 Microrganismos.....	16
3.2 Produção do biossurfactante.....	16
3.3 Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos shampoos comercializados e do biossurfactante lipopeptídeo Tim 10 como controle de <i>Malassezia</i>	17
3.4 Ensaio de emulsão e Tensão Superficial	18
3.5 Testes de toxicidade na germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>)	18
4 RESULTADOS.....	19
4.1 Atividade antifúngica dos shampoos comerciais e do biossurfactante lipopeptídeo Tim10 sobre as estirpes de malassezia em meio sólido	19
4.2 Ensaio de emulsão e Tensão superficial	21
4.3 Teste de toxicidade sob germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>)	22
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Produtos cosméticos e de higiene pessoal são utilizados em larga escala pela população mundial, estando os shampoos entre os mais consumidos e usados para limpeza de cabelos e couro cabeludo. Estes produtos são frequentemente formulados para garantir nutrientes e proteção à pele e seu microbioma a fim de manter suas funções de barreira natural e inibir o crescimento de patógenos (ADU *et al.*, 2020; VECINO, 2017; AL BADI e KHAN, 2014).

Dessa forma, grande parte dos compostos desses produtos são agentes surfactantes. Estes são definidos como substâncias anfipáticas que alteram as condições dos líquidos, dividindo a interface entre duas fases de diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, como o óleo e água ou ar e água (ROSEMBERG, 1999). Ademais, grande parcela dos tensoativos químicos no mercado são sintetizados a partir de subprodutos do petróleo, sendo de difícil biodegradabilidade (AKBARI *et al.*, 2018; ADU *et al.*, 2020).

Os surfactantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria cosmética com a finalidade de formação de espuma e limpeza, porém o uso regular leva ao ressecamento da pele, perda de cabelo, irritação no couro cabeludo e nos olhos (Potluri *et al.*, 2013). Por exemplo, o tratamento prolongado com lauril sulfato de sódio causou desnaturação de proteínas, a expansão da membrana, a formação de orifícios e a perda da capacidade de ligação à água, levando a irritação da pele e reações alérgicas (SOM *et al.*, 2012). Além disso, a baixa degradabilidade destes compostos afeta no acúmulo no meio ambiente, causando prejuízos ambientais relacionados a eutrofização das águas e na baixa condução de oxigênio por meio das membranas dos organismos aquáticos (COSTA *et al.*, 2007).

Biossurfactantes são moléculas naturais produzidas por diferentes microrganismos, com grande potencial na formulação de produtos cosméticos, possuindo grande vantagem por sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Ademais, vários tipos de biossurfactantes demonstraram atividade microbiana contra bactérias, fungos filamentosos, leveduras e vírus (ARAÚJO *et al.*, 2013; VECINO, 2017; DESAI e BANAT, 1997).

O gênero *Bacillus* é estudado como produtores de surfactantes que possuem uma surpreendente variedade de ações, sendo amplamente estudados pelo potencial tensoativo e antimicrobiano e antifúngico (LARINI *et al.*, 2017). Além disso,

as suas interações com sistemas biológicos geram alterações fisiológicas e bioquímicas, fazendo desses compostos um ativo promissor para resolver uma série de problemas de saúde (SEYDLOVÁ e SVOBODOVÁ, 2008).

A demanda por agentes tensoativos naturais tende a aumentar para atender às necessidades potenciais de aplicações industriais e domésticas, sendo possíveis substituintes de compostos sintéticos produzidos a partir de petróleo, sendo até mais efetivos (AKBARI, 2018). Por isso, há a necessidade de novos ativos naturais para integrar formulações de shampoo, sendo o objetivo desse estudo foi avaliar as características tensoativas dos biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus* sp. Tim10 junto a capacidade de controle de isolados clínicos de *Malassezia*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são subprodutos metabólicos produzidos por células microbianas em sua superfície ou excretados. Sua estrutura anfipática possibilita a redução da tensão superficial e interfacial. Além disso, formam micelas que melhoram a solubilidade de hidrocarbonetos em água (KAPADIA e YAGNIK, 2013). Além de suas características tensoativas, eles possuem propriedades de grande interesse industrial e comercial, como baixa toxicidade, melhor capacidade de emulsão, seletividade, biodegradação, sua produção se dá a partir de uma matéria prima renovável e podem conservar sua atividade específica em condições extremas de pH, salinidade e temperatura (DESAI e BANAT, 1997).

Os biossurfactantes também são relatados com propriedades antioxidantes consideráveis, atividades antimicrobianas contra microorganismos patogênicos e atividades antiadesivas contra bactérias formadores de biofilme (GIRI, 2019). São caracterizados a partir de sua estrutura química e origem microbiana, sendo divididos em componentes com baixa e alta massa molecular (KAPADIA e YAGNIK, 2013) ou ainda pelo tipo: glicolipídios, lipopeptídeos, fosfolipídeos, biossurfactantes poliméricos e particulados (Chen *et al.*, 2015). Além disso, diferentes microrganismos são capazes de produzir biossurfactantes com estruturas moleculares e atividades de superfície distintas (SANTOS *et al.*, 2016).

