



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GIOVANNA AMARAL FILIPE

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLÍDIOS DE  
*Starmerella bombicola* EM FORMULAÇÕES  
COSMECÊUTICAS**

---

Londrina  
2022

GIOVANNA AMARAL FILIPE

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS DE**  
*Starmerella bombicola* **EM FORMULAÇÕES**  
**COSMECÊUTICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Audrey Alessandra Stinghen Garcia Lonni

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F483 Filipe, Giovanna.  
PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS DE *Stammerella bombicola* EM FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS / Giovanna Filipe. - Londrina, 2022.  
79 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.  
Coorientador: Audrey Alessandra Stingham Garcia Lonni.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Cosmecêuticos - Tese. 2. Patógenos da pele - Tese. 3. Acne - Tese. 4. Autoconservante - Tese. I. Pedrine Colabone Celligoi, Maria Antonia . II. Alessandra Stingham Garcia Lonni, Audrey . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

GIOVANNA AMARAL FILIPE

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS DE**  
*Starmerella bombicola* **EM FORMULAÇÕES**  
**COSMECÊUTICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine  
Colabone Celligoi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa Dr<sup>a</sup> Suzana Mali de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa Dr<sup>a</sup> Cristiani Baldo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 24 de fevereiro de 2022

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por todas as bênçãos recebidas.

À **minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi**, vossas orientações, ensinamentos e principalmente paciência foram essenciais nesta caminhada;

À **minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Audrey Alessandra Stingham Garcia Lonni** do Departamento de Ciências Farmacêuticas, por ter me permitido desenvolver parte da pesquisa no laboratório;

**Aos professores membros da banca examinadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiani Baldo** por toda ajuda fornecida na composição dos artigos e a **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suzana Mali de Oliveira** pelo apoio e auxílios prestados, agradeço por aceitarem o convite, dispondo de tempo e conhecimento;

Às **minhas companheiras de laboratório Briani, Talita, Victória, Gabi e Maria** por tornarem meus dias mais leves, e compartilharem comigo todas as “alegrias e tristezas” do dia a dia no laboratório;

**Aos órgãos financiadores CAPES, CNPQ e Fundação Araucária**, pelo incentivo à pesquisa;

À **minha mãe Silvia**, um porto seguro sempre presente, que nunca mediu esforços por suas filhas;

**Ao meu pai Luiz Antônio** pelos valores, conhecimentos e por acreditar e confiar em mim nesta jornada;

**Aos meus padrinhos Elô e Marcelo** que estão sempre presentes na minha vida, me motivaram e me deram forças;

Às **minhas irmãs Jéssica e Julia** pelo apoio e carinho;

**Ao meu namorado Matheus** pela dedicação, companheirismo e compreensão, me ajudando e me motivando sempre;

**Ao meu amigo Gian**, por sempre ter me apoiado e me auxiliado em todas as decisões, pela convivência e incentivo.

**Com vocês divido a alegria desta experiência!**

FILIFE, Giovanna Amaral. **Produção e aplicação de soforolipídios de *Starmerella bombicola* em formulações cosmeceútics.** 2022. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

A tendência atual é a busca por produtos cosméticos com ingredientes naturais, sustentáveis e inovadores. Os soforolipídios, são glicolipídios produzidos por microrganismos que apresentam boa compatibilidade com a pele, propriedades antioxidante e antimicrobiana com possível aplicação na área. O objetivo desse trabalho foi produzir e aplicar soforolipídios de *Starmerella bombicola* para desenvolvimento de novas formulações cosmeceútics: gel creme com adição de óleo essencial de palmarosa com e sem conservante químico e filmes biopoliméricos de pululana e amido com concentrações diferentes de soforolipídios (0, 2,5, 5,0 e 10,0%) com e sem agente reticulante ácido cítrico. A atividade antimicrobiana dos soforolipídios foi avaliada contra patógenos da pele e apresentou a concentração inibitória mínima (MIC) de 31,25 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e 125,0 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis*. A adição de óleo essencial de palmarosa expressou efeito sinérgico na atividade antimicrobiana reduzindo em 98% o MIC para *S. aureus* em 50% para *S. epidermidis*. A atividade antioxidante dos soforolipídios foi de 28,31% (4 mg/mL) e com a adição de óleo de palmarosa aumentou para 55%. A formulação gel creme sem adição do conservante químico apresentou estabilidade por 60 dias se mostrando autoconservante e com 100% de eficiência contra os patógenos *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Propionibacterium acnes*. Os filmes biopoliméricos contendo pululana, amido e soforolipídios formaram filmes inteiros, sem bolhas ou rachaduras indicando uma boa interação entre os componentes. A adição de soforolipídios resultou em superfícies mais opacas e aumentou a solubilidade dos filmes sem o ácido cítrico. Os filmes com adição de ácido cítrico apresentaram melhores propriedades hidrofílicas e mecânicas. Quanto à atividade antimicrobiana, todos os filmes contendo soforolipídios foram capazes de inibir 100% do crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Esses estudos mostraram a eficiência dos soforolipídios para aplicação em formulações cosmeceútics, levando a possibilidade de desenvolver produtos inovadores, sustentáveis sem o uso de conservante químico.

**Palavras-Chave:** cosmeceútics; autoconservante; acne; patógenos da pele.

FILIFE, Giovanna Amaral. **Production and application of sophorolipids from *Starmerella bombicola* in cosmeceutical formulations.** 2022. 78p. Master's dissertation in Biotechnology Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

The current trend are the cosmetic products with natural, sustainable and innovative ingredients. Sophorolipids are glycolipids produced by microorganisms, present good skin compatibility, antioxidant and antimicrobial properties with important application in this area. The aim of this research was to produce and to applicate of sophorolipids from *Starmerella bombicola* for the development of new cosmeceutical formulations: cream gel with addition of palmarosa essential oil with and without a chemical preservative and biopolymeric films of pullulan and starch with different concentrations of sophorolipids (0, 2.5, 5.0 and 10.0%) with and without citric acid crosslinking agent. The antimicrobial activity of sophorolipids was evaluated against skin pathogens and presented the minimum inhibitory concentration (MIC) was 31.25 µg/mL for *Staphylococcus aureus* and 125.0 µg/mL for *Staphylococcus epidermidis*. The addition of palmarosa essential oil expressed a synergistic effect on antimicrobial activity, reducing the MIC by 98% for *S. aureus* and 50% for *S. epidermidis*. The antioxidant activity of sophorolipids was 28.31% (4 mg/mL) and with the addition of palmarosa oil it increased to 55%. The cream gel formulation without the addition of chemical preservative was stable for 60 days, showing self-preservation and 100% efficiency against the pathogens *S. aureus*, *S. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. The biopolymer films containing pullulan, starch and sophorolipids formed whole films, without bubbles or cracks, indicating a good interaction between the components. The addition of sophorolipids resulted in more opaque surfaces and increased the solubility of the films without citric acid. The films with the addition of citric acid showed better hydrophilic and mechanical properties. As for the antimicrobial activity, all films containing sophorolipids were able to inhibit 100% of the growth of *S. aureus* and *S. epidermidis*. These studies showed the efficiency of sophorolipids for application in starter formulations, leading to the possibility of developing innovative, sustainable products without the use of chemical preservatives.

**Keywords:** cosmeceuticals; self-preservative; acne; skin pathogens.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL TEÓRICO

**Figura 1** - Estrutura química da forma lactônica (A) e acídica (B) do sofrorolípídios..... 15

**Figura 2** - Ilustração da via de produção dos sofrorolípídios de *S. bombicola*..... 15

### ARTIGO 1

**Figure 1** - Growth inhibition of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* in cosmetic formulations ..... 48

### ARTIGO 2

**Figure 1** - Visual appearance of starch, pullulan and sophorolipid films..... 61

**Figure 2** - SEM micrographs of films based on pullulan starch with the addition of sophorolipids ..... 63

**Figure 3** - FT-IR spectra of films based on pullulan starch with the addition of sophorolipids ..... 65

**Figure 4** - Antimicrobial activity of pullulan, starch and sophorolipid films..... 67



## LISTA DE TABELAS

### Referencial teórico

- Tabela 1** - Composição das formulações cosmecêuticas gel-creme ..... 30  
**Tabela 2** - Composição das formulações cosmecêuticas de filmes biopoliméricos ..... 30

### Artigo 1

- Table 1** - Composition of gel-cream formulations ..... 43  
**Table 2** - Minimum inhibitory concentration and fractional inhibitory concentration of sophorolipids and palmarosa essential oil against *S. aureus* and *S. epidermidis* ..... 44  
**Table 3** - Antioxidant activity of sophorolipids and essential oil of palmarosa ..... 45  
**Table 4** - General properties of cosmetic formulations after 60 days exposed in different conditions ..... 46  
**Table 5** - Characterization of formulations under stress conditions ..... 46

### Artigo 2

- Table 1** - Formulations of biodegradable films produced for the preparation of 400 mL of filmogenic solutions ..... 58  
**Table 2** - Results of thickness, solubility, water vapor permeability (WVP) and mechanical properties of the films produced ..... 61

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1	SOFOROLIPÍDIOS: BIODISSÍNTESE E PRODUÇÃO .....	15
3.2	PROPRIEDADES DOS SOFOROLIPÍDIOS PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS.....	18
3.2.1	Solubilidade E Permeação Na Pele.....	18
3.2.2	Atividade Antioxidante.....	19
3.2.3	Atividade Antimicrobiana .....	20
3.3	PROPRIEDADES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS.....	21
3.4	DOENÇAS BACTERIANAS DE PELE.....	23
3.5	FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS.....	24
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
4.1	MICROORGANISMOS E PRESERVAÇÃO .....	26
4.2	PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS .....	26
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS SOFOROLIPÍDIOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	27
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS SOFOROLIPÍDIOS E ÓLEO ESSENCIAL DE PALMAROSA .....	27
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS SOFOROLIPÍDIOS E DO ÓLEO ESSENCIAL DE PALMAROSA.....	27
4.6	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS .....	28
4.7	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES GEL CREME.....	30
4.7.1	Análise De Estabilidade.....	30
4.7.2	Ensaio Organoléptico .....	30
4.7.3	Ensaio Físico Químico.....	30

4.7.4	Retenção De Umidade .....	31
4.7.5	Teste Estabilidade Acelerada.....	32
4.7.6	Atividade Antioxidante.....	32
4.7.7	Atividade Antimicrobiana .....	32
4.8	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS .....	33
4.8.1	Espessura .....	33
4.8.2	Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV) .....	33
4.8.3	Solubilidade .....	33
4.8.4	Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada De Fourier (FT-IR) .....	33
4.8.5	Permeabilidade Ao Vapor De Água (PVA).....	34
4.8.6	Propriedades Mecânicas .....	35
4.8.7	Atividade Antimicrobiana .....	35
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>37</b>
5.1	PATENTE.....	37
5.2	CAPÍTULO DE LIVRO.....	37
5.3	ARTIGO 1 .....	38
5.4	ARTIGO 2.....	54
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria de cosméticos e higiene pessoal desempenha grande importância econômica, social e ambiental. Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético o mercado de cosméticos naturais tem ganhado espaço em todo o território nacional, com expectativa de faturamento de US\$ 25,11 bilhões até 2025. Considerando o interesse dos consumidores nos benefícios dos cosméticos naturais, principalmente os produtos para os cuidados da pele, a indústria acredita em um crescimento de 5% a 10% nos próximos cinco anos.

Biodegradabilidade, sustentabilidade, baixa toxicidade, além da multifuncionalidade são alguns dos benefícios de incluir derivados naturais, como extratos de plantas e moléculas biotecnológicas em formulações cosméticas. O principal destaque é o uso dos biossurfactantes, moléculas produzidas por microrganismos e com recursos renováveis. Surfactantes não naturais, como lauril sulfato de sódio bastante utilizado em cosméticos pode interagir com superfície epidérmica causando irritações e reações alérgicas. Os biossurfactantes são biocompatíveis, por isso evitam efeitos nocivos a pele podendo ser utilizado em diferentes áreas como saúde, agrícola, farmacêutica e em destaque a indústria cosmética.

Dentre os biossurfactantes, na classe dos glicolipídios, os soforolipídios são moléculas produzidas por algumas espécies de microrganismos, destacando a *Starmerella bombicola* com bom rendimento de produção. Os soforolipídios apresentam características emulsificantes, espumantes e efeitos tensoativos que podem auxiliar o desenvolvimento de formulações cosméticas, mas principalmente, apresentam boa compatibilidade com a pele e importantes propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

Outros ingredientes que tem se destacado e já são amplamente utilizados em formulações cosméticas são os óleos essenciais. Os óleos essenciais são compostos líquidos voláteis extraídos de plantas, utilizados em aromaterapia, alimentos e na terapia médica, especialmente por suas atividades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas e inseticidas. Muitos estudos mostram o óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) possui atividade antioxidante e antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sua composição é rica em monoterpenos e geraniol, concedendo uma fragrância agradável e eficiência na inibição de crescimento bacteriano.

Uma formulação cosmeceútica, ou dermocosmético, é a combinação entre cosmético e um produto farmacêutico, que apresenta em sua composição ativos que

possam melhorar a saúde da pele, trazendo benefícios semelhantes aos medicamentos. Sendo assim, doenças como infecções bacterianas da pele, principalmente a acne, que é causada por espécies de *Staphylococcus* e *Propionibacterium* podem ser o foco para a utilização de formulações cosmecêuticas, com ativos antimicrobianos capazes de reduzir a presença desses patógenos.

Considerando que o consumidor está mais exigente, a indústria busca por moléculas sustentáveis e multifuncionais para o desenvolvimento de novos produtos cosmecêuticos, que apresentem propriedades biológicas e atendam o mercado de produtos naturais. Assim nesse trabalho os soforolipídios produzidos pela levedura *Starmerella bombicola* e óleo essencial de palmarosa foram utilizados para desenvolver novas formulações cosmecêuticas, com propriedades antimicrobiana, antioxidante e hidratante.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e aplicar os sofrorolipídios de *Starmerella bombicola* para desenvolvimento de novas formulações cosmecêuticas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

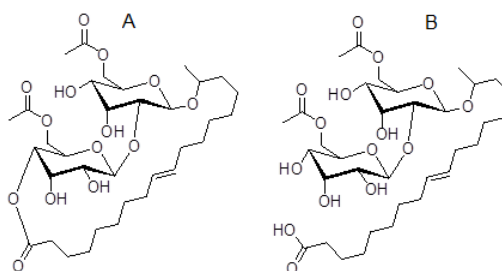
- Produzir e caracterizar os sofrorolipídios de *S. bombicola*;
- Verificar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos sofrorolipídios e do óleo de palmarosa;
- Aplicar sofrorolipídios e óleo essencial de palmarosa no desenvolvimento de cosmético gel-creme antiacne;
- Caracterizar o gel creme quanto a estabilidade, ensaios organolépticos, físico-químicos, retenção de umidade e propriedades antioxidantes e antimicrobianas;
- Aplicar os sofrorolipídios produzidos no desenvolvimento filmes biopoliméricos de pululana e amido;
- Caracterizar os filmes biopoliméricos quanto aos aspectos físico-químicos e propriedades antimicrobianas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 SOFOROLIPÍDIOS: BIOSÍNTESE E PRODUÇÃO

Os soforolipídios são biossurfactantes de origem microbiana, pertencentes a classe dos glicolipídios. Estruturalmente, eles foram identificados por Asmer *et al.* (1988) como um dissacarídeo (O  $\beta$ -D-glicopiranosil-2-1- $\beta$ -D-glicopiranosose), conhecido como soforose, unido por uma ligação  $\beta$ -glicosídica com o carbono terminal ( $\omega$ ) ou sub-terminal ( $\omega$ -1) de uma cadeia de ácido graxo. Durante a fermentação, uma mistura de formas acídicas e lactônicas são produzidas, onde a cauda de ácidos graxos pode estar livre na forma acídica (Figura 1- B) ou esterificada com o carbono da soforose (Figura 1- A) na forma lactônica, apresentando uma estrutura de anel fechado.

**Figura 1** - Estrutura química da forma lactônica (A) e acídica (B) do soforolipídios



Fonte: QUEIROZ *et al.* (2019).

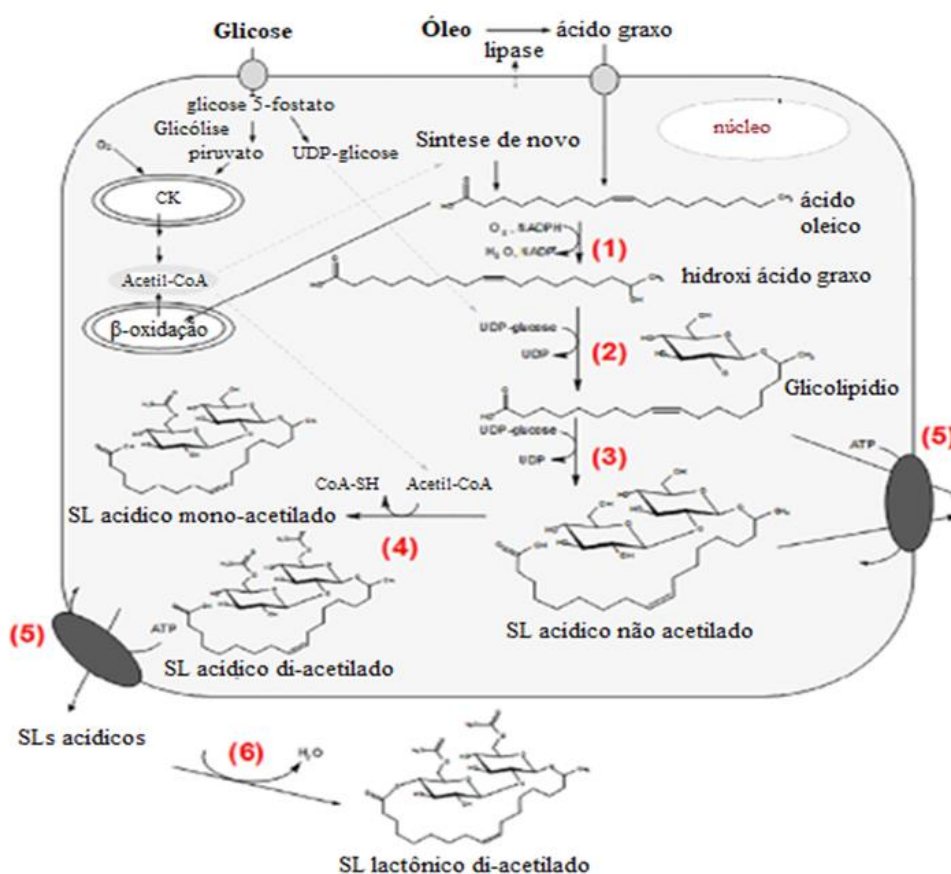
Outras variações estruturais estão relacionadas ao padrão de acetilação, comprimento da cadeia, saturação, posição da hidroxilação do ácido graxo e as proporções das formas acídicas ou lactônicas no produto final (MA *et al.*, 2020). A levedura *Starmerella. bombicola* se destaca por ser boa produtora, produzindo soforolipídios predominantemente de forma lactônica diacetilada (posição 6', 6''), com cadeias de ácidos graxos com 18 átomos de carbono e monoinsaturado (C18:1) quando há glicose e ácido oleico como substratos (SILVEIRA *et al.*, 2019).

