

Teste antimicrobiano com óleo de levedura *Rhodospiridium toruloides*

Antimicrobial test with *Rhodospiridium toruloides* yeast oil

RESUMO

O objetivo é determinar a capacidade antimicrobiana do óleo da levedura *Rhodospiridium toruloides* para uso em formulações como conservantes, em alimentos, cosméticos entre outros. A metodologia aplicada neste trabalho foi de teste antimicrobiano por teste de microdiluição em placas de 96 poços, sendo realizada a diluição seriada entre os poços com o óleo para determinação da concentração inibitória mínima e para determinação da concentração bactericida mínima, sendo verificada a quantidade de unidade formadora de colônia via contagem em placa de Petri. Foram utilizadas a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e a levedura *Candida parapsilosis*. A diluição do óleo com polipropilenoglicol foi a melhor entre os solventes testados.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia-Indústria. Metabolismo microbiano. Contaminação microbiana.

ABSTRACT

The objective is to determine the antimicrobial capacity of the yeast oil *Rhodospiridium toruloides* for use in formulations such as preservation, food, cosmetics, among others. The methodology applied in this work was antimicrobial test using a microdilution test in 96-well plates, with serial dilution being performed between the wells with the oil to determine the minimum inhibitory concentration and to determine the minimum bacterial concentration, checking the amount of unit colony forming via Petri dish count. The bacteria were used Gram-positive *Staphylococcus aureus*, Gram-negatives *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and the yeast *Candida parapsilosis*. The oil dilution with polypropyleneglycol was the best among the tested solvents.

KEYWORDS: Biotechnology industries. Microbial metabolic. Microbial contamination.

Larissa Pereira

larper@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Alessandra Cristine Novak

Sydney

alessandrac@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Recebido:

Aprovado:

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

As indústrias tendem a buscar por novos componentes de suas formulações, principalmente no quesito de soluções nas contaminações de produtos. Já que a propagação de microrganismos quando ocorre dentro das linhas de produção pode levar a prejuízos financeiros e também prejudicar a saúde dos consumidores, quando a formulação apresenta alterações pela contaminação ou o microrganismo é prejudicial à saúde (MOTA, 2017).

Dessa forma o presente trabalho visa solucionar fornecendo uma opção biotecnológica, utilizando do óleo produzido pela levedura *Rhodospiridium toruloides* como possível antimicrobiano.

Os óleos são produzidos por todos os macro e microrganismos vivos para papéis estruturais e funcionais essenciais dentro de uma célula, como a formação de membranas permeáveis e organelas na forma de uma bicamada lipídica (DOWHAN, BOGDANOV, 2013). No entanto, apenas um número relativamente pequeno de microrganismos é capaz de acumular quantidades de lipídios celulares acima de 20 ou até 80% de sua massa celular como material de armazenamento de reserva. Estes são denominados microrganismos oleaginosos (RATLEDGE, 2004).

A **produção de óleo microbiano** oferece várias vantagens em comparação ao uso de fontes de animais ou plantas, visto que apresentam características dos ácidos graxos proporcionais. O cultivo de microrganismos é independente de restrições geográficas ou climáticas, possui curtos períodos de produção e vários substratos, incluindo resíduos industriais, podem ser utilizados, dessa forma barateando a produção do óleo. Os principais produtores de lipídios são fungos, leveduras e algas, enquanto as bactérias não são boas produtoras (OCHSENREITHER et al, 2016; AFONSO, 2017).

O **acúmulo de lipídios** como armazenamento de reserva é desencadeado por um **excesso de fonte de carbono e um nutriente limitante**, geralmente nitrogênio. Sob essas condições, o carbono excedente é direcionado para a síntese lipídica e são formadas dentro das células gotículas de óleo constituídas por triacilgliceróis (RATLEDGE, 2004; OCHSENREITHER et al, 2016) .

Uma levedura oleaginosa é a *Rhodospiridium toruloides*, tendo sido relatada a sua capacidade para sintetizar e acumular lipídios intracelulares de até aproximadamente 79% do seu peso-seco (AFONSO, 2017; BONTURI et al, 2015). A levedura apresenta uma pigmentação cor-de-rosa ou avermelhada, a qual se deve à produção de carotenoides, na maioria β -caroteno, que pode ser utilizado como precursor da vitamina A, **antioxidante** ou como pigmento natural (AFONSO, 2017).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização do teste antimicrobiano pelo método de microdiluição foi necessário escolher os microrganismos que foram testados frente ao óleo da *Rhodospiridium toruloides*, assim como o solvente do óleo.