Os lipopeptídeos são uma classe de surfactantes microbianos amplamente estudados devido à sua versatilidade, além de suas propriedades, antifúngicas e antioxidantes (KOSARIC, 1992). São moléculas sintetizadas por complexos enzimáticos multimodulares conhecidos como peptídeos sintetases não ribossomais (NRPSs), possuindo uma estrutura de peptídeos hidrofílicos de 7 a 10 aminoácidos que se diferenciam na composição e sequência, ligados a um ácido graxo hidrofóbico com diferentes comprimentos de cadeia e isômeros e estão entre os principais biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp. (ROONGSAWANG *et al.*, 2010).

Tabela 1- Cepas produtoras de lipopeptídeos e suas aplicações

	Cepa bacteriana produtora de LP	Aplicação biológica
	<i>B. metilotrófica</i> DCS1	Atividades antioxidantes, antimicrobianas e antiadesivas
Surfactina	<i>B. subtilis</i>	Atividade inibitória contra o fitopatogênico <i>Fusarium</i> sp.
	<i>B. subtilis</i> SPB1	Atividade quelante
Iturina A	<i>B. amyloliquefaciens</i> PPCB004	Atividade contra patógenos fúngicos pós-colheita em frutos armazenados
Homólogos de surfactina	<i>B. amyloliquefaciens</i> MD4-12	Efeitos antimicrobianos sinérgicos contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas
Bacilomicina, Fengycina	<i>B. methylotrophicus</i> XT1 CECT 8661	Agente de biocontrole eficaz contra a infecção por <i>B. cinérea</i>
Liquenisina	<i>B. licheniformis</i> VS16	Inibição de biofilme, remoção de metais pesados

Fonte: Adaptado de ALI *et al.* (2022)

Dessa forma, gênero *Bacillus* têm tido ampla visibilidade devido sua produção de lipopeptídeos cíclicos e lipoproteínas que incluem surfactinas, fengycin, liquenisinas e bacilomicina, classificados como importantes biossurfactantes, produzindo um amplo espectro de peptídeos bioativos com ampla aplicabilidade nas indústrias biotecnológicas e biofarmacêuticas (VALTER *et al.*, 2002; GIRI,2019).

2.2 Potencial dos biossurfactantes como antimicrobianos

Os biossurfactantes possuem uma estrutura que confere a capacidade de alterar as propriedades interfaciais e superficiais de um líquido. Essa propriedade favorece a ação em diversas aplicações terapêuticas como em tratamentos antibacterianos e outros (LARINI,2017). Diante da capacidade detergente, os biossurfactantes lipopeptídeos solubilizam a membrana desfigurando a permeabilidade da membrana por meio de formação de canais iônicos ou carreando cátions mono ou divalentes (LIU, 2015; ARAUJO *et al.*, 2013)

Além disso, possuem efetiva capacidade de remoção de biofilmes, e agem modificando a hidrofobicidade da superfície bacteriana alterando a adesão na superfície, uma vez que quanto maior a hidrofobicidade, maior a adesão. Essa

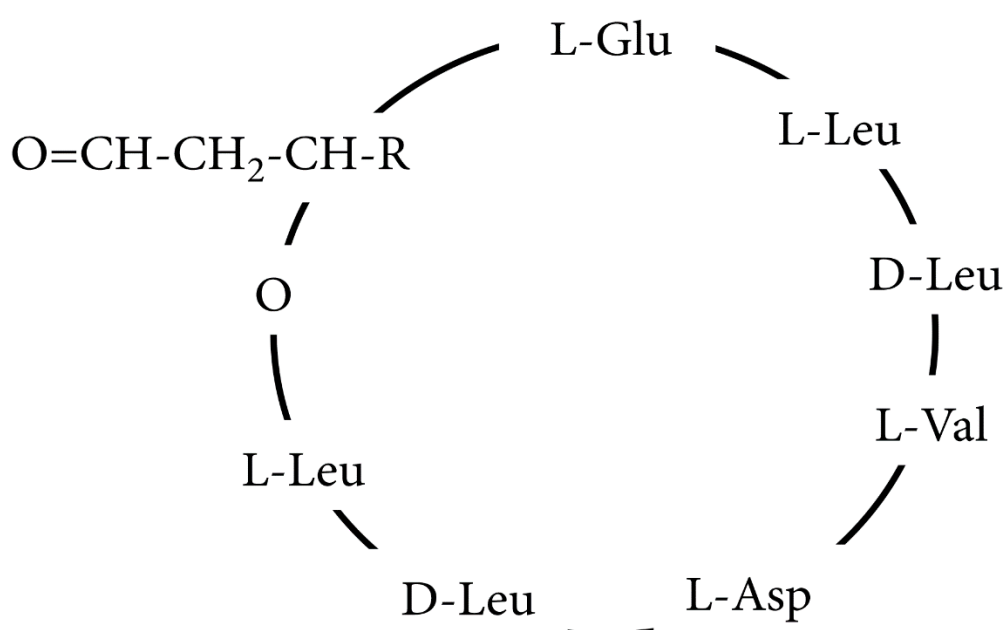
capacidade bacteriana varia em diferentes linhagens do mesmo microrganismo (AHIMOU *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2013).

A surfactina, sendo um biossurfactante lipopeptídeo, é capaz de inativar vírus devido sua estrutura química e seu comprimento da cadeia carbônica, sendo adequado para a inativação de vários vírus. Essa inativação é mais eficiente em vírus envelopados, especialmente herpes e retrovírus, em comparação com os vírus não envelopados. Possui capacidade de penetração na membrana e causa desintegração completa da membrana lipídica do vírus (VOLLENBROICH,1997; ALI *et al.*,2022).