A biossíntese de soforolipídios ocorre ao final da fase exponencial e início da fase estacionária, em condições de nitrogênio limitante (QUEIROZ *et al.*, 2019). Na Figura 2 ilustra-se a biossíntese de soforolipídio em 6 etapas. Inicialmente é necessária a disponibilização dos ácidos graxos a partir de substratos lipofílicos fornecidos por lipases. Esses ácidos graxos podem ser metabolizados na via de  $\beta$ -oxidação, quando há

necessidades energéticas ou atuar como precursor para a síntese de soforolipídios, sendo hidroxilados por uma monooxigenase CYP52M1 na reação (1). Nesta etapa, pode acontecer a incorporação direta dos ácidos graxos aos soforolipídios quando na presença de ácidos graxos de C16 e C18 devido à especificidade da enzima monooxigenase, enquanto que substratos de outros comprimentos são alongados (através de Acetil-coA) ou metabolizados pela  $\beta$ -oxidação (ROELANTS *et al.*, 2019; ZERHUSEN *et al.*, 2019).

Na etapa (2) (Figura 2) ocorre a incorporação da primeira molécula de glicose por uma glicosiltransferase UGTA1 e subsequentemente a próxima glicosilação (3) por UGTB1 dando origem ao soforolipídio ácido não acetilados. As variações estruturais de acetilações da soforose ocorrem pela enzima acetiltransferase (4), utilizando Acetil-Co como substrato. A formação de derivados lactônicos acontece após o transporte para o espaço extracelular por uma proteína transportadora (5), através de uma reação de esterificação pela enzima lactona esterase (6) (ROELANTS *et al.*, 2019).

**Figura 2** - Ilustração da via de produção dos soforolipídios de *S. bombicola*



Fonte: Adaptado ROELANTS *et al.* (2019).



A produção de soforolipídio está intimamente relacionada com as condições específicas de crescimento celular, com a composição do meio de cultura e os microrganismos utilizados. Para Van Bogaert *et al.* (2011) uma produção eficiente de soforolipídios ocorre utilizando quantidades de 100 g.L<sup>-1</sup> de glicose, uma fonte hidrofóbica (óleos, alcanos e ácidos graxos) e uma fonte de nitrogênio. Também podem ser adicionados ao meio de cultivo, outras substâncias como citrato (composto tamponante) e minerais como Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup> que auxiliam no crescimento do organismo. O tempo de fermentação ocorre em tempos tardios, em cerca de 10 dias, por ser um metabólito secundário. As temperaturas de produção variam de 25°C a 30°C e o pH 3,5 é considerado ideal.

Kurtzman *et al.* (2010) estudaram a síntese de soforolipídios por 19 espécies de *Candida* através da fermentação submersa em frascos de Erlenmeyer por 96 horas, utilizando como substratos glicose, ácido oleico e extrato de levedura. As cepas que se destacaram foram *S. bombicola* (48,9 g.L<sup>-1</sup>); *C. apícola* (52,7 g.L<sup>-1</sup>); *C. riidocensis* (8,3 g.L<sup>-1</sup>) e uma nova espécie *Candida sp. NRRL Y-27208* (20,1 g.L<sup>-1</sup>). Produções menores que 0,5 g.L<sup>-1</sup> de soforolipídios foram encontradas para os microrganismos *C. bombi*; *C. florícola*; *C. zemplanina*; *C. stellata*; *C. lactis-condensi*; *C. cellae*; *C. etchellsii*; *C. floris*; *C. magnoliae*; *C. geochares*; *C. vaccinii*; *C. apis*; *C. gropengiesseri*; *C. bombiphila* e *C. sorbosivorans*.

Outros microrganismos identificados como produtores de soforolipídios incluem *Wickerhamiella domercqiae*, que produziu 40,7 g.L<sup>-1</sup> em meio contendo glicose e ácido oleico (LIU *et al.*, 2016); *Rhodotorula bogoriensis* que produziu em biorreator 51,0 g.L<sup>-1</sup> com glicose e extrato de levedura (SOLAIMAN *et al.*, 2015a), e *R. babjevae* que produziu 16,6 g.L<sup>-1</sup> com glicose e meio mineral (SEN *et al.*, 2017). Valores de produção de soforolipídios maiores que 100 g.L<sup>-1</sup> utilizando glicose e ácido oleico já foram obtidos em fermentações em biorreatores utilizando *S. bombicola* produzindo 199 g.L<sup>-1</sup> (DELBEKE *et al.*, 2016) e *C. albicans* geneticamente modificada produzindo 484,0 g.L<sup>-1</sup> (ZHANG *et al.*, 2018).

Após a produção de soforolipídios são necessárias etapa de purificação e caracterização para possíveis aplicações, assim, vários métodos são utilizados para obter estes glicolipídios mais puros. A separação do extrato bruto pode ser feita utilizando solventes orgânicos (acetato de etila e hexano), a quantificação por gravimetria (peso seco), utilização de cromatografia de alta eficiência (fase móvel de água e acetona) e espectroscopia de massas são essenciais para a identificação e separação das diferentes

formas estruturais dos soforolipídios (FONTOURA *et al.*, 2020). A caracterização por ressonância magnética nuclear ajuda a confirmar as estruturas mais importantes (MINUCELLI *et al.*, 2016).

### 3.2 PROPRIEDADES DOS SOFOROLIPÍDIOS PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS

Entre todos os biossurfactantes usados na indústria cosmética, os glicolipídios e lipopeptídios são os preferidos pelo seu perfil multifuncional, baseado principalmente em suas propriedades físico-químicas e atividades biológicas. Os soforolipídios apresentam propriedades emulsificantes, espumantes, umectantes e de alto poder detergente. Além disso, suas propriedades bactericidas e bacteriostáticas são interessantes para o controle da caspa, tratamento da acne, podendo ser até incorporados como ingrediente ativo em desodorantes. Existem produtos cosméticos, como batom para os lábios em forma de lápis, creme labial, sombra para os olhos, cosméticos em pó comprimido e soluções aquosas, onde os soforolipídios têm sido adicionados (MOLDES *et al.*, 2020).

Os soforolipídios apresentam boa compatibilidade com a pele com alta permeação e hidratação, podem apresentar atividade antioxidante e uma importante ação antimicrobiana representando ainda uma alternativa biodegradável para a aplicação em cosméticos (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009). Assim uso de soforolipídios como princípios ativos em formulações cosmecêuticas pode ser importante para a indústria de higiene pessoal e cosméticos, e poucos relatos são encontrados na literatura.

#### 3.2.1 Solubilidade E Permeação Na Pele

Os soforolipídios possuem ampla estabilidade a variação de pH, são solúveis a água em pH neutros, mas ficam dispersos em pH ácidos. Eles se dissolvem muito bem em etanol, metanol, acetonitrila e DMSO e são solúveis em óleo mineral, óleos vegetais, glicerol e propileno glicol (VAN BOGAERT *et al.*, 2011).

Caretta *et al.* (2021) realizaram testes de estabilidade com os soforolipídios produzidos por *S. bombicola* analisando a temperatura, pH e luz ultra violeta pela análise da tensão superficial. Cada parâmetro foi avaliado separadamente usando os soforolipídios diluídos em água destilada na concentração micelar de  $65 \text{ mg L}^{-1}$ . Os testes de estabilidade mostraram que não houve variações da superfície dos soforolipídios,

mantendo sua tensão superficial estável, inclusive após autoclavagem, pH até 10 e sobre radiação ultravioleta. Esses dados mostram que o soforolipídios produzidos apresentam boa estabilidade nas diferentes condições estudadas, o que o qualifica para aplicação industrial.

Vecino *et al.*, (2017) que discutem o uso de biossurfactantes em cosméticos, e relatam que os cosméticos como loções, géis e hidratantes em cremes contendo substâncias lipofílicas podem aumentar a umidade da pele, bem como promover barreiras de permeação das camadas epidérmicas, auxiliando no equilíbrio, principalmente em peles ásperas e secas. A alta permeação de biossurfactantes através da pele se relaciona com a semelhança com membranas celulares da pele com as estruturas de açúcares e lipídios que compõem os biossurfactantes. Considerando que a taxa relativa de difusão de compostos na bicamada lipídica das células da pele depende de afinidades dos compostos em contato, os compostos lipofílicos atravessam membranas na pele mais facilmente que os hidrofílicos.

### 3.2.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos soforolipídios tem sido estudada para a aplicação industrial, desde 1998 em trabalhos de Hillion *et al.* que estudaram o efeito antirradical livre para uso em cosmético, em produtos de higiene pessoal e fármaco-dermatológicos para cuidados de cabelo e pele. Os soforolipídios apresentaram efeitos de captura de radicais livres contra derivado de oxigênio (radical hidroxila) em 97% a 100% nas concentrações de 0,028% e 2,5% (p/v) respectivamente. As formas acídicas apresentaram efeito de captura de radicais livres de 98% com apenas 0,0092% de matéria seca (p/v). Além disso, os autores observaram que os soforolipídios (0,125 g/mL) mostraram efeito protetor de 47% contra radicais livres gerados por luz ultravioleta em cultura de fibroblastos.

Yang *et al.* (2012) demonstraram a atividade antioxidante de soforolipídios de *S. bombicola* produzidos com substratos óleo de soja e ácido oleico pelo método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os resultados mostraram uma atividade antioxidante de 15 a 60% utilizando óleo de soja e de 5 a 20% utilizando ácido oleico, e com dose dependente de 3,125 mg/mL até 50 mg/mL de soforolipídio.

Hoa *et al.* (2017) realizaram a produção e caracterização de soforolipídios utilizando óleo de peixe e avaliaram suas atividades antioxidantes, também pelo método

de DPPH, e os resultados mostraram a capacidade dos soforolipídios em eliminar moléculas de radicais livres com concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) de 4,45 mg/mL com porcentagem de inibição variando de 10 a 80%.

### 3.2.3 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos soforolipídios tem sido estudada desde o final dos anos 1980. Um dos primeiros relatos de soforolipídios como agentes antimicrobianos foi de Lang *et al.* (1989) onde os pesquisadores testaram soforolipídios de *Torulopsis bombicola* (*S. bombicola*) para bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus Epidermidis*, *Streptococcus faecium* e *Propionibacterium acne*; Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* e para os fungos *Candida albicans* e *Glomerella cingulata*. Nestes estudos, os soforolipídios demonstraram efeitos antibacterianos para as bactérias Gram positivas. As formas lactônicas mono e diacetilada apresentaram concentração inibitória mínima (MIC) de 6 a 15 mg/mL para *B. subtilis*, *S. epidermidis* e *S. faecium* e a forma acídica inibiu *B. subtilis*.

A atividade antimicrobiana do soforolipídio é caracterizada por mudanças ou ruptura da membrana, induzindo a lise e possível extravasamento do conteúdo citoplasmático das bactérias alvo. Esse efeito está relacionado com a presença das porções de açúcar e carboidratos da molécula, sendo assim, os soforolipídios, graças as suas características anfifílicas, diminuem a hidrofobicidade das membranas plasmáticas de bactérias, apresentando características bactericidas podendo induzir morte de células e biofilmes de bactérias Gram positivas e Gram-negativas (FREITAS *et al.*, 2018).

Essa atividade antimicrobiana tem sido estudada por nosso grupo em diferentes microrganismos. Fontoura *et al.* (2020) produziram soforolipídios de *S. bombicola* utilizando gordura de frango, e aplicaram contra bactérias Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) e bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*). Os resultados revelaram que houve redução da viabilidade microbiana quando o biossurfactante foi aplicado na concentração de 0,5 mg/mL contra bactérias Gram-positivas e 2 mg/mL contra bactérias Gram-negativas.

Hipólito *et al.* (2020) testaram a ação antimicrobiana dos soforolipídios contra 5 espécies de fungos contaminantes de alimentos, e os testes de microdiluição em placas de 96 poços mostraram ação contra *Fusarium oxysporum* e cinco espécies de *Aspergillus*

ssp. na concentração de 0,73 mg/mL, *Botrytis. cinerea* na concentração 0,43 mg/mL e *Rhizopus* ssp na concentração 0,23 mg/mL. Caretta *et al.* (2021) verificaram a ação dos soforolipídios contra os fitopatógenos *B. cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* que causam doenças em plantas.

Além de seus efeitos antimicrobianos, soforolipídios em combinação com outros compostos também foram relatados. Silveira *et al.* (2019) testaram a atividade de soforolipídio de *S. bombicola* (ATCC 22214) associados ao ácido láctico contra *Clostridium perfringens* (ATCC® 3624™) e *Campylobacter jejuni* (ATCC® 33560™). Os resultados mostraram que, para *C. perfringens*, a concentração inibitória mínima (MIC) de soforolipídio puro foi de 0,03 mg/mL, e em combinação com ácido láctico, 0,015 mg/ mL. Para *C. jejuni*, o MIC dos soforolipídio puro foi de 10 mg/mL, e em combinação com ácido láctico, 5 mg/mL, mostrando que o tratamento combinado de soforolipídio e ácido láctico foi capaz de manter a eficiência antibacteriana em apenas ½ MIC de cada composto, representando uma interação aditiva. Joshi-Navare *et al.* (2013) estudaram a ação sinérgica dos soforolipídios com antibióticos relatando que a combinação com tetraciclina causou o aumento de 25% na atividade antimicrobiana para *S. aureus* e quando combinados com cefaclor (antibiótico Cefalosporina) mostrou 48% de maior inibição para *E. coli*.

Todos esses trabalhos demonstram a importante atividade antimicrobiana dos soforolipídios e a ampla área de atuação, levando as buscas pela atividade antimicrobiana contra patógenos que causam doenças bacterianas de pele e óleos essenciais que potencializem as ações dos cosméticos.

### 3.3 PROPRIEDADES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS

Os óleos essenciais são utilizados em produtos para a pele devido à sua complexidade de compostos ativos, propriedades perfumantes e a demanda por produtos de origem natural. Além da utilização dos óleos essenciais como fragrância em formulações cosméticas e perfumes, suas atividades antimicrobianas e antioxidantes podem auxiliar na conservação do produto, garantindo proteção contra bactérias e fungos e melhorando as propriedades dermocosméticas do produto final (SHERMEEN *et al.*, 2021). Alguns óleos essenciais são utilizados para combater o envelhecimento da pele, danos causados pela acne, para limpeza, para proteção, para melhorar o odor, entre outras

aplicações, sendo considerados valiosos na indústria cosmética (CARVALHO; ESTEVINHO, SANTOS, 2016).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada com a sua capacidade de romper e de permeabilizar as membranas celulares dos microrganismos, por apresentarem na sua composição compostos com grupos funcionais, como grupamentos hidroxilas, capazes de alterar as características estruturais e funcionais destas membranas, causando perda da integridade destas estruturas celulares, levando à perda de macromoléculas e à lise celular (DREGER; WIELGUS, 2013). Hammer *et al.* (1999) estudaram atividade antimicrobiana de cinquenta e dois óleos essenciais contra diversos microrganismos, tendo como resultado que o óleo de capim-limão e de orégano inibiram todos os organismos testados quando empregados em concentrações acima de 2% (v/v).

Embora os óleos essenciais sejam constituídos maioritariamente por compostos pertencentes à família dos terpenos, a quantidade de compostos fenólicos, flavonoides e os polifenóis que lhes conferem características antioxidantes (EDRIS, 2007). Wang e colaboradores (2009) avaliaram quarenta e cinco tipos de óleos essenciais comumente usados quanto a sua capacidade de sequestro do radical DPPH, mostrando que o óleo de canela e de cravo apresentaram os melhores resultados, podendo apresentar atividade antioxidante de 96,74% e 96,12% a 10 mg/mL, respectivamente.

Em destaque, o óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martini*) é considerado atóxico e reconhecido como seguro pela Agência norte-americana Food and Drug Administration dos Estados Unidos e amplamente utilizado em uma variedade de aplicações devido ao seu potencial antioxidante, antimicrobiano, antifúngico e propriedades repelentes (JUMMES *et al.*, 2020). Sua composição inclui monoterpenos, principalmente geraniol (cerca de 80%), hidrocarbonetos, metabólitos carotenóides e metabólitos relacionados a via do chiquimato (CEBI, 2021). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de palmarosa foi estudada por Friedman *et al.* (2002), que encontraram concentrações bactericidas de 0,07 até 0,27 % (v/v) para *E. coli*, *S. enterica*, *C. jejuni* e espécies de *Monocytogenes*. Scherer *et al.* (2009) observaram valores de MIC de 400 a 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. aureus* e *E. coli* respectivamente.

A combinação com outros componentes e a encapsulação de óleos essenciais são estratégias utilizadas para aumentar as atividades biológicas e/ou para melhorar a estabilidade e biodisponibilidade desses compostos. O efeito sinérgico de dez óleos essenciais com antibióticos contra cepas de *S.aureus* e *P.aeruginosas* foi estudado por

Oliveira *et al.* (2020), mostrando que todos os óleos estudados representaram interações aditivas e efeitos sinérgicos, destacando o óleo essencial de palmarosa a 250 µg/mL, que associado à penicilina foi capaz de diminuir o seu MIC de 4,00 µg/mL para 0,06 µg/mL, o que corresponde a uma diminuição de 64 vezes a atividade antimicrobiana para *S. aureus* LMG 15975.

Sendo assim, os óleos essenciais são considerados produtos de origem natural cujas propriedades multifuncionais são bastante atrativas para as indústrias cosmética e farmacêutica no desenvolvimento de produtos de origem natural e biodegradável, que sejam igualmente eficazes para as atuais necessidades dos consumidores.

### 3.4 DOENÇAS BACTERIANAS DE PELE

Espécies microbianas que residem permanentemente na pele estão em equilíbrio dinâmico com o tecido do hospedeiro e são constituídas de bactérias Gram-positivas *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* e *Acinetobacter*, e principalmente *S. epidermidis* (cerca de 90%). No entanto, alguns microrganismos patogênicos podem estar presentes como *S. aureus* relacionado a dermatites e infecções de pele, bem como os microrganismos transitórios tais como *E. coli* e *P. aeruginosa* (RAMASAMY *et al.*, 2019).

O fator mais comum que leva ao desenvolvimento de infecções de pele envolve uma violação da barreira da pele, causando feridas e posterior contaminação por microrganismos, principalmente por espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* (INRAHIM *et al.*, 2015). O microrganismo *S. aureus* é um dos principais causadores de doenças como endocardite, bacteremia, pneumonia e também pode gerar infecções da pele, desencadeando desde sintomas leves à condições fatais, por isso é considerado o principal causador de infecções hospitalares (MARQUES; ABBADE, 2020).

A acne vulgaris (comumente chamada de acne) é uma das mais comuns doenças de pele crônica. É uma doença que começa, muitas vezes, no início da adolescência causando dor, seborreia, lesões e cicatrizes, afetando regiões sebáceas distribuídas no rosto, pescoço e membros superiores a qual também influencia diretamente em efeitos psicológicos e no bem-estar do paciente (RAMASAMY *et al.*, 2019).

Segundo Xu e Li (2019), os fatores que contribuem para a acne são: a hipersecreção do sebo, proliferação anormal e/ou diferenciação de queratinócitos no folículo piloso, colonização bacteriana e resposta inflamatória do hospedeiro. desta forma,

observa-se hiperproliferação de *Propionibacterium acnes* e atuando como gatilho do sistema imunológico levado a inflamação cutânea na unidades pilosebáceas. Pode envolver também outras espécies, como *S. aureus*, *S. epidermidis* e alguns fungos do gênero *Malassezia* (DRÉNO *et al.* 2020).

As infecções bacterianas da pele se não tratadas podem levar a complicações com risco de vida, incluindo sepse, endocardite e infecções ósseas e articulares (ALEXANDER *et al.* 2019). De acordo com Cong *et al.* (2019), *P. acnes* e *S. aureus* possuem propriedades virulentas as quais induzem a degradação do tecido hospedeiro, incluindo liberação de lipases, liases e outros fatores.