Os microrganismos que foram utilizados são da Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico da UTFPR/Ponta Grossa – CMIB-UTFPR/PG sendo parte integrante da Rede Paranaense CMRP – Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense. Foram utilizadas a bactéria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (CMIB-117) e bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (CMIB-090) e *Pseudomonas aeruginosa* (CMIB-103) e foi utilizada a levedura *Candida parapsilosis* (CMIB- 004) (ALMEIDA, 2018).

O preparo do inóculo para bactérias a partir de culturas em placa de Petri foi realizado com auxílio de alça estéril. Pegou-se 5 UFC (unidade formadora de colônia) da placa e colocou-se em 50 ml de meio de cultura líquido (conforme tabela 1) que foi incubado de 24-48h em estufa à 30° C. Usando uma alíquota de 5 mL para comparação com a escala de McFarland tubo 0,5 para obter a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, usando solução salina estéril (0,85%) para ajuste (BELUSSO, 2014; RABINOVITCH, 2015; BONA et al, 2014).

Tabela 1 – Meio de cultura utilizado para cada microrganismo

Microrganismos	Meio de cultura
Staphylococcus aureus	Caldo Mueller Hinton
Escherichia coli	Caldo Mueller Hinton
Pseudomonas aeruginosa	Caldo Mueller Hinton
Candida parapsilosis	Caldo Sabouraud Dextrose

Fonte: Autoria própria.

O preparo de diluição para contagem de UFC para bactérias para a confirmação da quantidade de UFC no inóculo foi realizado a partir da alíquota de 5 mL comparada com a escala de McFarland tubo 0,5 devidamente ajustada. Através de espectrofotômetro (leitura de 0.08 a 0.10 em absorbância sob 625 nm) que corresponde de 1×10^8 UFC/mL (RABINOVITCH, 2015).

Com o inóculo ajustado (1×10^8 UFC/mL) dever ser diluído 1:100 [0,1mL em 10mL] (1×10^6 UFC/mL) em solução salina estéril e, em seguida, transferindo 1 mL deste para outro tubo contendo 1 mL de solução salina (concentração bacteriana final: 5×10^5 UFC/mL) (RABINOVITCH, 2015).

Partindo-se do princípio que há 5×10^5 UFC/mL na diluição anterior, continuar com uma diluição de 1:1000 (acrescentando solução salina), obtendo-se 5×10^2 UFC/mL (RABINOVITCH, 2015). Inoculou-se 0,1 mL desta suspensão em um meio ágar próprio para cada microrganismo, onde será observado o aparecimento de cerca de 50 UFC .

Para a **determinação da concentração inibitória mínima (CIM)** para bactérias, realizou-se o **teste de microdiluição** em microplacas para cultura de células, estéreis, descartáveis, com 96 poços (BELUSSO, 2014).

O meio líquido respectivo para cada bactéria é adicionado, sendo 150 µL em cada poço. O óleo da levedura a ser testado foi adicionado à primeira linha de poços da microplaca também na quantidade de 150 µL. Em seguida, realizaram-

se **diluições seriadas do óleo**, sendo que o poço seguinte apresentava a metade da concentração do poço imediatamente anterior (BELUSSO, 2014).

Com o inóculo preparado anteriormente foi adicionado com a ajuda de uma micropipeta, 15 μL da suspensão bacteriana em cada poço da respectiva microplaca, com exceção da fileira onde foi feito o controle da esterilidade do caldo e da solução salina estéril da mesma usada para ajustar o inóculo. Também foi inoculado nos poços do controle de crescimento, contendo meio estéril livre de óleo. As microplacas foram incubadas a 30°C, por 24 horas (BELUSSO, 2014; AFST, tradução pro BrCAST, 2018).

Para verificação da inibição do crescimento bacteriano e melhor visualização foi realizada a adição de **resazurina sódica** 0,01% após o período de 24 horas de incubação, e retornando para incubação por mais 3 horas para obtenção dos resultados. A cor da solução de resazurina é azul, quando a tonalidade no poço muda para um tom avermelhado demonstra a fermentação ocorrida no poço, desse modo o objetivo era obter os poços com **coloração azulada**. Para que o teste seja considerado válido, é necessário que haja crescimento no poço de controle positivo. O experimento foi realizado em duplicata (BELUSSO, 2014).

Para a **determinação da concentração bactericida mínima (CBM)** foram retiradas alíquotas de 10 μL , de forma asséptica, dos poços da microplaca que correspondem a CIM e as 5 concentrações imediatamente anteriores (BELUSSO, 2014).