2.3 Surfactina

A surfactina é sintetizada por várias cepas do gênero *Bacillus* durante a fase estacionária quando nutrientes nos meios de cultura são limitados (SEYDLOVÁ e SVOBODOVÁ, 2008).É um lipopeptídeo aniônico que possui estrutura primária composta por um peptídeo de sete α -aminoácidos (Glu - Leu - Leu - Val - Asp - Leu - Leu) ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidroxi com 12 a 16 átomos de carbono, formando um lipopeptídeo cíclico, sendo observado na figura 1 (KAKINUMA, 1969; LARINI, 2015).

Figura 1- Estrutura química da Surfactina A



Fonte: ALI *et al.*, 2022

Em ambas as fases, aquosa na interface água/ar, a surfactina adota uma estrutura de folha β , características que contribuem para seu amplo espectro de atividades biológicas (ISHIGAMI et al., 1995). É conhecida como um potente surfactante capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mN/m em concentrações de 0,005%, sendo esse resultado superior ao observado para o lauril sulfato de sódio, um surfactante sintético amplamente utilizado na indústria (ARAUJO et al., 2013).

As diferenças na sequência de aminoácidos e átomos de carbono nos ácidos graxos fornecem às surfactinas diversas estruturas químicas e propriedades físico-químicas (LIU et al., 2015). A surfactina possui 3 isoformas que se diferenciam na substituição de aminoácidos nos anéis pépticos e o que determina qual das três será produzido serão a linhagem da cepa, condições ambientais e o substrato em que ocorreu a produção do biosurfactante (Valter, 2002).

2.4 *Malassezia furfur*

Os componentes do gênero *Malassezia* são leveduras de brotamento unipolar, com uma espessa parede celular além de possuírem dependência de lipídios (CAFARCHIA et al., 2011). São conhecidos por compor maior parte da microbiota da pele humana normal e muitos de animais de sangue quente (BANDHAYA, 1993). Como os lipídeos são necessários para o crescimento dessas leveduras, elas são encontradas principalmente em regiões ricas em glândulas sebáceas (MAYSER et al., 1998). A distribuição de *Malassezia* na pele é dependente das características de cada região, uma vez que cada espécie pode exibir diferentes requisitos lipídicos (SAUNDERS, 2012).

São leveduras associadas a distúrbios patológicos na pele, pitíriase versicolor, foliculite, dermatite seborreica e caspa (LEEMING e NOTMAN, 1987). A *Malassezia* também é capaz de secretar inúmeras enzimas hidrolíticas que atuam como mediadores do metabolismo microbiano e interações microbiana-hospedeiro e intermicrobiana (CEZIRLIYAN, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade dos biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus* sp. Tim 10 no controle da *Malassezia*

2.2 Objetivos específicos

- Testar a capacidade de emulsificação e de redução da tensão superficial da preparação dos biossurfactantes
- Avaliar o potencial de inibição dos shampoos comerciais em comparação ao biossurfactante Tim10 no crescimento dos isolados clínicos de *Malassezia* sp. Por ação dos shampoos comerciais e por biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus* sp. Tim10.
- Avaliar o potencial de toxicidade do biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus* sp. Tim10 na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*).

3 METODOLOGIA

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas quatro estirpes de *Malassezia* isoladas de amostras clínicas, sendo elas: 154DR8, 153DR5, Procot96 e PQBR17, depositadas na coleção do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), identificadas na tabela 3. O cultivo das cepas foi realizado em meio Sabouraud modificado (acrescido de Tween 80 0,5% (v/v), azeite de oliva 0,5% (v/v) e DMSO 2%(v/v)), por 48 h, 150 rpm, a 30 °C. As culturas foram criopreservadas a -20°C e -80 °C, com 15% (v/v) de glicerol estéril.

Tabela 2- Identificação molecular das estirpes clínicas de *Malassezia*

Isolado	Estirpe	Nº de acesso GenBank
153DR5	<i>M. furfur</i> 124.3	KM370105
154DR8	<i>M. furfur</i> CBS:5332	KY104134
PQBR17	<i>M. furfur</i> CBS:8736	KY104118
Procot96	<i>M. furfur</i> A7A8	HQ710828

Fonte: Adaptado de Silva, 2021

Para a produção dos Biossurfactantes utilizados no ensaio foi utilizado a bactéria *Bacillus* sp.Tim 10, depositada na coleção do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech) do Departamento de Biologia da UFC. A cepa foi cultivada em meio Surfactina estéril (10 g/L de glicose; 5,0 g/L de extrato de levedura; 1,0 g/L de (NH₄)₂SO₄; 6,0 g/L de Na₂HPO₄; 3,0 g/L de KH₂PO₄; 2,7 g/L de NaCl; 0,6 g/L de MgSO₄.7H₂O) por 48 h, 150 rpm, a 30 °C. As culturas foram criopreservadas a -20°C e -80 °C, com 15% (v/v) de glicerol estéril.

3.2 Produção do biossurfactante

Seguindo a descrição de Silva (2021), a linhagem de *Bacillus* sp. TIM 10 foi cultivada por 16 h, 150 rpm e 30° C em caldo de surfactina estéril (MORAN,2000).