Os agentes anti-acne comumente usados incluem retinóides, peróxido de benzoila, ácido azeláico, antibióticos e agentes hormonais. Entretanto, alguns estudos relatam a ocorrência de efeitos adversos incomuns e graves em decorrência de alguns tratamentos, tais como alterações cutâneas e efeitos tóxicos sistêmicos podendo haver ressecamento de pele e corpo, aumento do colesterol, triglicerídeos e enzimas hepáticas (PASCHOAL *et al.* 2020). Além disso, o uso de medicamentos antibióticos pode acarretar em desenvolvimento de cepas resistentes a antibióticos e a formação de um biofilme com agregação complexa de polímeros extracelular, que confere resistência a células inflamatórias do hospedeiro e a agentes antibacterianos, trazendo dificuldades para os tratamentos dos pacientes (CONG *et al.* 2019). Diante disso, a busca por substâncias ativas naturais que tenham atividades antimicrobianas e que apresentem benefícios para os pacientes, tanto com acnes tanto com infecções bacterianas de pele, está em constante ascensão.

### 3.5 FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS

Formulações cosmecêuticas são basicamente cosméticos funcionais, capazes de assegurar a aplicação tópica das substâncias biologicamente ativas, trazendo benefícios semelhantes aos medicamentos (DRAELOS, 2009; NEWBURGER, 2009). Várias matrizes podem ser usadas como veículos de transporte de ativos no local da aplicação, como as formulações com bases cosméticas (SILVA *et al.* 2020) e também os filmes biodegradáveis têm se destacado nos últimos anos (Ashby *et al.* 2011; Solaiman *et al.* (2015b)

Dentre as bases cosméticas que se destacam estão as emulsões e os hidrogéis, devido as características de fácil espalhabilidade e alta estabilidade. Os hidrogéis são



formados de polímeros hidrofílicos que formam sistemas tridimensionais, originando redes que protegem a fase líquida e impedem o extravasamento e colapso da estrutura (processo chamado de geleificação). A sensação para os usuários é de frescor, com boa espalhabilidade além de ser transparente e não gorduroso (FREITAS *et al.*, 2015). Silva *et al.* (2020) desenvolveram formulações cosmecêuticas com hidrogel utilizando levana e óleo essencial de canela com características antioxidantes, hidratantes e antimicrobianas contra os microrganismos *S. aureus*, *Staphylococcus spp*, *E. coli* e *P. aeruginosa* tendo a com capacidade de hidratação de 92% resultando em um cosmecêutico multifuncional.

Os filmes biodegradáveis são formados geralmente por um biopolímero, (poliésteres, polissacarídeos ou proteína), agentes plastificantes (glicerol ou sorbitol) agente ajustador de pH e solventes (água, metanol, etanol entre outros) (SCUDELER, 2019). Para aplicação na pele, os filmes devem ser atóxicos, não aderentes, não alergênicos, devem manter o meio úmido e serem facilmente removidos sem trauma (VOSS *et al.*, 2020). Ashby *et al.* (2011) e Solaiman *et al.* (2015b) estudaram várias matrizes incluindo polihidroxibutirato (PHB), alginato, pectina, ácido polilático (PLLA) e policaprolactona para a aplicação tópica facial de soforolipídios de *S. bombicola* contra a bactéria oportunista da acne *Propionibacterium acnes*, trazendo novas possibilidades para tratamentos alternativos da doença acne.

A pululana é facilmente solúvel em água, produz pastas e filmes incolores, inodoros e atóxicos. Estudos realizados com a pululana mostraram que esse biopolímero pode ser utilizado como veículo para compostos bioativos, filmes comestíveis, embalagens para alimentos e produtos farmacêuticos. Chen *et al.* (2018) utilizaram os soforolipídios como antimicrobiano em uma formulação contendo pululana, promovendo 100% de inibição de *S. aureus* utilizando 2,4 g.L<sup>-1</sup> de soforolipídios e 28% e 14,53% de inibição para *E.coli* e *C. albicans* respectivamente quando utilizado 4.0 g.L<sup>-1</sup> do ativo.

O amido também se destaca devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade para produção de filmes. Hipólito *et al.* (2021) produziram pela primeira vez filmes a base de amido com soforolipídios e analisaram suas propriedades mecânicas, barreiras, microestruturas, solubilidade e atividade antimicrobiana. Os resultados mostraram uma boa incorporação de soforolipídios aos filmes de amido, sendo filmes termoestáveis, flexíveis e apresentaram promissora atividade antifúngica nas concentrações de 5% e 10% (p/v) de soforolipídios com total inibição para o fungo *Botrytis cinerea*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMOS E PRESERVAÇÃO

Produção de soforolipídios: *Starmerella bombicola* ATCC 22214, obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA), que faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, preservada em meio contendo (g/L) 10 de glicose; 3 de extrato de levedura, 3 de extrato de malte, 5 de peptona, 20 de ágar. As condições foram pH  $6,0 \pm 0,2$ , sendo o repique da cepa realizado a cada quatro semanas mantido a 4°C.

Para a atividade antimicrobiana: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222 cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da Universidade Estadual de Londrina, preservados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) com 25% de glicerol a -20°C.

O óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martini*) foi adquirido da empresa Aroma, estabelecimento local em Londrina, no Paraná.

### 4.2 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS

Para a produção de soforolipídios, o inóculo *S. bombicola* foi cultivado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50mL do meio de preservação sem o ágar, por 48h a 30°C e 150 rpm. O inóculo foi padronizado a 0,5g/L, relacionado a uma curva de biomassa em g/L. As fermentações foram conduzidas em frascos de Erlenmeyer de 1 L com 250 mL do meio de fermentação contendo em (g/L) 100 de ácido oleico e 100 de glicose sob agitação de 150 rpm, a 30°C por 264 horas (SILVEIRA *et al.*, 2019).

A fermentação foi interrompida por centrifugação a 9956 x g por 15 min e do precipitado, a biomassa foi quantificada relacionando com a curva de biomassa (g/L) e do sobrenadante foram extraídos os soforolipídios com acetato de etila 1:1 (3x) e hexano, metanol e água 5:(4:1).

A fase metanólica que contém os soforolipídios foi seca em estufa até eliminação completa do solvente. A glicose residual foi quantificada pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945) e o ácido oleico quantificado por

gravimetria, a partir da extração com hexano.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SOFOROLIPÍDIOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O sofrorolipídio foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em comparação com o padrão 1',4"-sophorolactona 6', 6"-diacetato (Sigma Aldrich, USA), utilizando detector de arranjo de iodo, utilizando coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® C18 da Shimadzu (4,6 x 250mm; 4,6mm; 12nm) (SILVEIRA *et al.*, 2019).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS SOFOROLIPÍDIOS E ÓLEO ESSENCIAL DE PALMAROSA

Foi realizada pelo método DPPH (2-2-difenil-1-picril-hidrazil), conforme descrito por Srikanth *et al.* (2015) nas concentrações de 2 a 6 mg/mL de sofrorolipídios e 0,2 a 0,6 mg/mL de óleo de palmarosa em metanol. A partir dos melhores valores da atividade antioxidante, as concentrações de 4 mg/mL de sofrorolipídios e 0,4 mg/mL de óleo essencial de palmarosa foram definidas para aplicação nas formulações cosméticas. A mistura reacional foi composta de 1 mL da solução das amostras e 0,3 mL da solução de DPPH, e foi incubada em ambiente escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Após, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 517 nm. Para o branco foi utilizado 1 mL de cada amostra e 0,3mL de metanol e para controle foi utilizado 0,1 mL de metanol e 0,3 mL de DPPH. Uma amostra contendo ácido ascórbico foi utilizada como padrão.

A taxa de inibição (%) do radical livre será calculada conforme a equação:

$$\% \text{ inibição} = \left( \frac{ABS \text{ do controle} - ABS \text{ da amostra}}{ABS \text{ do controle}} \right) \times 100$$

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS SOFOROLIPÍDIOS E DO ÓLEO ESSENCIAL DE PALMAROSA

A atividade antimicrobiana foi determinada por concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo Mueller - Hinton (MH) em placas de 96 poços (NCCLS, 1999). *S. aureus* e *S. epidermidis* foram cultivados em ágar MH a 37 °C por 24

horas. O *P. acnes* foi cultivado meio RCM (Meio Clostridial Reforçado) em condições anaeróbicas utilizando Gas-Pak (BD, Sparks, MD, EUA) a 37°C por 72 horas.

As suspensões bacterianas foram preparadas a  $1,5 \times 10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup> (0,5 na escala de McFarland). Soforolipídios foram solubilizados em etanol absoluto 10% (p/v) e utilizados nas concentrações de 1.000 a 7,815 µg.mL<sup>-1</sup> e o óleo de palmarosa de 1% a 0,007%. As bactérias foram adicionadas (50 µL) atingindo a concentração final de  $7,5 \times 10^5$  UFC. mL<sup>-1</sup> em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Controle positivo (somente bactérias); negativo (somente meio) e controle com etanol foram realizados. O MIC foi avaliado visualmente considerando a menor concentração de sofrorolipídios ou de óleo de palmarosa que inibe o crescimento microbiano.

O efeito de interação dos sofrorolipídios e do óleo de palmarosa foi determinado através do método de Checkerboard realizado por diluição em caldo (Traub e Kleber, 1975). Os sofrorolipídios nas concentrações de 250 a 0,48 µg.mL<sup>-1</sup> foram preparados nas linhas horizontais e o óleo de palmarosa de 2% a 0,015% foi preparado nas colunas verticais nas placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. A concentração inibitória fracionária (FIC) e o índice de concentração inibitória fracionada (FICI) foram calculados usando a seguinte equação:

$$\sum FICI = FIC_{SL} + FIC_O$$

$$\sum FICI = (\text{MIC do SL na combinação}) / (\text{MIC do SL}) + (\text{MIC do óleo na combinação}) / (\text{MIC do óleo})$$

#### 4.6 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS

Foram desenvolvidas duas formulações cosmecêuticas, uma em forma de gel creme e outra em forma de filme biopolimérico.

As formulações gel creme foram desenvolvidas a partir de uma base designada Lecigel™ (Tabela 1). Foram desenvolvidas duas formulações cosméticas com as concentrações de sofrorolipídios e óleo de palmarosa definidas pelos testes antimicrobianos e antioxidantes e uma formulação base sem ativos que foi usada como controle. Para o preparo dos cosméticos os sofrorolipídios foram diluídos em glicerina a quente, e incorporados na formulação em agitação mecânica por 5 minutos.

**Tabela 1** – Composição das formulações cosmecêuticas gel-creme

	Base	FI	FII
Copolímero de acrilatos de sódio e lecitina (Lecigel™) (g)	3	3	3
Glicerina (g)	5	5	5
Fenoxietanol e metilisotiazolinona (neolone®) (g)	-	-	0,50
Sophorolipids (g)	-	0,40	0,40
Óleo essencial de palmarosa (g)	-	0,04	0,04
Água destilada (mL)	92,00	91,56	91,06

As formulações dos filmes biopoliméricos foram produzidas por casting de acordo com Sueiro *et al.* (2016). Oito formulações foram preparadas com diferentes proporções de soforolipídios (0, 2,5, 5,0 e 10,0%), com e sem ácido cítrico (Tabela 2). As soluções foram preparadas sob aquecimento até 70 °C e agitação constante por 20 minutos até a completa homogeneização dos polímeros. Em seguida, 40 g das formulações preparadas foram vertidas em placas de acrílico (13,5 cm de diâmetro) e depois deixadas secar por 24 horas a 30 °C com circulação e renovação de ar. Os filmes secos foram armazenados a 58% de umidade relativa e 25°C até o uso.

**Tabela 2** – Composição das formulações cosmecêuticas de filmes biopoliméricos

Formulações	Amido (g)	Pululana (g)	Soforolipídios (g)	Glicerol (g)	Ácido cítrico (g)	Água destilada (mL)
AP	6	6	-	2,40	-	385,60
AP-SL2.5	6	6	0,15	2,40	-	385,45
AP-SL5.0	6	6	0,30	2,40	-	385,30
AP-SL10.0	6	6	0,60	2,40	-	385,00
APr	6	6	-	2,40	0,36	385,24
APr-SL2.5	6	6	0,15	2,40	0,36	385,09
APr-SL5.0	6	6	0,30	2,40	0,36	384,94
APr-SL10.0	6	6	0,60	2,40	0,36	384,64

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES GEL CREME

As formulações foram caracterizadas em 2, 30, 60 e 90 dias em condições de exposição, incluindo temperatura elevada ( $37 \pm 2$  °C), temperatura baixa ( $5 \pm 2$  °C), temperatura ambiente, exposição à radiação luminosa (sol) e ambiente escuro pelas análises de estabilidade, ensaios organolépticos, ensaios físico-químicos, retenção de umidade e estabilidade acelerada.

##### 4.7.1 Análise De Estabilidade

O teste de estabilidade foi realizado pelo método de centrifugação, utilizando cinco gramas de cada formulação em tubos de ensaio cônico e de plástico na centrífuga a 3000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. Os resultados foram visualizados macroscopicamente após a centrifugação e interpretados como N (normal, sem separação de fases) ou SF (com separação se fases).

##### 4.7.2 Ensaio Organolépticos

As formulações foram avaliadas em triplicata primeiramente quanto ao aspecto, sendo analisadas macroscopicamente comparando com a amostra padrão (sem soforolipídio) verificando se demonstram alguma modificação como separação de fases, precipitação ou turvação. A coloração e odor foram avaliados através de análise visual sob condição luz branca e por meio olfativo respectivamente, utilizando a referência das amostras padrões (sem os ativos) sendo armazenados nas mesmas condições em embalagens de vidro. Os resultados de coloração e odor foram interpretados como: normal, levemente modificado e intensamente modificado.

##### 4.7.3 Ensaio Físico Químicos

As características físico-químicas: densidade, pH e espalhabilidade de cada formulação foram realizadas em triplicata de acordo com o guia de estudo de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2008).

#### 4.7.3.1. Determinação da densidade

As densidades das formulações foram avaliadas utilizando um pecnômetro de vidro com volume de 10 mL e utilizando como padrão a densidade da água. O pecnômetro vazio foi pesado ( $M_0$ ), e em seguida foi adicionado a água até transbordar e após secar o pecnômetro pesa-se ( $M_1$ ), igualmente a adição da água, após a diluição das amostras (1:10) foram adicionadas da mesma maneira e pesadas ( $M_2$ ). Para o cálculo será utilizada a equação:

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

#### 4.7.3.2. Determinação do pH

Os valores médios de pH ( $n=3$ ) foram obtidos por potenciometria direta. A avaliação foi por pH digital em temperatura ambiente de soluções contendo 5 g de amostra diluído em 45 mL de água destilada (diluição 1:10).

#### 4.7.3.3. Determinação da espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi definida pela metodologia descrita por Borghetti e Knorst (2006) em triplicata, a aplicação de 0,5g de amostras em placas de vidro sobre uma escala de papel milimetrado. A determinação do espalhamento foi realizada medindo-se o diâmetro da superfície abrangente em intervalos de um minuto com pesos pré-determinados (2, 5 e 10g). Os cálculos seguirão a equação:

$$Ei = (d^2\pi) / 4$$

Onde:

Ei: Espalhabilidade da amostra para um determinado peso em milímetro quadrado ( $\text{mm}^2$ )  
e d: diâmetro médio em milímetro (mm).

#### 4.7.4 Retenção De Umidade

Para a retenção de umidade foi aplicado o método de gravimetria segundo Zhang *et al.* (2012) e Zhao *et al.* (2013). Em cadinhos previamente tarados foi misturado 1g das formulações e 1 mL de água foram armazenados por 96h (temperatura ambiente) em dessecador de umidade selado com a solução saturada de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (43% umidade relativa

(UR)). A capacidade de retenção de umidade (RU) foi avaliada pela porcentagem de água residual nas amostras, calculado pela equação

$$RU(\%) = \frac{pt}{po} \times 100$$

Onde, po é o peso da água destilada adicionada (1mL) e pt é o peso da água após 96h no dessecador.

#### 4.7.5 Teste Estabilidade Acelerada

O teste de estabilidade acelerada foi analisado no período de quinze dias, submetendo as amostras em condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Os cremes foram submetidos a aquecimento em estufa ( $40 \pm ^\circ\text{C}$ ) e resfriamento ( $4 \pm ^\circ\text{C}$ ), em ciclos alternados de 24 horas, que perfaz 7 ciclos

#### 4.7.6 Atividade Antioxidante

Realizado conforme descrito na sessão 4.4 e óleo essencial pelo método utilizando na concentração de 10 mg/mL das formulações.

#### 4.7.7 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelos ensaios de cinética e tempo de morte, de acordo com o NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Suspensões de  $10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup> de bactérias foram incubadas a 37°C em presença de 0,1g de cada uma das 3 formulações em microtubos no tempo 0, 1 e 2 horas. Alíquotas de 100 µL de cada tubo teste foi diluído (razão 10) em salina e cultivada em triplicata sobre placa de ágar MH. A contagem de células viáveis foi realizada após a incubação dos microrganismos nas condições ideais descritas no item 4.5.



## 4.8. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS

### 4.8.1 Espessura

A espessura foi determinada utilizando um micrômetro manual Mitutoyo (São Paulo, Brasil) com resolução de 1µm para determinar a espessura dos filmes em três pontos diferentes em cada filme, sendo considerada a média aritmética das medições.

### 4.8.2 Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV)

As análises MEV foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico JSPM 100 (Japão) a uma voltagem de aceleração de 20 kV. As amostras de filmes foram montadas em stubs de bronze com fita dupla face e depois revestidas com uma camada de ouro (40-50 nm), permitindo a visualização da superfície.

### 4.8.3 Solubilidade

As amostras (2 cm x 2 cm) foram secas em estufa com circulação e renovação de ar a 60 °C por 24 h e pesadas (peso inicial em base seca). Em seguida as amostras foram pesadas (peso seco inicial) e mergulhadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de água destilada, vedados e agitados a 50 rpm, 25 °C por 24 h em incubadora orbital (Shaker Marconi MA 420). Após este período, as amostras foram removidas cuidadosamente e secas em estufa com circulação de ar por 24 h a 60 °C, para determinar a massa do material não solubilizado (peso final).

A solubilidade foi expressa por porcentagem de material seco solubilizado conforme a equação:

$$\text{Solubilidade (\%)} = ((m_i - m_f) / m_i) * 100$$

Onde,  $m_f$  é a massa final da amostra e  $m_i$  é a massa inicial da amostra, ambos em base seca.

### 4.8.4 Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada De Fourier (FT-IR)

O experimento foi conduzido em aparelho Shimadzu FTIR-8300 com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, utilizou-se uma escala de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram incorporadas ao

KBr e submetidas à alta pressão para a produção das pastilhas. Os resultados foram integrados pelo programa Shimadzu Hyper IR. A análise foi realizada no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

#### 4.8.5 Permeabilidade Ao Vapor De Água (PVA)

A PVA foi determinada gravimetricamente de acordo com as normas da American Society for Testing and Materials (ASTM E96-95, 1996) com modificações. Cada amostra (triplicata) foi colocada em uma cápsula de permeabilidade, e seu interior foi parcialmente preenchido com  $\text{CaCl}_2$  anidro, de modo a se obter 0% de UR no interior destas cápsulas, que foram seladas para garantir que a transferência de vapor de água ocorresse exclusivamente através do filme. O conjunto (cápsula + filme) foi pesado em tempo zero e armazenado em dessecador a temperatura ambiente, contendo em seu interior uma solução saturada de NaCl que proporcionou um ambiente com 75% de UR. Após um período de equilíbrio de 2 h as células foram pesadas em intervalos regulares durante 24 h. A mudança de massa da cápsula de permeação foi registrada, e o ganho de massa(g) foi desenhado um gráfico em função do tempo (t). Da reta obtida por regressão linear foi determinado o coeficiente angular e calculada a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TVA):

$$\text{TVA} = \frac{g}{t.A}$$

Onde,  $g/t$  é o coeficiente angular da reta (regressão linear) e  $A$  é a área de permeação ( $\text{m}^2$ ) da cápsula. Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{PVA} = \frac{\text{TVA}.m}{\Delta P}$$

Onde,  $m$  é a espessura média do filme ( $\text{m}^2$ ),  $\Delta P$  é a diferença de pressão de vapor de água do ambiente contendo  $\text{CaCl}_2$  anidro (0% de UR) e solução saturada de NaCl (75% de UR).

#### 4.8.6 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando um texturômetro (Stable Micro Systems modelo TA.TX2 Inglaterra) de acordo com as Normas da ASTM (1996). Os filmes foram cortados (25 x 100 mm) e ajustados entre as garras pneumáticas do equipamento. A distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de tração de 500 mm/min. Foram determinadas as seguintes propriedades de tração: resistência máxima à tração (MPa) e alongação na ruptura (%), calculadas pelas equações a seguir:

$$\text{Resistência máxima à tração} = \frac{F_{\max}}{A_{\min}}$$

Onde,  $F_{\max}$  é a força máxima (N) registrada no equipamento e  $A_{\min}$  é a área mínima inicial da amostra (m<sup>2</sup>).

$$\text{Alongação na ruptura} = \frac{A_T}{DG} \times 100$$

Onde,  $A_T$  é a alongação total da amostra até a ruptura (m) e o DG é a distância inicial entre as garras (m).

#### 4.8.7 Atividade Antimicrobiana

Foram avaliadas pelos ensaios de cinética e tempo de morte, de acordo com o NCCLS com modificações (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Os filmes foram cortados em discos usando um furador, e ambos os lados foram esterilizados com luz ultravioleta por 15 min. Dez microlitros de suspensões de 10<sup>6</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> de bactérias foram incubadas com cada disco das 8 formulações em microtubos no tempo 0, 1 e 2 horas. Os discos foram colocados em microtubos com 1 mL de caldo MH, agitados por 1 minuto, seguido por diluição em série com salina e cultivada em triplicata sobre placa de ágar MH. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h, e as unidades

formadoras de colônias (UFC) foram contadas. O teste foi realizado em triplicata, e o filme sem soforolipídios foi utilizado como controle.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Software Statistica 7.0 (2004) e valores foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ . Para PVA e propriedades mecânicas dos filmes foi realizado o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos nessa dissertação estão apresentados em forma de uma patente, um capítulo de livro e dois artigos científicos.

### 5.1 PATENTE

**Título: Cosmético antiacne por processo biotecnológico**

**Autores:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, **Giovanna Amaral Filipe**, Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni, Briani Gisele Bigotto e Cristiani Baldo da Rocha.

**Número:** BR 10 2021 023135 1

**Protocolada em:** 18/12/2021

**Resumo:** A presente invenção apresenta o desenvolvimento de uma formulação cosmética contendo soforolipídios e óleo essencial de palmarosa. Os soforolipídios foram produzidos por fermentação submersa utilizando a levedura *S. bombicola* em meio contendo ácido oleico, glicose e extrato de levedura. Os soforolipídios produzidos foram extraídos com acetato de etila, quantificados e caracterizados para uso das formulações cosméticas. As formulações foram desenvolvidas com 2,0 a 5,0% de Sodium Acrylates Copolymer (and) Lecithin, 0,3% a 0,7% (p/v) de phenoxyethanol (and) methylisothiazolinone, 3,0% a 7,0 (p/v) de glycerin, 3,0% a 7,0% (p/v) de soforolipídios e 0,3% a 0,7 % (p/v) de óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martini*). Os resultados demonstraram que a formulação desenvolvida apresentou potente atividade antimicrobiana contra os microrganismos *P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus*. Assim, este produto pode ser promissor no segmento da indústria de cosméticos destinado ao tratamento da pele acneica, bem como, pela indústria farmacêutica.

### 5.2 CAPÍTULO DE LIVRO

**Título do livro:** A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2

**Título do capítulo:** Produção e propriedades dos soforolipídios para aplicação em formulações cosmecêuticas

**Autores:** **Giovanna Amaral Filipe**, Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

DOI: 10.22533/at.ed.547210104

ISBN: 978-65-5706-954-7

<https://www.atenaeditora.com.br/post-ebook/3967>

**Publicado em:** Atena Editora, 2021.

## 5.3 ARTIGO 1

**Development of a multifunctional and self-preserving cosmetic formulation using sophorolipids and palmarosa essential oil for acne treatment****Submitted: Journal of Applied Microbiology**

Giovanna Amaral Filipe <sup>1</sup>, Briani Gisele Bigotto <sup>1</sup>, Cristiani Baldo<sup>1</sup>; Marcelly Chue Gonçalves<sup>2</sup>, Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>2</sup>, Audrey Alessandra S. G. Lonni<sup>3</sup>, Maria Antonia P. Colabone Celligoi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, <sup>2</sup>Department of Microbiology, <sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Sciences,

\*Corresponding author. Tel.: +55 43 33714270 E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br)

**Abstract**

**Aims:** The objective of this study was to evaluate the antibacterial effect of sophorolipids in combination with palmarosa essential oil and to develop a cosmetic formulation against acne-causing bacteria.

**Methods and Results:** The antibacterial activity of sophorolipids, palmarosa oil and their combined effect were evaluated by broth microdilution and checkerboard methods. Antioxidant activity was determined by DPPH method. The results showed that the compounds presented antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The combination of sophorolipid and palmarosa oil resulted in synergistic and additive interaction reducing the concentration needed for effectiveness against *S. aureus* and *S. epidermidis*, to 98,4% and 50%, respectively. The compounds interaction showed an additive effect for antioxidant activity. The cosmetic formulation without any chemical preservative present antibacterial activity against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. The pH values and organoleptic characteristics of formulations remained stable under all conditions tested.

**Conclusions:** The association of sophorolipids and palmarosa oil resulted in a self-preserving cosmetic formulation with great stability, and effective antioxidant and

antibacterial activity against acne-causing microorganisms.

**Significance and Impact of the Study:** This study showed the development of an effective multifunctional cosmetic formulation with natural preservatives to treat acne vulgaris and other skins infections disease.

**Key words:** sophorolipids, palmarosa essential oil, antibacterial, natural preservatives, acne vulgaris

## Introduction

Acne vulgaris is a follicular disorder that affects 85% of adolescents, frequently starts in preadolescence, and continues into adulthood. *P. acnes* is mainly responsible for the follicle's infections, but the presence of *S. epidermidis* and *S. aureus* at the site of infection is also reported (Fox *et al.* 2016). Acne vulgaris is a chronic disease that needs extended therapy for a satisfactory result. The patient treatment adherence is a main problem, mostly for topical treatments, due to side effects and the extended treatment time, leading to acne recurrence and increased of medical costs (Dikicier, 2019). Topical antibiotics is frequently used for treatment of acne vulgaris, but is not recommended their use as monotherapy due to risk of antibiotic resistance after a prolonged time of treatment (Habeshian and Cohen, 2020). Pronounced resistance rates for *P. acnes* to erythromycin and clindamycin have been reported globally (Walsh *et al.* 2016; Adler *et al.* 2017).

The growing concern with skin health has driven the exploration for new cosmetic products based on natural sources to treatment of skin infections, as they cause less side effects and does not harm the environment (Morone *et al.* 2020). Cosmetics formulations requires antimicrobial preservatives to guarantee the safety of consumers and to increase their shelf-life. In addition, antioxidant preservatives capable of suppressing oxidation and the formation of free radicals is also essential into the formulations. However, chemical synthetic preservatives might be present several toxic effects to the consumer or/and induces microbial resistance when used in lower concentrations (Halla *et al.* 2018).

Molecules from biotechnological source as biosurfactants are very studied due to their biological properties and renewable characteristics (Vecino *et al.* 2017). Sophorolipids are biosurfactants composed of a glucose disaccharide (sophorose) linked to a long chain of fatty acid, produced by non-pathogenic yeasts such as *Starmerella bombicola* (Van Bogaert *et al.* 2011). Sophorolipids have good skin compatibility,

moisturizing properties and biological activities and could be used to treat acne, dandruff and body odors (Lourith and Kanlayavattanukul 2009). Our research group has already reported the antimicrobial activity of sophorolipids against pathogenic microorganisms *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Enteric Salmonella* *Proteus mirabilis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium* (Fontoura *et al.* 2020).

In addition, essential oils are also widely used in cosmetic formulations due to their fragrance, antimicrobial, antioxidant and antifungal activities (Lodhia, Bhatt and Thaker 2009). Besides, essential oils may be chosen instead of synthetic materials to promote the absorption of hydrophilic and lipophilic drugs in skin layers (Herman and Herman, 2015). Palmarosa essential oil (*Cymbopogon martinii*) presents antioxidant and antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Its composition is rich in monoterpenes and geraniol, providing a pleasant fragrance and efficiency in inhibiting the bacterial growth (Rihayat *et al.* 2020).

In this sense, the development of innovative and sustainable cosmetic products, with natural conservative ingredients and multifunctional molecules is of great importance for treatment of acne vulgaris and other skin infections disease. Thus, in this study we describe the development of a multifunctional cosmetic formulation using sophorolipids combined with palmarosa essential oil with antimicrobial, antioxidant, organoleptic and self-preserving properties.

## **Material and methods**

### **Microorganisms and culture media**

The yeast *S. bombicola* (ATCC® 22214™) was purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and used for sophorolipids production. The microorganisms *S. aureus* ATCC 25923, *P. acnes* ATCC 6919 and *S. epidermidis* ATCC 1222 were provided by the Laboratory of Basic and Applied Bacteriology of the State University of Londrina, Paraná, Brazil. The palmarosa essential oil (*Cymbopogon martinii*) was purchased from the company Via Aroma, Londrina, Paraná.

### **Production and characterization of sophorolipids**

Sophorolipids were produced by fermentation with *S. bombicola* (ATCC® 22,214™) in a bioreactor using glucose and oleic acid as substrates, based on the conditions described by Silveira *et al.* (2019). Sophorolipids recovery was performed by solvent extraction, according to the protocol described by Fontoura *et al.* (2020). Analysis of samples by



HPLC showed that the sophorolipids produced in comparison to the standard were mainly lactone C18:1 diacetylated.

### **Antibacterial activity of sophorolipids and palmarosa oil**

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution method. *S. aureus* and *S. epidermidis* were cultured on MH agar at 37°C for 24 hours. Bacterial suspension  $7,5 \times 10^5$  CFU. mL<sup>-1</sup> was placed in 96-well microplates. Tested concentrations of sophorolipids ranged from 7.815 to 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. Palmarosa essential oil ranged from 78.12 to 10000 µg.mL<sup>-1</sup>. Strains were incubated for 24 hours at 37°C, and the MIC was determined as the lowest concentration of sophorolipids or palmarosa essential oil that inhibited the visible growth of bacteria.

### **Antibacterial combination assay**

Checkerboard assay was performed to verify the interaction between sophorolipids and palmarosa oil using 96-well microplates with two-fold serial dilutions of the compounds according to Traub and Kleber (1975), with modifications. Bacterial suspensions were prepared as described in the broth microdilution method. Sophorolipids (0.48 to 250 µg.mL<sup>-1</sup>) and palmarosa essential oil (150 to 20000 µg.mL<sup>-1</sup>) were placed in the horizontal rows and vertical columns, respectively. Bacteria at  $7,5 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> were incubated in MH with the antimicrobial compounds at 37 °C for 24 h. The fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated as  $FICI = FIC_{\text{sophorolipid}} + FI_{\text{palmarosa oil}}$ , where  $FIC = MIC_{\text{combination}} / MIC_{\text{individual}}$ . FICI was classified as synergistic ( $\leq 0.5$ ), additive ( $>0.5$  to 1), indifferent ( $>1$  to  $<4$ ), and antagonistic ( $\geq 4$ ) (Chin *et al.* 1997).

### **Antioxidant activity of sophorolipids and palmarosa essential oil**

The antioxidant activity of the sophorolipids and palmarosa essential oil was determined by the DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), as described by Srikanth *et al* (2015). Tested concentrations of sophorolipids ranged from 2 to 6 mg.mL<sup>-1</sup>. Palmarosa essential oil ranged from 0.2 to 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>. The samples were prepared in methanol and combined with 0.3 mL of DPPH (0.1 nM) methanolic in triplicate. After incubation at room temperature, in the dark, for 30 minutes, the absorbance was read at 517 nm. Methanol was used as a negative control and ascorbic acid as a positive control. The inhibition rate (%) of the free radical was calculated according to the equation:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{((\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample}))}{\text{Absorbance control}} \times 100$$

### Development of cosmetic formulations

According to concentrations obtained in antibacterial and antioxidant tests, two cosmetics formulations of gel-cream were developed using sophorolipids and palmarosa essential oil, without and with phenoxyethanol and methylisothiazolinone (F1 and F2, respectively), according to the table 1. To prepare the cosmetics formulations, the sophorolipids were diluted in glycerin ( $75 \pm 2$  °C) and incorporated into the formulation under mechanical agitation for 5 minutes.

**Table 1** - Composition of gel-cream formulations.

Composition (% , w/v)	Formulations		
	BASE	F1	F2
Sodium acrylates copolymer (and) lecithin	3.00 g	3.00 g	3.00 g
Glycerin	5.00 g	5.00 g	5.00 g
Phenoxyethanol and methylisothiazolinone	-	-	0.50 g
Sophorolipids	-	0.40 g	0.40 g
Palmarosa essential oil	-	0.04 g	0.04 g
Distilled water	2.00 mL	91.56 mL	91.06 mL

BASE: sodium acrylates copolymer (and) lecithin and glycerin

### Characterization of cosmetic formulations

The stability analysis, organoleptic properties, physicochemical properties and water retention capacity (hydration) were carried out in 2 and 60 days (Mitsui, 1997). 100 grams of the formulations were placed in plastic containers and were exposed to different conditions including high temperature ( $37 \pm 2$  °C), low temperature ( $5 \pm 2$  °C), room temperature, exposure to light radiation (sun) and environment dark. Stability was achieved by centrifugation at 4.200 xg for 30 minutes at room temperature. The organoleptic assays were evaluated in triplicate as to appearance, color, odor, being analyzed macroscopically compared to the base standard sample (without sophorolipids). Density, pH and spreadability of each formulation were performed in triplicate. The water retention capacity performed by gravimetry according to Zhang *et al.* (2012) and Zhao *et al* (2013). For the accelerated stability test, samples were subjected to stress conditions to simplify the emergence of signs of instability. They were subjected to heating in an

oven at 45 ° C and cooling in refrigerators to 4 ° C in alternating cycles of 24 hours for 15 days.

### Antimicrobial and antioxidant activity of the formulations

Time-kill kinetics analysis of the formulations was evaluated according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1999). *S. aureus* and *S. epidermidis* were cultured on MH agar at 37°C for 24 hours. *P. acnes* was cultured on RCM (Reinforced Clostridial Medium) agar under anaerobic conditions using Gas-Pak (BD, Sparks, MD, USA) at 37°C for 72 hours. Bacteria at 10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> was incubated with 0.1g of the formulation I, formulation II and the control (BASE) for 30, 60 and 120 min at 37°C. Aliquots of 100 µL were collected, diluted (1:10) in saline and plated in MH agar plate in triplicate to determine the total colony-forming unit (CFU). The antioxidant activity of the formulations was determined by the DPPH method as described in item 2.4 and 2.5.

### Statistical analysis of the results

Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) was employed for mean comparison and performed using STATISTICA 13.5 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, USA)

## Results

### Antibacterial and antioxidant activity of sophorolipids and palmarosa essential oil

The MIC values of sophorolipid and palmarosa essential oil, as well as their combination results against *S. aureus* and *S. Epidermidis*, are presented in Table 2. The association of sophorolipids with palmarosa oil reduced the MIC to 98.4% in *S. aureus* and 50% in *S. epidermidis*, resulting in synergistic and additive interaction, respectively.

**Table 2** – Minimum inhibitory concentration and fractional inhibitory concentration of sophorolipids and palmarosa essential oil against *S. aureus* and *S. epidermidis*

Bacteria	Sophorolipid (µg.ml <sup>-1</sup> )			Palmarosa oil (µg.ml <sup>-1</sup> )			FICI	Interaction
	MIC	MIC <sub>c</sub>	FIC	MIC	MIC <sub>c</sub>	FIC		
<i>S.aureus</i>	31.25	0.48	0.015	5000	625	0.125	0.140	synergistic
<i>S.epidermidis</i>	125.0	62.5	0.5	5000	625	0.125	0.625	additive

MIC: minimum inhibitory concentration. MIC<sub>c</sub>: minimum inhibitory concentration in combination. FIC-fractional inhibitory concentration. FICI: fractional inhibitory concentration: index: ≤0.5, synergistic; >0.5 to 1, additive; >1 to <4, indifferent; and ≥4, antagonistic.

The antioxidant activities of sophorolipids and palmarosa essential oil are shown in Table 3. The results showed that sophorolipids were able to scavenge free radical molecules in a dose-dependent manner. The concentrations used (2 to 6 mg.ml<sup>-1</sup>) showed a low antioxidant potential. However, the interaction of sophorolipids with the palmarosa oil raised the levels of antioxidant activity, from 28.31% to 55.25%, showing an additive effect. Therefore, based on the antibacterial and antioxidant results, the chosen concentrations of sophorolipids was 4 mg.mL<sup>-1</sup> and 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> of palmarosa essential oil in both cosmetic formulations.

**Table 3** - Antioxidant activity of sophorolipids and essential oil of palmarosa.

Sophorolipids (mg.ml <sup>-1</sup> )	Palmarosa oil (mg.ml <sup>-1</sup> )	Antioxidant activity (%)
2.0	0.0	4.32±0.24
4.0	0.0	28.31±1.95
6.0	0.0	26.62±0.65
0.0	0.2	16.55±1.79
0.0	0.4	39.57±1.79
0.0	0.6	34.50±0.95
4.0	0.4	55.25±1.38*

\*Interaction effect

### Characterization of cosmetic formulations

Two topical formulations containing sophorolipids and palmarosa essential oil were prepared, and their physicochemical and functional stability under high temperature (37 ± 2 °C), low temperature (5 ± 2 °C), room temperature, exposure to light radiation (sun) and environment dark were evaluated. The results are showed in Table 4. Initially, the formulations presented pH values of 6.78, 6.64 and 6,73 for control, F1 (without chemical preservative) and F2 (with phenoxyethanol and methylisothiazolinone), respectively. After 60 days, in all conditions tested, pH values of F1 and F2 remained compatible with the pH values of skin range from 6.0. The spreadability, density and retention also remained stable under all conditions tested. All formulations remained physically stable upon centrifugation assay, showing no phase separation in the two storage conditions evaluated. Formulations were then subjected to stress conditions by heating in an oven at 45°C and cooling in refrigerators to 4 °C in alternating cycles of 24 hours for 15 days. The results are showed in Table 5. In the organoleptic tests, it was possible to observe the appearance of microorganisms in the base (control). In addition,

no visual and organoleptic differences between F1 and F2 were detected, with maintenance of color and odor of palmarosa oil. The pH values, spreadability and density of tested formulations also remained stable under all conditions tested (Table 5). Interestingly, no differences were observed between the F1 (without chemical preservatives) and F2 (with phenoxyethanol and methylisothiazolinone) suggesting the function of the sophorolipids and palmarosa essential oil as preservatives in all tested settings.