A absorvância do cultivo foi medida em espectrofotômetro a 600 nm, e ajustadas para $0,150 \pm 0,02$ e foi utilizada como inóculo na proporção de 10% (v/v). A fermentação ocorreu sob as condições de 150 rpm, 30°C durante 48 h. A separação do sobrenadante das células foi conquistada por centrifugação a 12000 g, 4° C durante 15 min (Pereira *et al.*,2013)

A extração dos lipopeptídeos ocorreu por precipitação ácida. Utilizou-se HCl 12 M para ajustar os sobrenadantes para pH 2,0 e foram deixados por 24 h em 4° C. Para obtenção do material precipitado as amostras passaram por 3 ciclos de centrifugação a 15000 x g, 4° C por 30 min., e lavado com água acidificada pH 2,0 ajustada com HCl. O precipitado foi diluído em água desmineralizada pH 7,0 e ajustado com NaOH 1 M. As amostras foram congeladas em ultrafreezer -80°C e liofilizadas (Pereira *et al.*,2013).

3.3 Atividade antifúngica *in vitro* dos shampoos comercializados e do biossurfactante lipopeptídeo Tim 10 como controle de *Malassezia*

As estirpes de *Malassezia furfur* 154DR8, 153DR5, Procot96 e PQBR17 crescidos em meio Sabouraud modificado (acrescido de Tween 80 0,5% (v/v), azeite de oliva 0,5% (v/v) e DMSO 2% (v/v) durante 48 h sob 150 rpm a 30° C. 0,2 mL de cultura foram inoculados em 20 mL de meio de ágar Sabouraud modificado derretido semeado pela técnica pour-plate.

Para avaliar a atividade antifúngica dos shampoos 5 poços de 10 mm de diâmetro foram perfurados no meio de cultura, nos quais 3 poços foram preenchidos com 0,05 mL de de shampoo a 10% (diluído em DMSO 10%), 1 dos poços foi preenchido com 0,05 mL DMSO 10% e o outro com 0,05 mL água destilada estéril, ambos foram utilizados como controles. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 h. Após o período de incubação o halo de inibição foi medido.

Para avaliar o biossurfactante foram preparadas duas soluções com o biossurfactante na concentração 4 mg/mL, a primeira diluída com H₂O Milli-Q e autoclavada e a segunda diluída com DMSO 10% e filtrada. 3 Poços de 10mm de diâmetro foram furados, um para o controle com água destilada, o segundo para controle do DMSO 10% e o terceiro para amostra de biossurfactante na concentração 4 mg/mL em H₂O mili-Q. Foram utilizados disco de papel tipo Watman

embebidos com 10 µl das amostras do biossurfactante na concentração 4 mg/mL em H₂O mili-Q e em DMSO 10% (REVANSIDDAPPA, 2018; SANTHANAM, 2014).

3.4 Ensaio de emulsão e Tensão Superficial

A partir da metodologia de Iqbal, Khalid e Malik (1995) foi avaliada a capacidade de emulsificação. O ensaio foi realizado em triplicata, adicionados 2 mL de querosene e 2 mL de solução de biossurfactante na concentração 400 mg / L em cada tubo de ensaio de fundo chato, agitados em vórtex por 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso durante 24 h, e o percentual da emulsificação foi calculado conforme a Equação 1:

$$E_{24} = \text{Camada emulsificada} / \text{Altura total} \times 100$$

O teste de tensão superficial foi medido em tensiômetro, no qual utiliza o método do anel Du Nöuy. Esse método consiste em observar a resistência do anel ao romper a tensão superficial do líquido, calculando a energia livre da superfície por unidade de área (LIMA, 2013). Para o ensaio, foram utilizados 20 mL de solução de biossurfactante em concentração de 400mg/L. E o tensiômetro calibrado previamente com água destilada (71 mN/m).