**Table 4** - General properties of cosmetic formulations after 60 days exposed in different conditions.

Formulations	Properties	Conditions				
		Radiation	Dark	37±2°C	5±2°C	Room temperature
Base	Density	0.99±0.0015	0.99±0.0008	0.99±0.0010	0.99±0.0020	0.99±0.0021
	pH	6.83±0.10	6.68±0.02	6.60±0.015	6.60±0.06	6.55±0.02
	Spreadability	660.7±31.4	572.3±20.4	530.7±33.1	615.4±21.3	452.2±23.1
	Retention	95.33 ± 1.27	95.20 ± 2.30	96.10±1.30	95.10±2.00	95.35±2.03
F1	Density	0.93±0.0010	0.99±0.0001	0.99±0,0020	1.00±0.0010	0,99±0.0010
	pH	6.73±0.23	6.73±0.015	6.33±0.038	6.64±0.106	6.59±0.095
	Spreadability	1589.6±34.0	1429.2±76.1	2122.6±34.9	1661.1±33.1	1661.1±34.9
	Retention	93.52±1.02	93.02±2.05	92.59±1.05	92.85±1.03	93.73± 2.06
F2	Density	0.99±0,0020	0.99±0.0010	0.99±0.0020	0.99±0.0010	0.99±0.0020
	pH	6.67±0,006	6.71±0,01	6.36±0,021	6.59±0,02	6.72±0.017
	Spreadability	2550.5±70.4	2205.9±74.3	2122.6±70.4	1661.1±36.7	1808.6±84.7
	Retention	92.38±2,03	93.02±0,95	92.60±1,30	91.50±1,23	92.41±1,12

Density (g.cm<sup>-3</sup>), spreadability (mm<sup>2</sup>), retention (%). Data represents mean ± SD (n = 3).

**Table 5** - Characterization of formulations under stress conditions.

Formulations	Properties	Conditions	
		Initial (0 days)	Final (15 days)
Base	Appearance	Normal, characteristic odor and color	Modified, presence of microorganisms and yellow color
	pH	6.78±0.01	6.75±0.02

	Spreadability	661.8±77.5	694.2±16.7
	Density	1.01±0,012	0.99±0.001
F1	Appearance	Normal, characteristic odor and color	Normal, characteristic odor and color
	pH	6.64±0.04	6.71±0.06
	Spreadability	1075.2±58.1	770.9±26.7
	Density	1.00±0.007	0.99±0,000
F2	Appearance	Normal, characteristic odor and color	Normal, characteristic odor and color
	pH	6.70,02	6.70±0.02
	Spreadability	1116.0±99.3	962.1±55.0
	Density	1.00±0,002	0.99±0,001

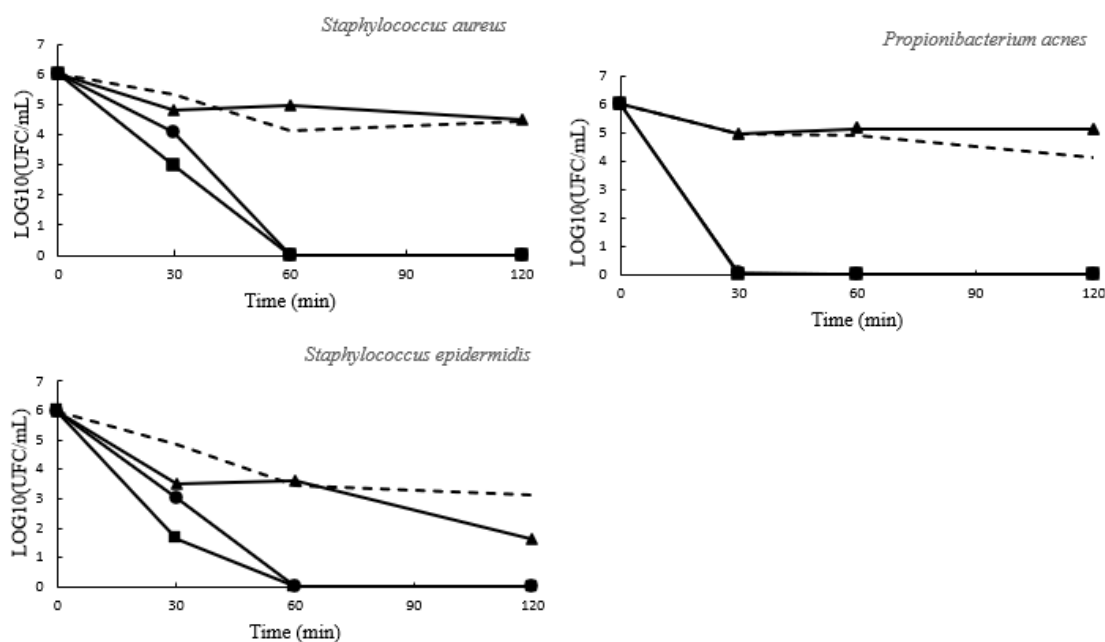
---

Spreadability (mm<sup>2</sup>), Density (g/cm<sup>3</sup>). Data represents mean ± SD (n = 3).

### Antimicrobial and antioxidant activity of formulations

The results obtained demonstrated that the two cosmetic formulations containing sophorolipids and palmarosa essential oil presented great antibacterial activity against acne-causing microorganisms (Fig. 1). The total loss of cell viability of *S. aureus* and *S. epidermidis* was observed after 1 hour of incubation, while for *P. acnes* this same effect was observed after 30 minutes of incubation for both tested formulations. The F2 formulation (with phenoxyethanol and methylisothiazolinone) was more effective in reduce the cell viability of *S. aureus* and *S. epidermidis* when compared to F1 (without preservative). However, the effect of F1 and F2 on *P. acnes* viability were considered equal. Regarding antioxidant activity, the base formulation, F1 and F2 showed 5.02%, 35.06% and 21.58% respectively, maintaining the similar results after 60 days. Taking into account all results, F1 formulation which has no chemical preservatives, presented consisted performance when compared to the F2 formulation, showing great stability and effective antibacterial activity against acne-causing microorganisms and exhibit antioxidant activity.

**Figure 1** - Growth inhibition of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes* in cosmetic formulations.



CTRL control, Base without actives (▲), F1 with actives and without preservative (●) and F2 with actives and with preservative (phenoxyethanol and methylisothiazolinone) (■).

## Discussion

The search for sustainable, ecofriendly and multifunctional ingredients are of great importance for the cosmetic and medical industry. Several studies have reported the antimicrobial activity of sophorolipids against a wide range of clinical importance microorganisms (Elshikh *et al.* 2017; Solaiman, *et al.* 2017; Naughon *et al.* 2019; Silveira *et al.* 2020, Fontoura *et al.* 2020). But, the association of sophorolipids with essential oils have been never been described.

In this study, the susceptibility of acne-causing microorganisms to sophorolipids, individually and in combination with palmarosa essential oil, was evaluated. The results showed that sophorolipids presented antimicrobial activity against *S. aureus* and *S. epidermidis*. Likewise, other studies tested the antibacterial activity of sophorolipids against *S. aureus* and a varying of MIC values were described (Joshi-Navare and Prabhune 2013, Diaz de Rienzo *et al.* 2016, Hoa *et al.* 2017, Silveira *et al.* 2020, Fontoura *et al.* 2020). Silveira and co-workers (2020) showed the sophorolipids induced loss of *S. aureus* viability with a MIC of 31.25 µg/mL, while Joshi-Navare and Prabhune (2013) showed the sophorolipid present MIC of against *S. aureus* in 400 µg/mL. This difference

could be explained by variety of chemical constituents of sophorolipids. Lactonic forms have been described as having better bactericidal action than acidic forms (Van Bogaert *et al.* 2007). In this study, the sophorolipid from *S. bombicola* was characterized predominantly as lactonic form which can explain the lower MIC values against *S. aureus* and *S. epidermidis*. The antibacterial of sophorolipids against *P. acnes*, with lower MIC values have also already been described (Kim *et al.* 2002; Cho *et al.* 2008).

The amphiphilic nature of sophorolipids seems to be related to their antibacterial activity, which involves synergistic interactions between the sugar and the lipid moieties, leading to destabilization and rupture of pathogen membrane and cell lysis (Kim *et al.* 2002; Valotteau *et al.* 2017). Recently, our researcher group studied the antimicrobial effects of sophorolipids by scanning electron microscopy and showed structural alterations and a reduction in numbers of cell. The production of extracellular matrix compounds was also described, and considered a pathogen protection against antimicrobial substances. These results were comparable to those found by others studies described in the literature (Dengle-Pulate *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2016; Solaiman *et al.* 2017).

In addition to their antimicrobial effects, sophorolipids in combination with other compounds has also been reported (Joshi-Navare and Prabhune 2013; Dubey, Selvaraj and Prabhune 2013). The association of sophorolipids and lactic acid resulted in an additive interaction, reducing the concentration of the active compounds needed for effectiveness against *S. aureus* and *Listeria monocytogenes*, to 50% and 75%, respectively. In this present study, the association of sophorolipids with palmarosa oil resulting in synergistic and additive interaction, for *S. aureus* and *S. epidermidis*, respectively. This combination results in the expressive reduction of MIC to 98,4% in *S. aureus* and 50% in *S. epidermidis*, providing a significant impact for practical applications.

Antimicrobial activity of palmarosa essential oil has also been studied. Scherer *et al.* (2009) observed MIC values from 400 to 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for *S. aureus* and *E.coli*. In this study, a MIC value of 5000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  was found for both *S. aureus* and *S. epidermidis*, but this value considered decreased to 625  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  when the palmarosa oil was combine to sophorolipids. The antimicrobial of palmarosa essential oil also seems to be related to the lipid structural similarity with the plasma membrane of bacteria, causing passive entry into the membranes, accumulation and inhibition of cell growth and ruptures and leakage of the content bacteria cytoplasm leading to cell death (Chen and Viljoen 2010; Silveira



*et al.* 2018).

The antioxidant activity of sophorolipids was also reported (Hillion *et al.* 1998; Hoa *et al.* 2017). In our studies, concentrations of 2 to 6 mg/mL of sophorolipid, showed a low antioxidant potential. However, the interaction with the oil of palmarosa raised the levels of antioxidant activity, from 28.31% to 55.25%, showing an additive effect. This antioxidant action can contribute to delay skin aging, considering that free radicals are strongly associated with this process (Ni *et al.* 2018).

Stability and microbiological purity are crucial factors for cosmetics. Chemical preservatives are widely used as they inhibit the growth of microorganisms, adding stability to the cosmetics formulation (Wong *et al.* 2000). However, health requirements set limits on the maximum acceptable concentration of synthetic preservatives and force manufacturers to employ alternative preservation methods (EU Cosmetics Directive 1976). In this research, the cosmetic formulations containing sophorolipids and palmarosa essential oil presented great antibacterial activity against acne-causing microorganisms. Interestingly, the F1 formulation which has no chemical preservatives presented consisted performance when compared to the F2 formulation (with phenoxyethanol and methylisothiazolinone), presenting great stability and effective antibacterial activity against acne-causing microorganisms and exhibit antioxidant activity. Regardless the cytotoxic effect of sophorolipid, several studies reported the lower toxicity of sophorolipid in noncancerous cell lines, obtaining a higher loss of viability for the cancer cells, indicating the selective cytotoxicity of sophorolipids (Dubey *et al.* 2016; and Li *et al.* 2017). Recently, our group showed that sophorolipids reduced the cell viability of human red blood cells by 50% in concentrations higher than  $485.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Furthermore, the cytotoxicity of sophorolipids was tested in HepG2 cells, and the CC50 value was  $62.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , significantly lower than the concentration found for human red blood cells (Silveira *et al.* 2020).

Taken together the results of this study indicate the great potential of a multifunctional and self-preserving cosmetic formulation using sophorolipids and palmarosa essential oil to combat acne-causing microorganisms. To our knowledge, this is the first study reporting the antimicrobial action of sophorolipid in combination with palmarosa essential oil to treat acne vulgaris and other skin infections.

### **Acknowledgement**

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel

(CAPES - Brazil) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their support.

### **Conflict of interest:**

No conflict of interest declared.

### **References**

- Adler B.L., Kornmehl H., Armstrong A.W. (2017) Antibiotic resistance in acne treatment. *Jama Dermatol* **153**, 810–811.
- Chen, W., Viljoen, A.M. (2010) Geraniol — a review of a commercially important fragrance material. *S Afr J Botany* **76**, 643–51.
- Cho, W. G., Park, H.S., AHN, J.B. (2008) Antimicrobial activities of sophorolipids and its application for cosmetics. *J Soc Cosmet Scientists Korea* **34**, 317-323.
- Dengle-pulate, V., Chandorkar, P., Bhagwat, S., Prabhune, A. (2013) Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol. *J Surfactants Deterg* **17**, 543–552.
- Diaz de Rienzo, M.A., Stevenson, P.S., Marchant, R., Banat, I.M. (2016) Antibacterial properties of biosurfactants against selected gram positive and negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **363**, fmv224.
- Dikicier, S. B. (2019) Topical treatment of acne vulgaris: efficiency, side effects, and adherence rate. *Int J Med Res* **47**, 2987–2992.
- Dubey, P., Selvaraj, K, Prabhune, A. (2013) Sophorolipids: in self-assembly and nanomaterial synthesis. *World J Pharm Pharm Sci* **2**, 1107–1133.
- Dubey, P., Raina, P., Prabhune, A., Kaul-Ghanekar, R. (2016) Cetyl alcohol and oleic acid sophorolipids exhibit anticancer activity. *Int J Pharm Pharm Sci* **8**, 399–402.
- Elshikh, M., Moya-Ramirez, I, Moens, H., Roelants, S., Soetaert, W., Marchant, R., Banat, I.M. (2017) Rhamnolipids and lactonic sophorolipids: natural antimicrobial surfactants for oral hygiene. *J Appl Microbiol* **123**,1111–1123.
- European union cosmetics directive 76/768/eec (1976) *Council directive of 27 july 1976 on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products*. Brussels, Belgium: European commission.
- Fontoura, I.C.C.; Saikawa, G.I.A., Silveira, V.A. I; Pan, N.C.; Amador, I.R.; Baldo, C.; Rocha, S.P.D.; Celligoi, M.A.P.C. (2020) Antibacterial activity of sophorolipids from *candida bombicola* against human pathogens. *Braz Arch Biol Technol* **63**, e20180568.
- Fox, L., Csongradi, C., Aucamp, M., Du Plessis, J., Gerber, M. (2016) Treatment

modalities for acne. *Molecules* **21**, 1063.

Habeshian, K. A., Cohen, B. A. (2020). Current issues in the treatment of acne vulgaris. *Pediatrics* **145**, 225–230.

Halla, N., Fernandes, I.P., Heleno, S.A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A.E., Ferreira, I.C.F.R., Barreiro, M.F. (2018) Cosmetics preservation: a review on present strategies. *Molecules* **23**, 1571.

Herman, A., Herman, A.P. (2015) Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *J Pharm and Pharmacol* **67**, 473–485.

Hillion, G., Marchal, R., Stoltz, C., Borzeix, C.F. (1998) Use of a sophorolipid to provide free radical formation inhibiting activity or elastase inhibiting activity. **U.s. patent** 5756471, may 26.

Hoang, N.L.H., Loan, L.Q., Sang, V.T. (2017) Production and characterization of sophorolipids by *Candida Bombicola* using catfish fat. *Int J Nat Sci Technol* **14**, 152-159.

Joshi-Navare, K., Prabhune, A. (2013) A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. *Biomed Res Int* **2013**, 1-8.

Kim, K., Yoo, D., Kim, Y., Lee, B., Shin, D., Kim, E.-K. (2002) Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent. *J. Microbiol. Biotechnol* **12**, 235–241.

Li, H., Guo, W., Ma, X., Li, j., Song, X. (2017) *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of sophorolipids to human cervical cancer. *Appl Biochem Biotechnol* **181**, 1372–1387.

Lodhia, M.H., Bhatt, K.R., Thaker, V.S. (2009) Antibacterial activity of essential oils of palmarosa, evening primrose, lavender and tuberose. *Indian J Pharm Sci* **71**, 134-136.

Lourith, N., Kanlayavattanukul, M. (2009) Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *Int J Cosmet Sci* **31**, 255–261.

Morone, J., Lopes, G., Preto, M., Vasconcelos, V., Martins, R. (2020) Exploitation of filamentous and picoplanktonic cyanobacteria for cosmetic applications: potential to improve skin structure and preserve dermal matrix components. *Mar. Drugs* **18**, 486.

Mitsui, T. (1997, New cosmetic science. 1 ed. Elsevier, Yokohama, Japan.

Naughton, P.J., Marchant, R., Naughton, V., Banat I.M. (2019) Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *J Appl Microbiol* **127**, 12–28.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, & Barry, A. L. (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline* **19** Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Ni, S., Han, F., Wang, W., Han, D., Bao, Y., Han, D., Wang, H. Niu, L. (2018) Innovations upon antioxidant capacity evaluation for cosmetics: a photoelectrochemical

sensor exploitation based on n-doped graphene/ti o<sub>2</sub> nanocomposite. *Sens Actuators B Chem* **259**, 963–971.

Rihayat, T., Hasanah, U., Parlaungan, J., Jaafar, J., Cionita, T. (2020) Geraniol quality improvement on citronella oil as raw material for making anti-bacterial perfumes. *Mater Sci Eng* **788**, 1757-8981.

Scherer, R., Wagner, R., Duarte, M.C.T., Godoy, H.T. (2009) Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. Bras. Pl. Med* **11**, 442-449.

Silveira, V.A.I, Freitas, C.A.U.Q., Pedrine, M.A.C. (2018) Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida Bombicola*: a promising alternative to conventional drugs. *J App Biol Biotech* **6**, 87-90.

Silveira, V.A.I., Nishio, E.K., Freitas, C.A.U.Q, Amador, I.R., Kobayashi, R.K.T., Caretta, T., Macedo, F., Celligoi, M.A.P.C. (2019) Production and antimicrobial activity of sophorolipid against clostridium perfringens and campylobacter jejuni and their additive interaction with lactic acid. *Biocatal Agric Biotechnol* **21**, 101287.

Silveira, V.A.I., Marin, B.M., Hipolito, A., Gonçalves, M.C., Mali, S., Kobayashi, R.K.T., Celligoi, M.A.P.C. (2020) Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens. *Food Packing Shelf Life* **26**, 100591.

Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Uknalis, J. (2017) Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate- format assay. *J Microbiol Methods* **136**, 21–29.

Srikanth, R., Siddartha, G., Sundhar Reddy, C.H., Harish, B. S., Janaki Ramaiah, M., Uppuluri, K.B. (2015) Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydr Polym* **123**, 8-16.

Traub, W.H., Kleber, I. (1975) In vitro additive effect of polymyxin b and rifampin against serratia marcescens. *Antimicrob. Agents Chemother* **7**, 874–876.

Valotteau, C., Banat, I.M., Mitchell, C.A., Lydon, H., Marchant, R., Babonneau, F., Pradier, C.M., Baccile, N., Humblot, V. (2017) Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against gram positive and gram-negative pathogens. *Colloids Surf B* **157**, 325–334.

Van Bogaert, I.N., Saerens, K., De Muynck, C, Develter, D., Soetaert, W., Vandamme, E.J. (2007) Microbial production and application of sophorolipids. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 23–34.

Van Bogaert, I.N, Zhang, J., Soetaert, W.B. (2011) Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochem* **46**, 821–833.