3.5 Testes de toxicidade na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*)

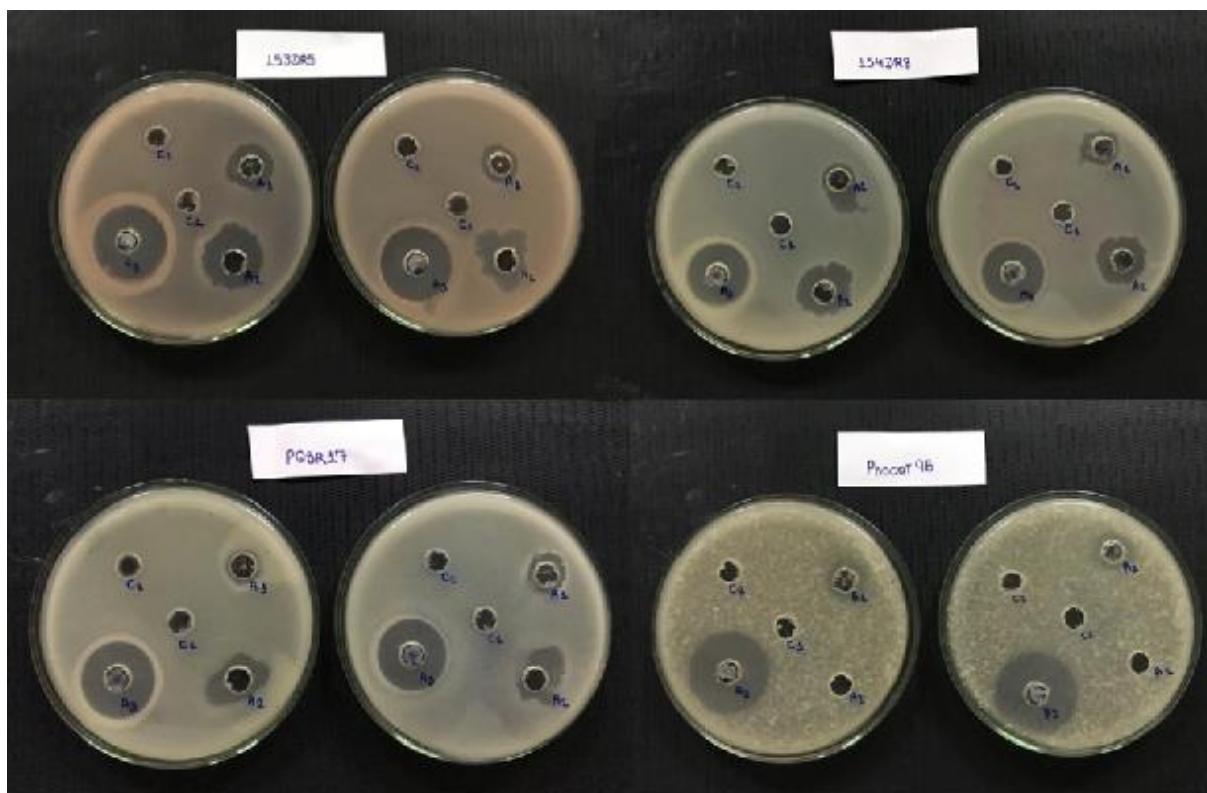
Para o teste de toxicidade foram utilizadas 10 sementes por placa, distribuídas por uma folha de papel filtro tipo Watman. As sementes foram umedecidas com 2 mL de solução de biossurfactante em diferentes concentrações (5, 10, 26 e 400 mg/L) e água destilada foi usada como controle. O teste foi avaliado após 3 dias de incubação na presença indireta de luz. (ALVES *et al.*, 2004).

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antifúngica dos shampoos comerciais e do biossurfactante lipopeptídico Tim 10 sobre as estirpes de malassezia em meio sólido

A partir do método de difusão em ágar foi possível observar a atividade antimicrobiana das 3 amostras de shampoos comerciais anticaspas observando o halo de inibição de crescimento das cepas de *Malassezia furfur* apresentados na Figura 2:

Figura 2- Atividade no controle do crescimento dos isolados clínicos de *Malassezia* 154DR8, 153DR5, PQBR17 e Procot96 pela difusão das amostras de shampoos comerciais



Fonte: Autor

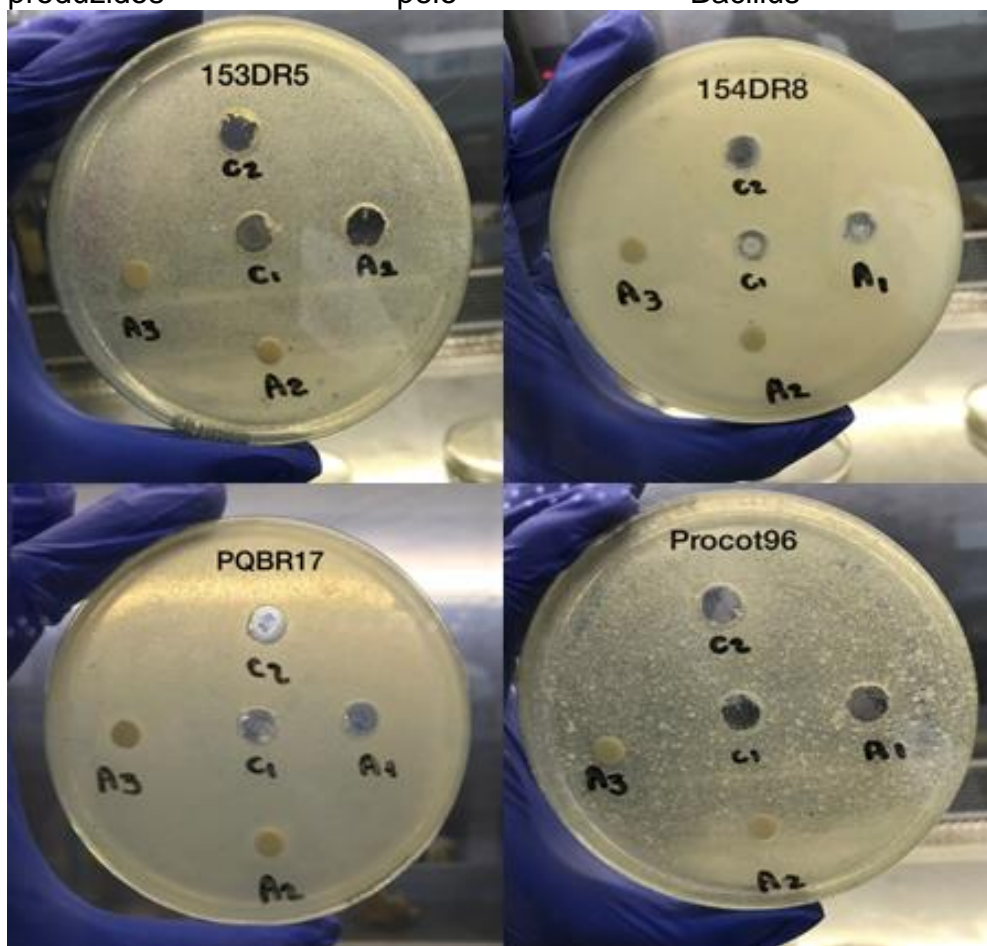
Legenda: C1-Controle 1(água destilada); C2- Controle 2(DMSO10%); A1- Amostra 1 (Shampoo Dercos anticaspas intensive 10%); A2- Amostra 2 (Shampoo Darrow anticaspas Doctor plus 10%); A3- Amostra 3 (Shampoo Clear Women anticaspas 10%). As placas foram mantidas em 35° C por 48h.