Vecino, X, Cruz, J. M, Moldes, A. B, Rodrigues, L. R. (2017) Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. *Crit Rev in Biotechnol*, **37**, 911-923.

Walsh, T.R., Efthimiou J., Dréno, B. (2016) Systematic review of antibiotic resistance in acne: an increasing topical and oral threat. *Lancet Infect Dis* **16**, 23–33.

Wong, S., Street, D., Delgado, S.I., Klontz, K. C. (200) Recalls of foods and cosmetics due to microbial contamination reported to the U.S. food and drug administration. *J Food Prot* **63**, 1113–1116.

Zhang, Z., Wang, X., Han, Z., Zhao, M., Yin, L. (2012) Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya. *Carbohydr Polym* **87**, 2332–2337.

Zhao, L., Fan, F., Wang, P., Jiang, X. (2013) Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. *Appl Microbiol Biotchnol* **97**, p.2841–2850.

Zhang, X, Ashby R., Solaiman, D., Uknalis, J., Fan, X. (2016) Inactivation of *salmonella spp.* And *listeria spp.* By palmitic, stearic, and oleic acid sophorolipids and thiamine dilauryl sulfate. *Front Microbiol* **7**, 2076.

## 5.4 ARTIGO 2

**Bioactive films based on pullulan, starch and sophorolipid for the control of skin pathogens****Será submetido para a revista INTERNATIONAL JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE**

Giovanna Amaral Filipe <sup>1</sup>, Victoria Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>, Cristiani Baldo<sup>1</sup>, Marcelly Chue Gonçalves<sup>2</sup>, Suzana Mali <sup>1</sup>, Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>2</sup>, Maria Antonia P. Colabone Celligoi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, <sup>2</sup>Departamento de Microbiologia

\*Autor correspondente. Tel.: +55 43 33714270 E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br)

**Abstract**

Cutaneous infections involve microbial invasion of pathogens into the skin layers and can lead to mild cases and severe life-threatening conditions. The cosmetic industry searches for new biopolymer films based on safe and natural products with high antimicrobial properties to prevent and treat skin. The treatment of cutaneous infections can be carried out alternatively using biopolymeric films, providing prevention and cure to the patient and simultaneously, meeting a consumer demand for new biological-based products obtained from renewable sources. This study aiming to produce and characterize biodegradable films based on pullulan starch and sophorolipids for the control of skin pathogens, with and without the presence of citric acid as a crosslinking agent. Sophorolipids added to the films as an antimicrobial agent were produced by *Starmerella bombicola* in a fermentation process. The films were obtained by the casting method and eight formulations were prepared with different concentrations of sophorolipids (0, 2.5, 5.0 and 10.0%), with and without citric acid. The addition of sophorolipids resulted in an opaquer surface, forming homogeneous structures observed by scanning electron microscopy. The films with the addition of citric acid showed greater flexibility and lower solubility. The films containing sophorolipids were able to inhibit 100% of the growth of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. These findings lead to the possibility of developing a new, sustainable, and natural antimicrobial sophorolipid-added films to treat bacterial skin infections that has extensive applicability in the cosmetic industry.

**Keywords:** sophorolipids, antimicrobials, films, pullulan, citric acid

**1. Introduction**

The development of skin infections involves a violation of the skin barrier,

causing wounds and subsequent contamination by microorganisms, mainly *Staphylococcus* and *Streptococcus* species. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are responsible for causing a variety of diseases including acne, boils, pustules, folliculitis, endocarditis, among others (Ramakrishnan *et al.* 2015; Inrahim *et al.* 2015). Pathogenic microorganisms have virulent properties which induce host tissue degradation, including release of lipases, lyases and other factors (Cong *et al.* 2019). Untreated bacterial skin infections can cause systemic disease including sepsis, endocarditis, and bone and joint infections (Alexander *et al.* 2020).

Biofilms containing antimicrobial actives could be used to treat skin infections. The ideal film for wounds and skin lesions should be non-toxic, non-adherent, non-allergenic, provide a moist environment and be easily removed without trauma (Voss *et al.* 2020). Then, the industry searches for new biopolymer films based on safe and natural products with high antimicrobial properties to prevent and treat skin infections (Bouchelaghem *et al.* 2022; Ismail *et al.* 2022).

Pullulan is a biodegradable polymer from a renewable source, which can be used to produce colorless, odorless and non-toxic films. Pullulan is a fungal biopolymer consisting of repeating maltotriose units linked by an  $\alpha$  (1-4) glycosidic bond. Despite its advantages, the high cost of pullulan has limited its industrial application, and the search for mixtures with other polysaccharides offers economic advantages (Pattanayaiying; Kittikun; Cutter, 2015; Roy *et al.* 2022; Tang *et al.* 2022). In this context, the utilization of starch, pullulan and bacterial cellulose for the production of biodegradable films allowed the use of a smaller amount of pullulan in the preparation of the polymer matrix, resulting in homogeneous structures with better mechanical properties than pure pullulan films (Sueiro *et al.* 2016).

Although, films produced exclusively with biopolymers such as starch or pullulan may have low flexibility and low storage resistance at high relative humidity (Sueiro *et al.* 2016). Thus, some additives can be used in the manufacture of films, including some crosslinking agents, capable of reinforcing the structure of polysaccharides through the reaction with the free hydroxyls of these polysaccharides. Citric acid, an organic acid from a renewable source, which has low toxicity and low cost, has been widely used for this purpose (Seligra *et al.* 2016; Simões *et al.* 2020).

Additionally, the incorporation of multifunctional bioactive molecules to biofilms could expand their application in pharmaceutical and cosmetic industry, including treatments for skin diseases and other diseases. Sophorolipids are biosurfactants of the

glycolipid class, produced mainly by the non-pathogenic yeast *Starmerella bombicola*, being composed of a sophorose disaccharide linked to a hydroxylated fatty acid. These molecules are recognized for being biocompatible and of low cytotoxicity, and have been explored in the food area due to their antimicrobial activity against various microorganisms (Fontoura *et al.* 2020; Hipólito *et al.* 2020; Silveira *et al.* 2020; Caretta *et al.* 2021).

There is a growing interest in the application of sophorolipids and other biosurfactants as antimicrobial agents in the pharmaceutical area, since they are capable of breaking the integrity of the bacterial membrane, leading to cell lysis and rupture of protein structures. In addition, sophorolipids interferes with the formation of bacterial membranes, microbial biofilms, modulating microbial interaction with interfaces due to changes in surface tension and bacterial cell wall charge (Ceresa *et al.* 2021).

Therefore, the aim of this work was to produce and characterize biodegradable films based on pullulan, cassava starch and sophorolipids, with and without the addition of citric acid as a crosslinking agent, and to evaluate the antimicrobial activity against the skin pathogens *S. aureus* and *S. epidermidis*. The use of sophorolipids incorporated in films based on pullulan and cassava starch with antimicrobial action against skin pathogens has not yet been described in the literature.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Microorganisms and materials**

*Starmerella bombicola* ATCC 22214 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) and used for the production of sophorolipids. The microorganisms *S. aureus* ATCC 25923, and *S. epidermidis* ATCC 1222 were provided by the Laboratory of Basic and Applied Bacteriology of the State University of Londrina. The pullulan (molar mass = 200,000 Da) used was produced by Hayashibara (Okayama – Japan) and provided by Ingredion Brasil LTDA (Mogi-Guaçu – SP), the glycerol was obtained from Synth (São Paulo – SP) and cassava starch (Yoki, Paranaíba, Brazil) was purchased from a local market in Londrina-PR.

### **2.2. Sophorolipid production**

Sophorolipid was produced by fermentation with *S. bombicola* (ATCC® 22,214™) in a bioreactor using glucose (Ladsynth, São Paulo, Brazil) and oleic acid (Ladsynth, São Paulo, Brazil) as substrates, based on the conditions described by Silveira



et al. 2019. Sophorolipid recovery was performed by solvent extraction, according to the protocol described by Fontoura *et al.* (2020). Analysis of the sophorolipids samples by HPLC showed that the sophorolipids produced in comparison to the standard were mainly lactone C18:1 diacetylated.

### 2.3. Preparation of pullulan, starch and sophorolipid films

The filmogenic solutions were produced by casting according to Sueiro *et al.* (2016). Eight formulations were prepared with different proportions of sophorolipids (0, 2.5, 5.0 and 10.0%) with and without citric acid, according to Table 1. The solutions were prepared under heating and stirring for 20 min under temperature of 90 °C until complete homogenization. Then, 40 g of the prepared formulations were poured onto acrylic plates (13.5 cm diameter) and then allowed to dry for 24 hours at 30 °C with circulation and air renewal (Marconi, São Paulo, Brasil). The dried films were stored at 58% relative humidity, containing saturated sodium bromide solution, at 25 °C until use.

**Table 1** - Formulations of biodegradable films produced for the preparation of 400 mL of filmogenic solutions.

Formulations	Starch (g)	Pullulan (g)	Sophorolipid (g)	Glycerol (g)	Citric acid (g)	Water (mL)
AP	6	6	-	2.40	-	385.60
AP-SL2.5	6	6	0.15	2.40	-	385.45
AP-SL5.0	6	6	0.30	2.40	-	385.30
AP-SL10.0	6	6	0.60	2.40	-	385.00
APr	6	6	-	2.40	0.36	385.24
APr-SL2.5	6	6	0.15	2.40	0.36	385.09
APr-SL5.0	6	6	0.30	2.40	0.36	384.94
APr-SL10.0	6	6	0.60	2.40	0.36	384.64

### 2.4. Film characterization and antimicrobial activity

#### 2.4.1 Thickness

A Mitutoyo manual micrometer (São Paulo, Brazil) was used to determine the thickness of the films at 5 different positions. The mean standard deviation within the film was approximately 5% of the average thickness.

#### 2.4.2 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM analyses were conducted utilizing a JEOL JSPM 100 electron microscope (Japan) at an accelerating voltage of 20 kV. Film samples were mounted on bronze stubs using double-sided tape and then coated with a layer of gold (40-50 nm), allowing surface visualization.

### 2.4.3. Solubility

Samples (2 cm x 2 cm) were dried in an oven with circulation and air renewal at 60 °C for 24 h and weighed (initial weight on a dry basis). They were then immersed in 250 mL erlenmeyers containing 80 mL of distilled water, closed and slowly stirred for 24 h at 25 °C in an orbital incubator (brand/model). After this period, the samples were removed and dried in an oven with circulation and air renewal (60 °C for 24 h) to determine the mass of material that was not solubilized (final weight). The solubility was expressed as the percentage of dry material solubilized. Analyzes were performed in triplicate.

### 2.4.4 Water vapor permeability (WVP)

WVP tests were performed according to the ASTM E96-95 method (ASTM, 2016). Specimens of each sample were fixed in the circular opening (diameter of 60 mm) of the permeability capsule, using silicone grease, to ensure that the moisture migration occurred exclusively through the coating. The tests were carried out in the gradient ( $\Delta$ ) of relative humidity (RH): ( $\Delta = 0-75\%$  RH) - with the permeability capsule filled with anhydrous calcium chloride (0% RH) and the desiccator containing a saturated solution of chloride of sodium (75% RH). The capsules were weighed after 4 h of system stabilization, with subsequent weighing every 1 h for a total period of 24 h. The mass gain of each capsule was plotted as a function of time, and the water vapor permeability rate (TPerMA) calculated as the slope of the line obtained. Permeability was calculated according to equation (1):

$$\text{PermA} = [(\text{TPerMA} * e) / ((\text{Ps} * (\text{URd} - \text{URc})/100))] \text{ (Equation 1),}$$

where PermA is the water vapor permeability ( $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ), TPerMA is the water vapor permeability rate ( $\text{g/m}^2\text{s}$ ), and  $e$  is the film thickness, Ps is the saturation pressure of water vapor at 25 °C, URd and URc are the relative humidities in the desiccator and in the capsule, respectively. Analyzes were performed in triplicate.

#### 2.4.5. Mechanical properties

The parameters tensile strength (MPa) and elongation (%) were determined using an Instron 1141 (Instron Ltd., Canton – USA), according to ASTM D-882-91 (ASTM, 2002). Five sample strips (25 × 100 mm) of each formulation were clamped between pneumatic grips. The force (N) and deformation (mm) were recorded during extension at 50 mm min<sup>-1</sup> with an initial distance between the grips of 50 mm.

#### 2.4.6. Fourier transformed infrared (FT-IR)

Samples were dried in an oven with air circulation (Marconi model, Brazil) at 40 °C for 12 h. Then they were sprayed and kept in a desiccator containing CaCl<sub>2</sub> for 7 d. After this period, the samples were added with KBr (potassium bromide) and subjected to high pressure for the production of pellets. The FT-IR spectra were performed in an infrared spectrophotometer with a Fourier transformer (FT-IR) Shimadzu IR Prestige – 21 (Japan). Analyzes were performed in the mid-infrared region with Fourier transform covering the spectral range from 4000 to 400 cm<sup>-1</sup>, with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and 100 scans of each sample.

#### 2.4.7. Antimicrobial activity of films

Time-kill kinetics analysis of the formulations was evaluated according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1999). *S. aureus* and *S. epidermidis* were cultured on MH agar at 37 °C for 24 h. Then, films were cut into discs using a hole puncher, and both sides were sterilized using UV light for 15 min. 10 µL of the bacterial suspensions (10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>) were added to the disc and allowed to dry naturally on the surface of the films, for 30 and 60 min. Then, the discs were placed in microtubes with 1 mL of MH broth, shaken for 1 min, followed by serial dilution with saline and cultured in triplicate on an MH agar plate. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, and colony forming units (CFU) were counted. The test was performed in triplicate, and AP and APr films served as a control

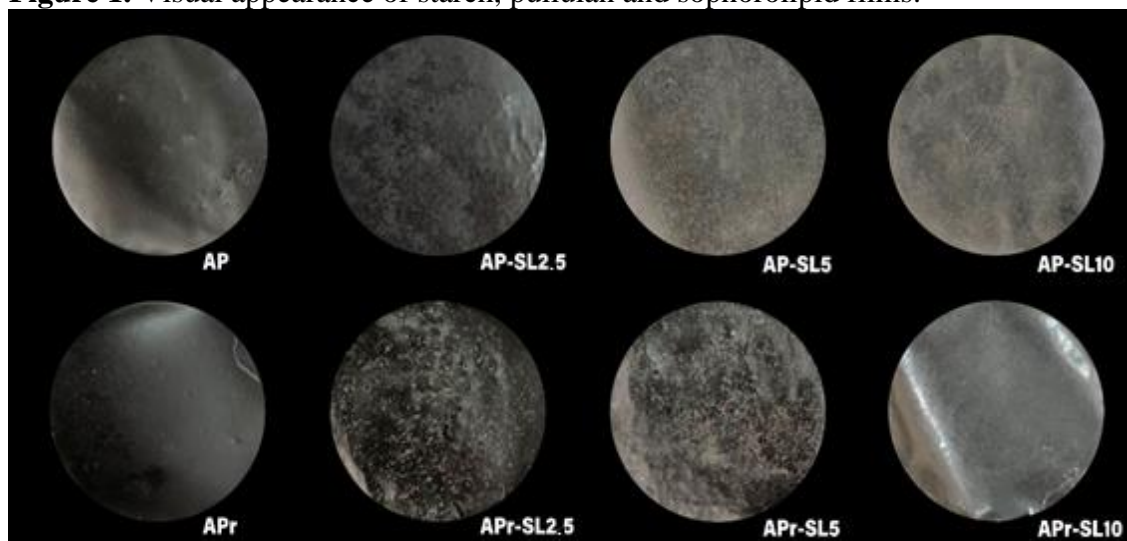
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Thickness and scanning electron microscopy (SEM)

Films containing pullulan, starch and sophorolipids are shown in Figure 1. All

formulations formed whole films, without bubbles or cracks, easily removable from the plates, indicating that the chosen concentration of solids was adequate. The addition of sophorolipids resulted in an increase of films opacity (Figure 1). The films surfaces containing sophorolipids and citric acid were rougher, but no agglomeration on samples surface was observed, demonstrating a good interaction of the sophorolipids with the starch and pullulan matrix.

**Figure 1.** Visual appearance of starch, pullulan and sophorolipid films.



AP: starch and pullulan. AP-SL2.5: starch, pullulan and 2.5% of sophorolipids. AP-SL5.0: starch, pullulan and 5% of sophorolipids. AP-SL10.0: starch, pullulan and 10% of sophorolipids. APr: starch, pullulan, reticulated with citric acid. APr-SL2.5: starch, pullulan, citric acid and 2,5% of sophorolipids. APr-SL5.0: starch, pullulan, citric acid and 5% of sophorolipids. APr-SL10.0: starch, pullulan, citric acid and 10% of sophorolipids.

The thickness of the films ranged from 203 to 248  $\mu\text{m}$  (Table 2). Considering that the thickness is directly proportional to the concentration of solids in the formulation, the thickest films were obtained with the highest concentration of sophorolipids with the addition of the crosslinking agent (Table 2).

**Table 2** - Results of thickness, solubility, water vapor permeability (WVP) and mechanical properties of the films produced.

Formulations	Thickness ( $\mu\text{m}$ )	Solubility em 24 h (%)	WVP x $10^{11}$ ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$ $\text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ )	RMT (MPa)	Stretching (%)
AP	$220 \pm 3^{\text{bcd}}$	$69 \pm 5^{\text{bc}}$	$6.55 \pm 0.01^{\text{c}}$	$6.45 \pm 1.95^{\text{b}}$	$5.2 \pm 1.6^{\text{d}}$
AP-SL2.5	$209 \pm 7^{\text{cd}}$	$80 \pm 6^{\text{b}}$	$9.06 \pm 2.10^{\text{a}}$	$9.37 \pm 1.34^{\text{a}}$	$4.3 \pm 1.4^{\text{d}}$
AP-SL5.0	$203 \pm 9^{\text{d}}$	$96 \pm 6^{\text{a}}$	$5.95 \pm 0.03^{\text{d}}$	$6.37 \pm 0.84^{\text{b}}$	$12.7 \pm 4.9^{\text{cd}}$

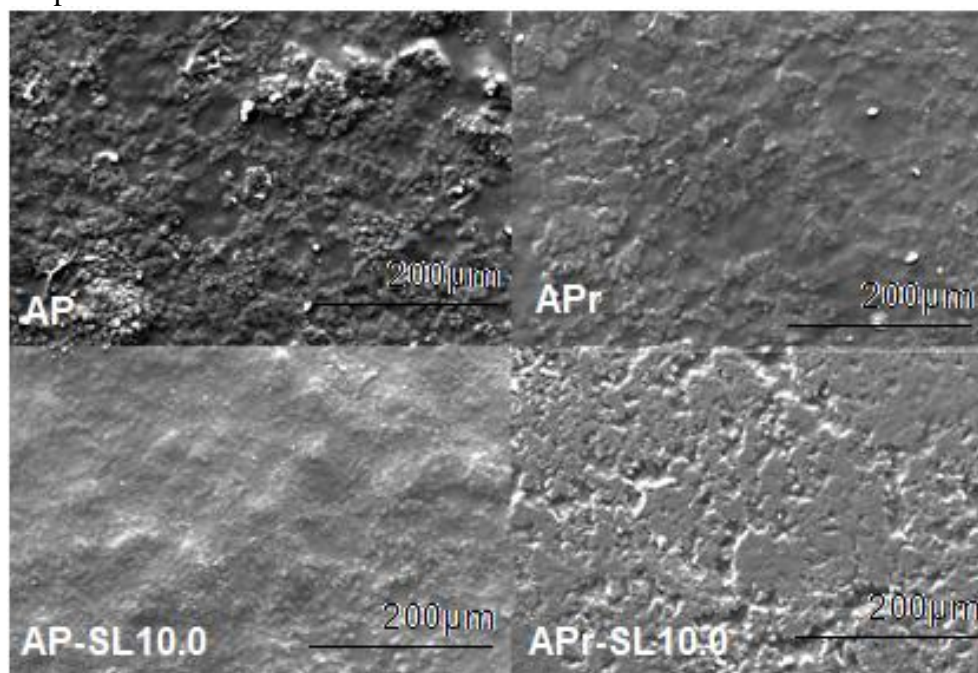
AP-SL10.0	245 ± 11 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	7.14±0.06 <sup>b</sup>	6.84±1.32 <sup>b</sup>	2.4±0.7 <sup>d</sup>
APr	216 ± 11 <sup>bcd</sup>	64 ± 8 <sup>c</sup>	4.25±0.01 <sup>b</sup>	2.68±0.50 <sup>c</sup>	19.9±1.6 <sup>c</sup>
APr-SL2.5	226 ± 15 <sup>abc</sup>	61 ± 2 <sup>c</sup>	3.11±0.23 <sup>e</sup>	1.91±0.48 <sup>c</sup>	95.8±33.9 <sup>a</sup>
APr-SL5.0	238 ± 16 <sup>ab</sup>	63 ± 6 <sup>c</sup>	4.14±0.16 <sup>b</sup>	2.41±0.53 <sup>c</sup>	24.6±7.7 <sup>b</sup>
APr-SL10.0	248 ± 11 <sup>a</sup>	61 ± 5 <sup>c</sup>	2.55±0.02 <sup>f</sup>	1.48±0.14 <sup>c</sup>	86.7±2.3 <sup>a</sup>

Results are expressed as mean ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Tukey's test. AP: starch, pullulan. AP-SL2.5: starch, pullulan e 2,5% of sophorolipids. AP-SL5.0: starch, pullulan and 5% of sophorolipids. AP-SL10.0: starch, pullulan and 10% of sophorolipids. APr: starch, pullulan, reticulated with citric acid. APr-SL2.5: starch, pullulan, citric acid and 2,5% of sophorolipids. AP-SL5.0: starch, pullulan, citric acid and 5% of sophorolipids. APr-SL10.0: starch, pullulan, citric acid and 10% of sophorolipids.