Tabela 3- Diâmetro médio do halo de inibição do crescimento de *M.furfur* 154DR8, 153DR5, PQBR17 e Procot96, pela difusão das amostras de shampoos comerciais

Amostra	Estirpes			
	153DR5	154DR8	PQBR17	Procot96
C1	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
C2	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
A1	10 mm	7 mm	5 mm	5 mm
A2	14 mm	11 mm	10 mm	0 mm
A3	20 mm	17 mm	17 mm	20 mm

Fonte: Autor

Figura 3- Teste de suscetibilidade da *Malassezia* aos biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus* Tim10



Fonte: Autor

Legenda: C1-Controle 1(água destilada); C2- Controle 2(DMSO10%); A1- Amostra 1 (biossurfactante 400mg/L 10% em DMSO 10%); A2- Amostra 2 (biossurfactante 400mg/L em H2O Milli-Q; A3- Amostra 3 (biossurfactante 400mg/L 10% em DMSO 10%). As placas foram mantidas em 35° C por 48h.

A preparação de biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus* Tim10 nas condições testadas não apresentou atividade de inibição do crescimento para os isolados clínicos de *Malassezia*.

4.2 Ensaio de emulsão e Tensão superficial

A emulsificação do querosene ocorreu em ambas as testagens: com a solução de biossurfactante 400mg/L não autoclavado e autoclavado. O ensaio realizado com a solução não autoclavada garantiu 70% de emulsão nas três réplicas, conforme a figura 4. O resultado da emulsificação do querosene e pelo biossurfactante produzido pelo bacilo Tim 10 autoclavado apresentou índice médio de 69,33% e pode ser visto na figura 5.

Figura 4- Emulsificação do querosene pelo biossurfactante não autoclavado e controle.



Fonte: Autor

Figura 5- Emulsificação do querosene pelo biossurfactante autoclavado e controle.



Fonte: Autor

Diante a adição de um surfactante em uma solução, a tensão superficial é reduzida e menor trabalho é necessário para trazer uma molécula à. Geralmente, a presença de um surfactante pode diminuir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m (CHRISTOFI e IVSHINA,2002; DESAI E BANAT, 1997). A tensão superficial no ensaio apresentou 71,3 mN/m para a água destilada e 28,9 mN/m para o biossurfactante Tim 10 na concentração de 400mg/L, causando uma redução de 40,5% da tensão.

4.3 Teste de toxicidade sob germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*)

As preparações de biossurfactante Tim 10 em diferentes concentrações não foram tóxicas as sementes de alface. A germinação ocorreu até na concentração mais alta de biossurfactante.

5 DISCUSSÃO

A superfície da pele humana funciona como uma barreira e sua integridade é essencial para seu bom funcionamento e garantia de uma pele saudável. Essa função pode ser afetada a partir do uso de cosméticos e, principalmente, de ingredientes intensificadores de penetração que transportam os ativos para as camadas mais internas (HEINRICH,2014). Por isso que os biosurfactantes possuem grande potencial para integrar formulações cosméticas devido duas propriedades fisicoquímicas importantes para a manutenção da saúde da pele (VECINO, 2017).

A pele possui uma microbiota única e a sua manutenção é uma condição para a homeostase. A desregulação da mesma pode levar a infecção de microrganismos patogênicos e desencadear consequências graves. Sendo assim, a demanda por novos agentes antimicrobianos aumenta significativamente devido à resistência dos microrganismos patogênicos aos antimicrobianos já existentes (ALI *et al.*, 2022). O ensaio de inibição do crescimento da levedura *Malassezia furfur* através da difusão do biosurfactante em meio sólido não apresentou resultados positivos, todavia, são necessários estudos futuros com diferentes concentrações do biosurfactante bem como das condições físico/químicas do teste. Uma vez que, resultados da capacidade antifúngica do mesmo biosurfactante já foi o relatado no trabalho de Silva (2021), no qual foi obtido a Concentração Inibitória Mínima (CIM 50) de 14,14 µg/mL em meio líquido.

O biosurfactante produzido pelo *Bacillus* sp. Tim10 apresenta ótimo desempenho como redutor de tensão superficial, sendo capaz de reduzir cerca de 40% do índice em baixas concentrações. E essa efetividade é uma das características que os biosurfactantes têm, e que comumente se sobrepõem aos surfactantes convencionais, uma vez que os mesmos tem melhores índices de redução da tensão superficial em concentrações mais baixas. (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

O poder emulsificante dos surfactantes biológicos vem sendo relatada com a capacidade de fornecer componentes funcionais e antioxidantes aos cosméticos (BEZERRA *et al.*, 2018). Diante disso, os testes de emulsão do biosurfactante produzido no experimento alcançou taxas entre 69 e 70%, apresentando estabilidade mesmo após a submissão de altas temperaturas e pressão, índices importantes para seu uso na indústria, visto que os processos industriais

frequentemente envolvem a exposição a extremos de temperatura, pressão, pH e força iônica, portanto, há uma necessidade contínua de isolar novos produtos derivados de micróbios capazes de funcionar sob essas condições (NITSCHKE e COSTA, 2007).

Os surfactantes sintéticos são compostos com alta demanda industrial, e diante da alarmante crise ambiental, tanto por parte dos consumidores quanto pelas legislações de controle do meio ambiente, há uma tendência a utilização de ingredientes menos danosos (ARAÚJO *et al.*, 2013). Em vista disso, alguns atributos que os biosurfactantes possuem vão além do poder tensoativo e emulsificante. A biodegradabilidade, baixa toxicidade e aceitabilidade ecológica são características essenciais que tornam os biosurfactantes ideais para aplicação em shampoos (LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009).

A partir do teste de toxicidade em sementes de alface é possível afirmar que não houve prejuízo, posto que ocorreu a germinação das sementes submetidas a soluções com diferentes concentrações de biosurfactante, mesmo na concentração mais alta de 400 mg/L. Muitos biosurfactantes são estudados como ativos promotores de crescimento vegetal, sendo considerados até como substitutos potenciais para os pesticidas e inseticidas químicos agressivos que estão sendo atualmente utilizado na agricultura. A adição de biosurfactante é conhecido por fornecer condições favoráveis para o crescimento microbiano, e por consequência, melhoramento da qualidade do solo (SACHDEV e CAMEOTRA, 2013). Ademais, os microorganismos utilizam mais facilmente os biosurfactantes como substrato para obtenção de energia do que os surfactantes sintéticos, o que evita o acúmulo em larga escala de substâncias que levam a eutrofização das águas (FELIPE e DIAS, 2016).

Desse modo, a biocompatibilidade e a biodegradabilidade são requisitos tão importantes quanto a desempenho funcional dos produtos, aumentando a necessidade aplicar tensoativos eficientes que não ofereçam riscos para a saúde humana ou para o ambiente (VARVARESOU e IAKOVOU, 2015). Portanto, a manutenção da saúde cutânea é uma pré-condição para a saúde humana e deve se encaixar dentro dos desafios de evitar a contaminação do ambiente com produtos tóxicos (ADU, 2020). O que leva o biosurfactante produzido pelo bacillo spp. Tim 10 ser um ativo promissor em formulações de shampoo.

6 CONCLUSÃO

Os biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus* Tim10 possuem características tensoativas apresentam-se como importantes tensoativos capazes de manter sua característica emulsificante após submissão de pressão e calor, além da capacidade de redução da tensão superficial e não apresentaram toxicidade na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). Ademais, não apresentou atividade de inibição no controle do crescimento dos isolados clínicos de *Malassezia* por meio do método utilizado no ensaio. Dessa forma, se fazem necessários novos estudos envolvendo novos métodos de atividade antifúngica e considerando as características físico/químicas dos biossurfactantes,

REFERÊNCIAS

ADU, Simms A. et al. Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1099, 2020.

AHIMOU, François; JACQUES, Philippe; DELEU, Magali. Efeitos da surfactina e iturina A na hidrofobicidade da superfície de *Bacillus subtilis*. **Tecnologia enzimática e microbiana**, v. 27, n. 10, pág. 749-754, 2000.

AKBARI, Sweeta et al. Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 81-90, 2018.

AL BADI, Khaloud; KHAN, Shah A. Formulation, evaluation and comparison of the herbal shampoo with the commercial shampoos. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 301-305, 2014.

ALI, Nawazish et al. Lipopeptide biosurfactants from *Bacillus* spp.: Types, Production, Biological Activities and Applications in Food. **Journal of Food Quality**, v. 2022, 2022.

ALVES, Maria da Conceição Sampaio et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, p. 1083-1086, 2004.

ARAUJO, Livia Vieira de; FREIRE, Denise Maria Guimarães; NITSCHKE, Márcia. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, p. 848-858, 2013.

BANDHAYA, M. The distribution of *Malassezia furfur* and *Malassezia pachydermatis* on normal human skin. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 24, n. 2, p. 343-346, 1993.

BEZERRA, Káren Gercyane O. et al. Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics. **Biotechnology progress**, v. 34, n. 6, p. 1482-1493, 2018.

CAFARCHIA, Claudia et al. Advances in the identification of *Malassezia*. **Molecular and cellular probes**, v. 25, n. 1, p. 1-7, 2011.

CEZAIIRLIYAN, Brent; AUSUBEL, Frederick M. O investimento em enzimas secretadas durante o crescimento limitado por nutrientes depende da utilidade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 37, pág. E7796-E7802, 2017.

CHEN, Wei-Chuan; JUANG, Ruey-Shin; WEI, Yu Hong. Aplicações de um biosurfactante lipopeptídico, surfactina, produzido por microorganismos. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158-169, 2015

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 915-929, 2002.

CLAVAUD, Cécile et al. Dandruff is associated with disequilibrium in the proportion of the major bacterial and fungal populations colonizing the scalp. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58203, 2013.

COSTA, Maria José Comandante et al. Co-digestão anaeróbia de substâncias surfactantes, óleo e lodo de esgoto. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 433-439, 2007.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47- 64, 1997.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biosurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química e Sociedade**, Vol. 39, N° 3, p. 228-236, 2016.