The surfaces of the produced films were analyzed using SEM (Figure 2). The results revealed a rougher structure on the surface of the films obtained from the AP and APr formulations. However, the addition of citric acid did not affect the roughness of the samples. Reddy and Yang (2010) also did not observe differences in the surface of the starch films crosslinked with citric acid observed by SEM, suggesting that its incorporation does not interfere in the morphology of the films.

The films with the addition of sophorolipids in the maximum concentration of 10% (AP-SL10.0 and APr-SL10.0) were homogeneous, without phase separation, as observed in the SEM images (Figure 2). On the contrary, Ashby *et al.* (2011) observed that the addition of sophorolipids in PHB film matrices resulted in an increase in the roughness and porosity of the films. Silveira *et al.* (2020) also found less homogeneous polymer matrices in polylactic acid (PLA) films with the addition of sophorolipids, and attributed this effect to the slow and inhomogeneous evaporation of the solvent, which led to the agglomeration of the added sophorolipids.

**Figure 2** - SEM micrographs of films based on pullulan starch with the addition of sophorolipids.



AP: pullulan, starch. APr: pullulan, starch, citric acid. AP-SL10.0: starch, pullulan and 10% sophorolipids. APr-SL10.0: starch, pullulan, citric acid and 10% sophorolipids.

### 3.2. Solubility and water vapor permeability (WVP)

The solubility and water vapor permeability results of the films are shown in Table 2. The addition of sophorolipids increased the solubility of the films in the AP-SL2.5, AP-SL5.0 and AP-SL10.0 formulations, resulting in 100% of solubility when the highest concentration of sophorolipids was used (AP-SL10.0). Ziembra *et al.* (2019) showed that the incorporation of lactonic sophorolipids in electrospun PLA fibers conferred a more hydrophilic character to the material, possibly due to the hydrophilic sugar portion, which may explain this increase in solubility.

The incorporation of sophorolipids and citric acid in the formulations did not significantly affect the solubility of the samples ( $p > 0.05$ ), with solubility values ranging from 61 and 64% (Table 2). Wu and collaborators (2019) showed that increasing the citric acid content in starch and chitosan films resulted in a decrease in solubility, because the reaction with citric acid decreases the availability of hydroxyl groups, which are hydrophilic, and which react with the carboxylic groups of citric acid via esterification reaction, resulting in reinforcement of polymeric chains.

WVP was affected by the addition of sophorolipids and citric acid (Table 2). Films

prepared with the crosslinking agent resulted in less permeable samples at all concentrations of added sophorolipids, which confirms the ability of citric acid to reinforce the polymeric structure, resulting in materials with better barrier properties. WVP decreased significantly according to increasing concentration of sophorolipids. According to Maniglia *et al.* (2019), the reduction of WVP may result from the interaction between the surfactant and the starch, reducing the diffusion of water vapor through the film matrix. According to these authors, the decrease in WVP is an interesting feature for biodegradable films, resulting in a disfavor of microbial growth, leading to greater microbiological stability of the product during its storage.

### 3.3. Mechanical properties

Films containing sophorolipids without the crosslinking agent (AP-SL2.5, AP-SL5.0 and AP-SL10.0), did not lead to significant changes in the mechanical properties (Table 2). In films prepared with the addition of citric acid, the results showed no significant effect of the addition of sophorolipids on the RMT, but a significant increase in elongation was observed with the addition of sophorolipids (Table 2). The reaction with citric acid was able to reinforce the polymer matrix through the formation of intermolecular ether or ester bonds with the hydroxyl groups of the starch and pullulan molecules (Miskeen *et al.* 2021; Simões *et al.* 2020), which resulted in films with greater deformation and elongation capacities, but more flexible.

Other authors had already reported the effect of sophorolipids on the increase in elongation of biodegradable films, attributing this effect to their plasticizing action. Plasticizers interfere with the polymer matrix leading to a decrease in the intermolecular forces responsible for its formation, resulting in more flexible films (Hipólito *et al.*, 2021; Solaiman *et al.* 2015; Silveira *et al.* 2020).

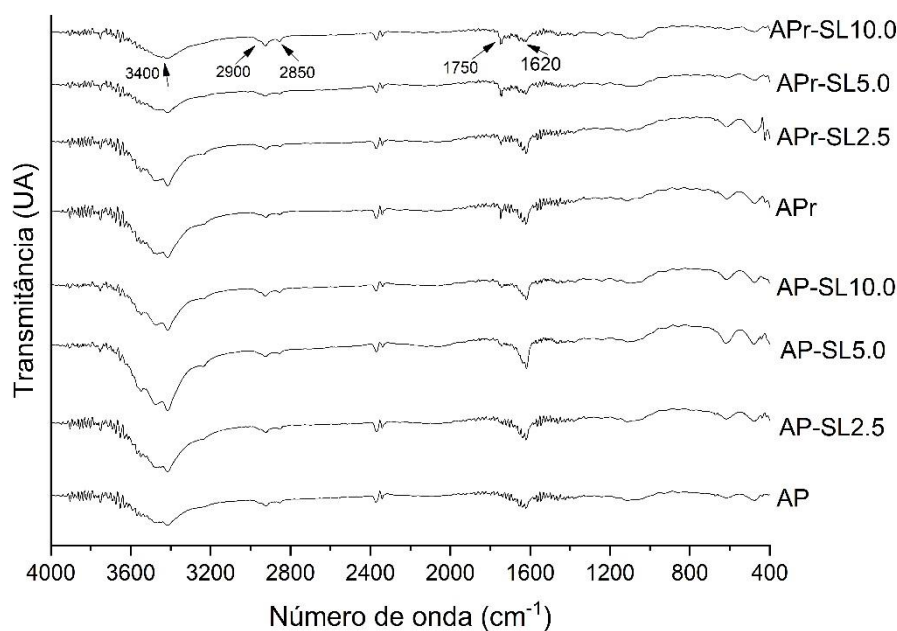
### 3.4. Fourier Transformed Infrared (FT-IR) Spectroscopy

The FT-IR spectra of the biofilms and the produced starch films are presented in Figure 3. The band at  $3400\text{ cm}^{-1}$  was observed in all samples, and it can be attributed to the stretching of the O-H bonds related to the hydrogen bonds established between the components of the films. The band situated between  $2900$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$  refers to C-H bonds and it is also present in all samples. The  $1650\text{ cm}^{-1}$  band was attributed to water absorbed by starch and pululan molecules (Sueiro *et al.*, 2016; Hipólito *et al.*, 2021).

In the samples containing citric acid, different intensities of the band at  $3400\text{ cm}^{-1}$

<sup>1</sup> can be seen, becoming wider and less intense, associated with the lower amount of OH available in the films (Seligra *et al.* 2016). Furthermore, a band at 1750  $\text{cm}^{-1}$  appears in these films, which can be attributed to the stretching vibrations of the  $C = C$  and  $C = O$  (carbonyl ester group) bonds, which were possibly formed from the esterification of starch and pullulan with citric acid. Other authors have already reported the presence of this band from the reaction of starch with citric acid. Crosslinking agents are capable of forming intermolecular ether or ester bonds with the hydroxyl groups in starch molecules and, depending on the level of substitution, the polymer network is reinforced and results in changes in solubility and water absorption capacity (Miskeen *et al.* 2021; Simões *et al.* 2020).

**Figure 3.** FT-IR spectra of films based on pullulan starch with the addition of sophorolipids.



AP: starch, pullulan. AP-SL2.5: starch, pullulan e 2,5% of sophorolipids. AP-SL5.0: starch, pullulan and 5% of sophorolipids. AP-SL10.0: starch, pullulan and 10% of sophorolipids. APr: starch, pullulan, reticulated with citric acid. APr-SL2.5: starch, pullulan, citric acid and 2,5% of sophorolipids. APr-SL5.0: starch, pullulan, citric acid and 5% of sophorolipids. APr-SL10.0: starch, pullulan, citric acid and 10% of sophorolipids.

### 3.5. Antimicrobial activity of films

The antimicrobial effect of different film formulations containing pullulan, starch and increasing concentrations of sophorolipids were evaluated against *S. aureus* and *S.*



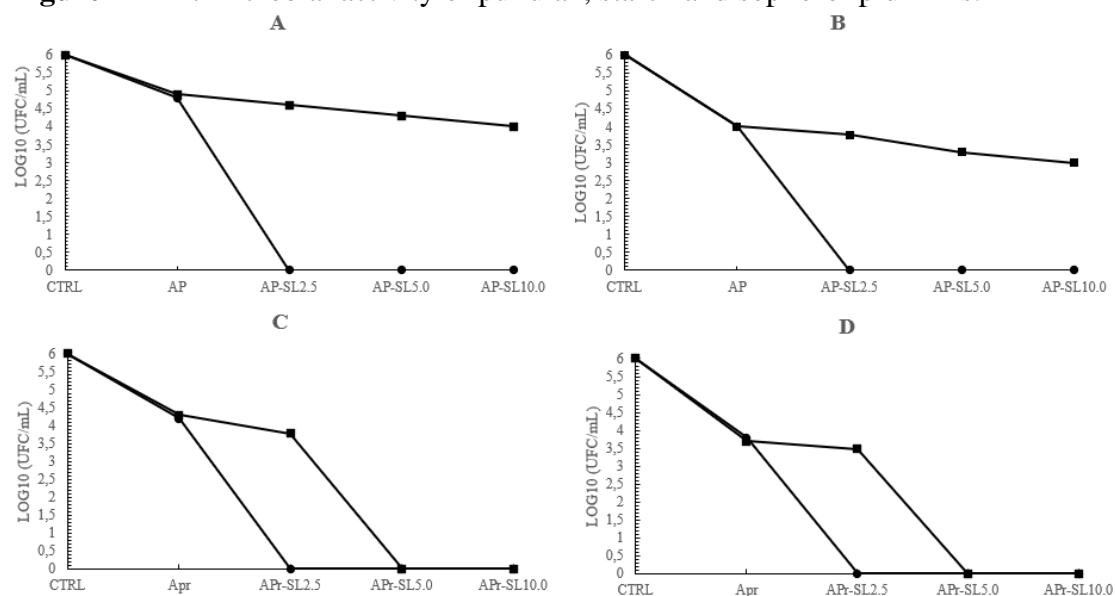
*epidermidis*. Figure 4 shows the antimicrobial activity of the films in contact with microorganisms at 30 min and 60 min.

As expected, the films without the addition of sophorolipids did not exhibit any antimicrobial effect against the bacteria tested (Figure 4). Considering that the initial count of both microorganisms was  $10^6$  CFU. mL<sup>-1</sup>, in the films produced without the crosslinking agent (Figure 4A and 4B), a decrease in the cell count was observed as the concentration of sophorolipids increased, indicating the effectiveness of the matrix used to release the sophorolipids to the microorganisms.

The formulation containing citric acid (crosslinking agent) without the addition of sophorolipids showed a small antimicrobial activity (APr formulation, Figure 4C and 4D). On the other hand, films with the crosslinking agent and with the addition of sophorolipids were able to completely inhibit both microorganisms tested within 30 min (Figure 4C and 4D) Similar results were found in the works of Reddy and Yang (2010), where the presence of citric acid increased the antimicrobial activity of chitosan films, due to its inhibition effects for some bacteria (In *et al.* 2013; Mahmoud, 2014). After 60 min of incubation of the films with the microorganisms, all the formulations containing sophorolipids were efficient for the complete reduction of the tested microorganisms.

According to the literature, the antimicrobial activity of sophorolipids is characterized by changes or rupture of the membrane, inducing lysis and possible leakage of the cytoplasmic content of the target bacteria. This effect is related to sugar and lipid portions of sophorolipids. Due to their amphiphilic characteristics, sophorolipids decrease the hydrophobicity of bacterial plasma membranes, presenting bactericidal characteristics, being able to induce cell death and biofilms of Gram positive and Gram-negative bacteria (Ceresa *et al.* 2021; Freitas *et al.* 2018).

**Figure 4 - Antimicrobial activity of pullulan, starch and sophorolipid films.**



A) Formulations without citric acid for the microorganism *S. aureus* in contact for 30 min (■) and in contact for 60 min (●). B) Formulations without citric acid for the microorganism *S. epidermidis* in contact for 30 min (■) and in contact for 60 min (●). C) Formulations with citric acid for the microorganism *S. aureus* in contact for 30 min (■) and in contact for 60 min (●). D) Formulations with citric acid for the microorganism *S. epidermidis* in contact for 30 min (■) and in contact for 60 min (●).

#### 4. Conclusion

The results obtained in this work showed that the mixture of sophorolipids, pullulan, starch and citric acid resulted in biofilms without signs of agglomeration, indicating a good interaction between sophorolipids and the polysaccharides matrix. The films produced with sophorolipids exhibited great antimicrobial activity, being able to inhibit 100% the growth of *S. aureus* and *S. epidermidis*. Consequently, sophorolipids can be considered a promising ingredient for incorporation in biofilms, being an ecologically correct active compound with a natural antimicrobial for the treatment of bacterial infections of the skin.

#### 5. References

ALEXANDER, H., PALLER, A., TRIDL-HOFFMANN, C., BECK, L., DE BENEDETTO, A., DHAR, S., GIROLOMONI, G., IRVINE, A., SPULS, P., SU, J., THYSSEN, J., VESTERGAARD, C., WERFEL, T., WOLLENBERG, A., DELEURAN, M. AND FLOHR, C. The role of bacterial skin infections in atopic dermatitis: expert statement and review from the International Eczema Council Skin Infection Group. **British Journal of Dermatology**, v.182, p.1331-1342, 2020.

ASHBY, R. D., ZERKOWSKI, J. A., SOLAIMAN, D. K. Y., & LIU, L. S. Biopolymer scaffolds for use in delivering antimicrobial sophorolipids to the acne-causing bacterium *Propionibacterium acnes*. **New Biotechnology**, 28, 24–30, 2011.

ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. D882–18. In Annual Book of ASTM. American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA; 2018.

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96/E96M-16. In Annual Book of ASTM. American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA; 2016

BOUCHELACHEM, S.; DAS, S.; NAOREM, R.S.; CZUNI, L.; PAPP, G.; KOCSIS, M. Evaluation of Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antibacterial and Antibiofilm Activities of Hungarian Propolis Ethanolic Extract against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v.27, p.574, 2022.

CERETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; ANDRADE, G.; MACEDO, F.; CELLIGOI, M.A. Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato, **Science of Food and Agriculture**, 2021

CERESA, C.; FRACCHIA, L.; FEDELI, E.; PORTA, C.; BANAT, I.M. Recent Advances in Biomedical, Therapeutic and Pharmaceutical Applications of Microbial Surfactants. **Pharmaceutics**, v.13, p.466, 2021

CONG, T-X; HAO, D.; WEN, X.; LI, X-H.; HE, G., JIANG, X. From pathogenesis of *ace vulgaris* to anti-acne agentes. **Archives of Dermatological Research**, v.311, p.337-349, 2019.

FONTOURA, I.C.C.; SAIKAWA, G.I.A.; SILVEIRA, V.A.I *et al.* Antibacterial Activity of Sophorolipids from *Candida bombicola* Against Human Pathogens. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.63 e20180568, 2020.

FREITAS, C.A.U.Q.; SILVEIRA, V.A.I.; PEDRINE. M.A. Antimicrobial Applications of Sophorolipid from *Candida bombicola*: a Promising Alternative to Conventional Drugs. **Adv Biotech & Micro**, v.9, n.1, e.555753, 2018.

HIPÓLITO, A.; DA SILVA, R.A.A.; CARETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; AMADOR, I.R.; PENAGIO, L.A.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M.A.P.C. Evaluation of antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.29, 101797, 2020

HIPÓLITO, A., CARETTA, T.D., SILVEIRA, V.A.I., BERSANETI, G.T., MALI, S., CELLIGOI, MAPC. Active Biodegradable Cassava Starch Films Containing Sophorolipids Produced by *Starmerella bombicola* iATCC® 22214™. **J Polym Environ** v.29, p.3199–3209, 2021.

IBRAHIM F, KHAN T, PUJALTE GG. Bacterial Skin Infections. **Primary Care**, v.42, n.4, p.485-99, 2015.