GIRI, Sib Sankar et al. Atividades antioxidante, antibacteriana e antiadesiva de biosurfactantes isolados de cepas de Bacillus. *Patogênese microbiana* , v. 132, p. 66-72, 2019

HEINRICH, K.; HEINRICH, U.; TRONNIER, H. Influence of different cosmetic formulations on the human skin barrier. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 3, p. 141-147, 2014

ISHIGAMI, Yutaka et al. Significance of β -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin. **Colloids and B Surfaces: Biointerfaces**, v. 4, n. 6, pág. 341-348, 1995

IQBAL, S.; KHALID, ZM; MALIK, KA Biodegradação e emulsificação aprimoradas de petróleo bruto e hiperprodução de biosurfactantes por um mutante induzido por raios gama de Pseudomonas aeruginosa. **Letters in Applied Microbiology** , v. 21, n. 3, pág. 176-179, 1995.

KAPADIA, S.G.; YAGNIK, BHUPESH. (2013). Current trend and potential for microbial biosurfactants. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*. 4. 1-8.

KAKINUMA, Atsushi et al. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by Bacillus subtilis. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 33, n. 6, p. 971-972, 1969.

KOSARIC, N.. "Biosurfactants in industry" *Pure and Applied Chemistry*, vol. 64, no. 11, 1992, pp. 1731-1737.

LARINI, Mariana Munhoz et al. Surfactina: estrutura, aplicações e fatores envolvidos em sua produção. **Evidência**, v. 17, n. 2, p. 105-118, 2017.

LEEMING, John P.; NOTMAN, Fiona H. Improved methods for isolation and enumeration of Malassezia furfur from human skin. **Journal of Clinical Microbiology** , v. 25, n. 10, pág. 2017-2019, 1987.

LIMA, Luina Benevides. Frequência de produtores de biossurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará. 2013. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/11470/1/2013_dis_lblima.pdf Acesso em: 28 de nov. 2022

LIU, Jin-Feng et al. Chemical structure, properties and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in oil recovery and spill mitigation. **International Journal of Molecular Sciences** , v. 16, n. 3, pág. 4814-4837, 2015.

LOURITH, Nattaya; KANLAYAVATTANAKUL, Mayuree. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International journal of cosmetic science**, v. 31, n. 4, p. 255-261, 2009.

MALPANI, Tanya *et al.* Pomegranate-based herbal shampoo formulation and evaluation. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** , v. 9, n. 4, pág. 1439-1444, 2020.

MAYSER, P. *et al.* Different utilization of neutral lipids by *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis*. **Medical mycology**, v. 36, n. 1, p. 7-14, 1998.

MORÁN, A. C.; OLIVERA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J. L.; SIÑERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation*, v. 11, n. 1, p. 65–71, 2000.

NITSCHKE, Márcia; COSTA, SGVÃO. Biossurfactantes na indústria alimentícia. **Tendências em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 5, p. 252-259, 2007.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

PEREIRA, J. F.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, v. 111, p. 259–268, 2013.

POTLURI, Anusha et al. Uma revisão sobre ervas usadas em shampoo anti-caspa e seus parâmetros de avaliação. **Revista de Pesquisa de Ciências Tópicas e Cosméticas**, v. 4, n. 1, p. 5-13, 2013.

REVANSIDDAPPA, M.; SHARADHA, R.; ABBULU, K. Formulation and evaluation of an anti-dandruff herbal shampoo. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** , v. 7, n. 4, pág. 764-767, 2018.

ROONGSAWANG, Niran; WASHIO, Kenji; MORIKAWA, Masaaki. Diversity of non-ribosomal peptide synthases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 141-172, 2010

ROSENBERG, Eugene; RON, Eliora Z. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

SANTHANAM, Jacinta; ABD GHANI, Farhana Nadiah; BASRI, Dayang Fredalina. Antifungal activity of Jasminum sambac against Malassezia sp. and not Malassezia sp. isolated from human skin samples. **Journal of Mycology**, v. 2014, 2014.

SACHDEV, Dhara P.; CAMEOTRA, Swaranjit S. Biosurfactantes na agricultura. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 97, n. 3, pág. 1005-1016, 2013.

SANTOS, Danyelle Khadydja F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SAUNDERS, Charles W.; SCHEYNIUS, Annika; HEITMAN, Joseph. Malassezia fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002701, 2012.

SEYDLOVÁ, Gabriela; SVOBODOVÁ, Jaroslava. Review of surfactin chemical properties and potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, n. 2, pág. 123-133, 2008.

SILVA, Gabrielly Oliveira da. Avaliação *in vitro* de biosurfactantes lipopeptídeos para o controle do crescimento e formação de biofilmes de Malassezia furfur. 2021. Disponível em: < [Repositório Institucional UFC: Buscando no repositório](#)>. Acesso em: 22 out. de 2022.

SOM, Iti; BHATIA, Kashish; YASIR, Mohd. Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 4, n. 1, p. 2, 2012.

VARVARESOU, A.; IAKOVOU, K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. **Letters in applied microbiology**, v. 61, n. 3, p. 214-223, 2015.

VATER, Joachim et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of Bacillus subtilis C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210-6219, 2002.

VECINO, Xanel et al. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 911-923, 2017.

VOLLENBROICH, Dirk e cols. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from Bacillus subtilis. **Biológicos**, v. 25, n. 3, pág. 289-297, 1997.