- IN, Y.-W., KIM, J.-J., KIM, H.-J., & OH, S.-W. Antimicrobial Activities of Acetic Acid, Citric Acid and Lactic Acid against Shigella Species. **Journal of Food Safety**, v.33, n.1, p. 79–85, 2013.
- ISMAIL, A.A.; FAREA, M.O.; AWWAD, N.S.; IBRAHIUM, H.A.; EID, M.M.; MENAZEFA, A.A. Perspectives on composite films of chitosan-based natural products (Ginger, Curcumin, and Cinnamon) as biomaterials for wound dressing, *Arabian Journal of Chemistry*, v.15, 103716, 2022.
- MAHMOUD, B.S.M. The efficacy of grape seed extract, citric acid and lactic acid on the inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in shucked oysters. **Food Control**, v. 41, p. 13-16, 2014.
- MANIGLIA, B.C.; LAROQUE D.A., ANDRADE M, CARCIOF BAM, TENÓRIO AS, ANDRADE CJ. Production of active cassava starch films; effect of adding a biosurfactant or synthetic surfactant. **React Funct Polym**, v.144, p.104368, 2019.
- MISKEEN, S.; HONG, J.S.; CHOI, H-D.; KIM, J-Y. Fabrication of citric acid-modified starch nanoparticles to improve their thermal stability and hydrophobicity. *Carbohydrate Polymers*, v. 253, p. 117242, 2021.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. **Approved Guideline**, M26-1, v. 19, n. 18, Wayne, PA, USA: CLSI. 1999.
- PATTANAYAIYING, R., H-KITTIKUN, A., & CUTTER, C. N. Optimization of formulations for pullulan films containing lauric arginate and nisin Z. **Food Science and Technology**, p.63, n.2, p.1110–1120, 2015.
- RAMAKRISHNAN, K., SALINAS , R.C., NELSON, I.A., HIGUITA N.I.A. Skin and Soft Tissue Infections. **American family physician**, v.92, n.6, p.474-83, 2015.
- REDDY, N.; YANG, Y. Citric acid cross-linking of starch films, *Food Chemistry*, v.118, n.3, 2010,
- ROY, S.; KUMARI, M.; HALOI, P.; CHAWLA, S.; KONKIMALLA, V.B.; KUMAR, A.; KASHYAP, H.K.; JAISWAL, A. Quaternary ammonium substituted pullulan accelerates wound healing and disinfects *Staphylococcus aureus* infected wounds in mouse through an atypical ‘non-pore forming’ pathway of bacterial membrane disruption, *Biomater. Sci*, v.10, p.581, 2022.
- SELIGRA, P.G.; JARAMILLO, C.M.; FAMÀ, L.; GOYANES, S. Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch–glycerol with citric acid as crosslinking agent. *Carbohydrate Polymers*, v. 138, p. 66-74, 2016.
- SILVEIRA, V.A.I.; NISHIO, E.K.; FREITAS, C.A.U.Q *et al.* Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.21, 101287, 2019.

SILVEIRA, V. A.I.; MARIM, B.M.; HIPÓLITO, A.; GONÇALVES, M.C.; MALI, S.; KOBAYASHI, R.M.T.; CELLIGOI, M.A.P.C. Characterization and antimicrobial properties of bioactive packaging films based on polylactic acid-sophorolipid for the control of foodborne pathogens. *Food Packaging and Shelf Life*, v.26, 100591, 2020.

SIMÕES, B. M., CAGNIN, C., YAMASHITA, F., OLIVATO, J. B., GARCIA, P. S., DE OLIVEIRA, S. M.; EIRAS GROSSMANN, M. V. Citric acid as crosslinking agent in starch/xanthan gum hydrogels produced by extrusion and thermopressing. *LWT*, v. 125, 108950, 2020.

SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D., ZERKOWSKI, J. A., KRISHNAMA, A., & VASANTHAN, N. Control-release of antimicrobial sophorolipid employing different biopolymer matrices. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v,4, p.342–348, 2015.

SUEIRO, A.C.; FARIA-TISCHER, P.C.S.; LONNI, A.A.S.G.; MALI, S. Filmes biodegradáveis de amido de mandioca, pululana e celulose bacteriana. *Quim. Nova*, V. 39, N. 9, p. 1059-1064, 2016.

TANG, S., ZHANG, L., MAO, X., SHAO, Y., CAO, M., ZHANG, L., LIANG, X. Pullulan-based nanocomposite films with enhanced hydrophobicity and antibacterial performances. *Polymer Bulletin* (2022)

VOSS GT, GULARTE MS, DE OLIVEIRA RL, LUCHESE C, FAJARDO AR, WILHELM EA. Biopolymeric films as delivery vehicles for controlled release of hydrocortisone: Promising devices to treat chronic skin diseases. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, v.114, p.111074, 2020.

WU,H.; LEI, Y.; LU, J.; ZHU, R.; XIAO, DI.; JIAO, C., XIA, R.; ZHANG, Z.; SHEN,G.; LIU, Y.; LI,S.; LI,M. Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films, *Food Hydrocolloids*, v. 97, 2019

ZIEMBA, A. M., LANE, K. P., BALOUCH, B., D'AMATO, A., TOTSINGAN, F., GROSS, R. A. Lactonic sophorolipid increases surface wettability of poly-L-lactic acid electrospun fibers. *ACS Applied Bio Materials*, v.2, p.3153–3158, 2019.

## 6 CONCLUSÕES

A produção de soforolipídios foi de 43,38 g.L<sup>-1</sup> com produtividade 0,164 g.L.h em 264 horas, com rendimento de 38,24% de eficiência de conversão de substratos. O crescimento de biomassa foi de 50g.L<sup>-1</sup> ao final da fermentação e o consumo de glicose e ácido oleico foi de 99,25 % e 76 % respectivamente. A análise de HPLC mostrou que os soforolipídios produzidos em comparação ao padrão foram principalmente lactônico C18:1 diacetilado.

Os soforolipídios foram capazes de inibir os microrganismos *S. aureus* e *S. epidermidis* com concentração inibitória mínima (MIC) de 31,25 µg/mL e 125,0 µg/mL respectivamente. O óleo de palmarosa teve MIC de 5000 µg/mL para ambos os microrganismos. A combinação de soforolipídios com o óleo de palmarosa se mostrou sinérgica, diminuindo os valores de MIC dos soforolipídios em 98% para *S. aureus* e 50% para *S. epidermidis*.

Atividade antioxidante dos soforolipídios foram de 28,31% na concentração de 4 mg/mL e o óleo de palmarosa foi de 39% a 0,4 mg/mL. Houve um aumento para 55% na atividade quando há combinação com o óleo de palmarosa.

As formulações cosmecêuticas gel-creme desenvolvidas apresentaram boa estabilidade nas condições testadas, com aproximadamente 92% de retenção de umidade. A formulação sem a adição de conservante sintético apresentou 100% de inibição contra os patógenos *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. acnes* e estabilidade demonstrando ser autoconservante.

As formulações cosmecêuticas de filmes biopoliméricos com soforolipídios, a base de pululana e amido e se mostraram integras, sem bolhas indicando uma boa interação entre os ingredientes. A adição de ácido cítrico melhora propriedades hidrofílicas e propriedades mecânicas dos filmes. Devido a presença de soforolipídios os filmes exibiram atividade antimicrobiana de 100% de inibição para os microrganismos *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Esses resultados mostram que os os soforolipídios podem ser considerados um

ingrediente promissor para a incorporação formulações cosmeceuticas, sendo ecologicamente correto para o tratamento de infecções bacterianas da pele e acne.

## 7 REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos: Uma Abordagem Sobre os Ensaio Físicos e Químicos. 2 ed. Brasília: **ANVISA**; 2008.

ALEXANDER, H., PALLER, A., TRAJDL-HOFFMANN, C., BECK, L., DE BENEDETTO, A., DHAR, S., GIROLOMONI, G., IRVINE, A., SPULS, P., SU, J., THYSSEN, J., VESTERGAARD, C., WERFEL, T., WOLLENBERG, A., DELEURAN, M. AND FLOHR, C. The role of bacterial skin infections in atopic dermatitis: expert statement and review from the International Eczema Council Skin Infection Group. **British Journal of Dermatology**, v.182, p.1331-1342, 2020.

ASHBY, R. D., ZERKOWSKI, J. A., SOLAIMAN, D. K. Y., & LIU, L. S. Biopolymer scaffolds for use in delivering antimicrobial sophorolipids to the acne-causing bacterium *Propionibacterium acnes*. **New Biotechnology**, 28, 24–30, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. Cosméticos verdes devem crescer 10% nos próximos anos, 2019. Disponível em: <https://abihpec.org.br/cosmeticos-verdes-devem-crescer-10-nos-proximos-anos/>. Acesso em 15 de agosto 2020.

ASMER, H.-J., LANG, S., WAGNER, F., & WRAY, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n.9, p. 1460–1466, 1988.

ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. D882–18. In Annual Book of ASTM. American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA; 2018.

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96/E96M-16. In Annual Book of ASTM. American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA; 2016

CARVALHO, I.T.; ESTEVINHO B.N.; SANTOS, L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v.38, n.2, p.109–19, 2016.

CEBI, N. Quantification of the Geranium Essential Oil, Palmarosa Essential Oil and Phenylethyl Alcohol in *Rosa damascena* Essential Oil Using ATR-FTIR Spectroscopy Combined with Chemometrics. **Foods**, v.10, p.1848, 2021.

CERETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; ANDRADE, G.; MACEDO, F.; CELLIGOI, M.A. Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato. **Science of Food and Agriculture**, v.102, n.3, p.1245-1254, 2021.

CHEN, G.E.; SHANG, M-J.; TAO, S-S.; LI, J.F.; LANG S-K.; LI, H-F. Preparation os antimicrobial preservative film based on pullulan and sophorolipids. **Science and**



**Technology os Food Industry**, p. 1002-0306, 2018.

CONG, T-X; HAO, D.; WEN, X.; LI, X-H.; HE, G., JIANG, X. From pathogenesis of ace vulgaris to anti-acne agentes. **Archives of Dermatological Research**, v.311, p.337-349, 2019.

DELBEKE, E.I.P.; ROELANTS, S.L.K.W.; MATTHIJIS, N; EVERAERT, B.; SOETAERT, W.; COENYE, T.; GEEM, K.M.V.; STEVENS, C.V. Sophorolipid Amine Oxide Production by a Combination of Fermentation Scale-up and Chemical Modification. **Engineering Chemistry Research**, v.55, n.27, p.7273–7281, 2016.

DRAELOS, Z. D. Cosmeceuticals: undefined, unclassified, and unregulated. **Clinics in Dermatology**, v.27, n.5, p. 431–434, 2009.

DRÉNO, B.; DAGNELIE, M.A.; KHAMMARI, A.; CORVEC, S. The skin Microbiome: A new Actor in Inflammatory Acne. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.21, p.18–24, 2020.

DREGER, M.; WIELGUS, K. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. **Herba Polonica Jounal**, v.59, n.4, 2013.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile 107 Constituents: A Review. **Wiley Interscience**, v.21, p.308–23, 2007.

FONTOURA, I.C.C.; SAIKAWA, G.I.A.; SILVEIRA, V.A.I *et al.* Antibacterial Activity of Sophorolipids from *Candida bombicola* Against Human Pathogens. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.63 e20180568, 2020.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; REIS, M.A.M. Bacterial Polysaccharides: Production and Applications in Cosmetic Industry. **Springer International Publishing**, p.1-24, 2015.

FREITAS, C.A.U.Q.; SILVEIRA, V.A.I.; PEDRINE. M.A. Antimicrobial Applications of Sophorolipid from *Candida bombicola*: A Promising Alternative to Conventional Drugs. **Advances in Biotechnology & Microbiology**, v.9, n.1, e.555753, 2018.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F., RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Jounal of Applied Microbiology**, v.86, p. 958-990, 1999.

HILLION, G.; MARCHAL, R.; STOLTZ, C.; BORZEIX, C.F. Use of a sophorolipid to provide free radical formation inhibiting activity or elastase inhibiting activity. **U.S. Patente** 5756471, May 26, 1998.

HOA, N.L.H.; LOAN; L.Q; SANG.V.T. production and characterization os sophorolipids by *Candida bombicola* using catfish fat. **Natural sciences and technology**, v. 14, n. 9, p.152-159, 2017.

HIPÓLITO, A.; DA SILVA, R.A.A.; CARETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; AMADOR,

I.R.; PENAGIO, L.A.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M.A.P.C. Evaluation of antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.29, 101797, 2020.

HIPÓLITO, A.; CARETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; BERSANETI, G.T.; MALI, S.; CELLIGOI, M.A.P. Active Biodegradable Cassava Starch Films Containing Sophorolipids Produced by *Starmerella bombicola* ATCC® 22214™. **Journal of Polymers and the Environment**, v.29, p. 3199–3209, 2021.

IBRAHIM F, KHAN T, PUJALTE GG. Bacterial Skin Infections. **Primary Care**, v.42, n.4, p.485-99, 2015.

JOSHI-NAVARE, K.; PRABHUNE, A. "A Biosurfactant-Sophorolipid Acts in Synergy with Antibiotics to Enhance Their Efficiency", **BioMed Research International**, v.2013, p. 8, 2013.

JUMMES, B., SGANZERLA, W. G., DA ROSA, C. G., NORONHA, C. M., NUNES, M. R., BERTOLDI, F. C., & BARRETO, P. L. M. Antioxidant and antimicrobial poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles loaded with *Cymbopogon martinii* essential oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 101499, 2020.

KURTZMAN, C. P., PRICE, N. P. J., RAY, K. J., & KUO, T.-M. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. **Microbiology Letters**, v.311, n.2, p.140–146, 2010.

LANG, S.; KATSIWELA, E.; WAGNER, F. Antimicrobial effects of biosurfactants. **European Journal Lipid Science Technology**, v.91, n.9, p. 363–366, 1989.

LIU, X.; MA, X.; YAO, R.; PAN, C.; HE, H. Sophorolipids production from rice straw via SO<sub>3</sub> micro-thermal explosion by *Wickerhamiella domercquiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. **ABM Express**, v.6, n.1, p. 60, 2016.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic**, v.31, p.255–261, 2009.

MARQUES, S. A., & ABBADE, L. P. F. Severe bacterial skin infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 95, n. 4, p.407-417, 2020.

MA, X.; MENG, L.; ZHANG, H.; ZHOU, L.; YUE, J.; ZHU, H.; YAO, R. Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates. **App Microbiology and Biotechnology**, v.104, p. 77-100, 2020.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. P.; MANDREL, R.E. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, N.10, p.1545–1560, 2002.

MINUCELLI, T.; RIBEIRO-VIANA, R. M.; BORSATO, D.; ANDRADE, G.; CELY, M. V. T.; OLIVEIRA, M. R.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Sophorolipids

production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 743–753, 2016.

MOLDES, A.; VECINO, X.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, L.; RINCÓN-FONTÁN M.; CRUZ, J.M. Chapter 8 - Biosurfactants: the use of biomolecules in cosmetics and detergents. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 163-185, 2020.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. **Approved Guideline**, M26-1, v. 19, n. 18, Wayne, PA, USA: CLSI. 1999.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, n. 1, p. 375-380, 1944.

NEWBURGER, A. E. Cosmeceuticals: myths and misconceptions. **Clinics in Dermatology**, v.27, n.5, p.446–452, 2009.

PASCHOAL, S.G.; ANDRADE, I.P.; NISHIO, E.K. et al. *Trichilia catigua* extracts with antibacterial activity for the treatment of acne vulgaris: topical formulation. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v.7, p.183 – 200, 2020.

OLIVEIRA R. S.; FONTAINE, V.; MATHIEU, V.; ZHIRI, A.; BAUDOUX, D.; STÉVIGNY, C.; SOUARD, F. Antibacterial and Cytotoxic Activities of Ten Commercially Available Essential Oils. **Antibiotics**, v.9, p. 717, 2020.

QUEIROZ, C.A.U.; SILVEIRA, V.A.I.; HIPÓLITO, A.; CELLIGOI, M.A.P.C. Perspectivas de aplicação de sofrorolipídio. **Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**3, cap.12, p. 103-114, 2019.

RAMASAMY, S., BARNARD, E., DAWSON, T. L., & LI, H. The role of the skin microbiota in acne pathophysiology. **British Journal of Dermatology**, 2019.

ROELANTS, S., SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D., LODENS, S., VAN RENTERGHEM, L., & SOETAERT, W. Production and Applications of Sophorolipids. Biobased Surfactants. **Elsevier Academic Press**, v.3, p. 65–119, 2019.

SCUDELER, C. G. S. Desenvolvimento e caracterização de filmes biopoliméricos a partir de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com incorporação de óleos essenciais, nanoargila e gelatina. **Dissertação** de doutorado Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

SEN, S.; BORAH, S.N.; BORA, A.; DEKA, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. **Microbial Cell Factories**, v.16, n.1, p.95, 2017.

SCHERER, R., WAGNER, R., DUARTE, M.C.T., GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.442-449,

2009.

SHARMEEN, J. B.; MAHOMOODALLY, F. M.; ZENGIN, G.; & MAGGI, F. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. **Molecules**, v.26, n.3, p.666, 2021.

SILVA, R.T.; BERSANETI, G.T.; CHIDEROLI, R.T.; PEREIRA, U.P.; LONNI, A.A.S.G.; BIGOTTO, B.G.; CELLIGOI, M.A.P. Biological properties of levan *Bacillus subtilis* natto and cinnamon essential oil for application in cosmeceutical formulation, **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.5, 2020.

SILVEIRA, V.A.I.; NISHIO, E.K.; FREITAS, C.A.U.Q *et al.* Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.21, 101287, 2019.

SOLAIMAN, D.K.Y., ASHBY, R.D., CROCKER, N.V. High-titer production and strong antimicrobial activity of sophorolipids from *Rhodotorula bogoriensis*. **Biotechnology Progress**, v.31, n.4, p.867–874, 2015a.

SOMOGYI, M., A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biological Chemistry**, v.160, p.61-68, 1952.

SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D., ZERKOWSKI, J. A., KRISHNAMA, A., & VASANTHAN, N. Control-release of antimicrobial sophorolipid employing different biopolymer matrices. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v,4, p.342–348, 2015b.

SRIKANTH, R.; SIDDARTHA, G.; SUNDHAR REDDY, C. H. S. S.; HARISH B.S.; JANAKI RAMAIAH, M.; UPPULURI, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate Polymers**, v.123, p.8-16, 2015.

SUEIRO, A.C.; FARIA-TISCHER, P.C.S.; LONNI, A.A.S.G.; MALI, S. Filmes biodegradáveis de amido de mandioca, pululana e celulose bacteriana. **Química Nova**, v. 39, No. 9, p. 1059-1064, 2016.

TRAUB, W.H., KLEBER, I., In vitro additive effect of polymyxin B and rifampin against *Serratia marcescens*. **Antimicrobe. Agents Chemother**, v.7, p.874–876, 1975.

VAN BOGAERT, I.N. A; ZHANG, J; SOETAERT, W.B. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v.46, p.821–833, 2011.

VECINO, X.J. M.; CRUZ, A. B; MOLDES L.R.R. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, p.1549-7801, 2017.

VOSS GT, GULARTE MS, DE OLIVEIRA RL, LUCHESE C, FAJARDO AR, WILHELM EA. Biopolymeric films as delivery vehicles for controlled release of hydrocortisone: Promising devices to treat chronic skin diseases. **Mater Science and**

**Engineering**, v.114, p.111074, 2020.

XU, H., & LI, H. Acne, the Skin Microbiome, and Antibiotic Treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, 2019.

YANG F.; ZHAO. X-H; H. J.; SUN C.; LIU D.; HU F-Q. Estudos preliminares sobre propriedades de superfície e atividades antioxidantes de soforolipídios. **Science and technology of foof industry**, V.33, N.14, 2012.

ZERHUSEN, C., BOLLMANN, T., GÖDDERZ, A., FLEISCHER, P., GLÜSEN, B., & SCHÖRKEN, U. Microbial Synthesis of Nonionic Long-Chain Sophorolipid Emulsifiers Obtained from Fatty Alcohol and Mixed Lipid Feeding. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2019.

ZHANG, Y.; JIA, D.; SUN, W.; YANG, X.; ZHANG, C.; ZHAO, F.; LU, W. Semicontinuous sophorolipid fermentation using a novel bioreactor with dual ventilation pipes and dual sieve-plates coupled with a novel separation system. **Microbial Biotechnology**, v.11, n.3, p.455–464, 2018.

ZHANG, Z.; WANG, X.; HAN, Z.; ZHAO, M.; YIN, L. Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2332–2337, 2012.

ZHAO, L.; FAN, F.; WANG, P.; JIANG, X. Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. **Biotechnological products and process engineering**, v. 87, p.2841–2850, 2013.