Em seguida, estas foram semeadas, com auxílio de alças estéreis, pelo método de espalhamento em estrias, na superfície de ágar nutriente estéril contido em placas de Petri devidamente esterilizadas. As placas foram posteriormente incubadas a 30°C por 24 horas, sendo realizada em seguida a contagem das colônias que cresceram sob o meio sólido. Considerou-se como CBM a menor concentração do óleo que ocasionou uma redução no crescimento bacteriano igual ou superior a 99,9% do inóculo inicial (BELUSSO, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes propostos na metodologia não foram possíveis de finalização, visto que ocorreu a suspensão nas atividades acadêmicas, considerando a classificação da COVID-19 (agente viral SARS-CoV-2) como pandemia e os protocolos emitidos pelo Ministério da Saúde e pela Organização Mundial de Saúde, que impediam a aglomeração de pessoas, caso frequentemente observado na utilização dos laboratórios da instituição (UTFPR, 2020).

Na proposta referente da utilização do óleo da *Rodosporidium toruloides* como **agente antimicrobiano**, o qual seria testado em laboratório utilizando a técnica da microdiluição. A busca por um **solvente para o óleo** foi realizada já que possui influência para um adequado resultado da possível propriedade antimicrobiana e análise da inibição do crescimento, deveria se obter no poço da placa uma solução homogênea. Desse modo foi testado a homogeneização do óleo com tween 80, com tween 20 e com polipropilenoglicol.

Foi misturado o óleo com tween 80 e obteve-se um líquido viscoso que quando misturado com água formava uma película em que formava uma mistura

bifásica,, em uma camada ficava a água e no fundo do poço ficava o tween 80 e o óleo, sendo assim não seria adequado para a execução dos testes.

Em seguida, realizou-se a tentativa de mistura com o uso do tween 20 e o óleo, no entanto, característica semelhante ao ocorrido com o óleo e tween 80 foi observada. Então foi realizado uma mistura de polipropilenoglicol com o óleo e a característica apresentada foi de uma melhor homogeneização quando na mistura com água, a solubilização ainda não era a ideal, para obter os resultados mais fiéis, mas já seria possível mensurar a propriedade do óleo como antimicrobiano.

CONCLUSÃO

Devido a circunstância da pandemia, os testes não foram concluídos, dessa forma esperasse que em momento oportuno ocorra a finalização da metodologia apresentada no presente relatório. Visto que a possibilidade da utilização de um óleo de origem biotecnológica como antimicrobiano na indústria pode levar a retornos financeiros e diminuição de problemas com a contaminação de produtos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UTFPR pela oportunidade de realização da Iniciação Científica, a orientação da Prof. Dra. Alessandra me fornecendo a honra de realizar essa pesquisa, mesmo com os percalços presentes em 2020. Agradeço à minha família pelo apoio em todos os momentos e a Deus pela proteção e benção nessa trajetória.

REFERÊNCIAS

AFONSO, VALDEMIRA LOURENÇO. **Abordagens para a acumulação de lípidos e coprodutos de elevado valor pela levedura *Rhodosporidium toruloides***. Orientador: Sara Isabel Cacheira Raposo. 2017. Dissertação (Mestre em Engenharia Biológica) - Universidade do Algarve, 2017. Disponível em: <https://docplayer.com.br/143838405-Universidade-do-algarve.html> Acesso em: 1 jun. 2020.

ALMEIDA, LUCIANA DE. **Gestão da coleção microbiológica de interesse biotecnológico na UTFPR Ponta Grossa**. 2018. Dissertação (Mestre em Engenharia de Produção) – UTFPR, 2018. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3332>. Acesso em: 15 jun. 2020.

BELUSSO, LAÍSA CAROLINE SCHOSSLER. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e associações com conservantes de alimentos**. Orientador: Prof. Dra. Tatiana Shioji Tiunan. Trabalho de conclusão de curso (Tecnólogo em Processos Químicos) - UTFPR, 2014.

BONA, ELIANA ALMEIDA MIRA DE *et al.* **Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014. DOI: 10.1590/1808-1657001192012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aib/v81n3/1808-1657-aib-81-03-00218.pdf>. Acesso em: 2 mar. 2020

BONTURI, N., MATSAKAS L., NILSSON R., CHRISTAKOPOULOS P., ALVES MIRANDA E., ARVID BERGLUND K., ROVA U. **Single cell oil producing yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospordium toruloides*: Selection of extraction strategies and biodiesel property prediction.** Energies 8, 2015,5040–5052.

DOWHAN, W., e BOGDANOV, M. **“Functional roles of lipids in membranes,”** in Encyclopedia of Biophysics, ed G. C. K. Roberts (Berlin; Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 2013, 868–875.

MOTA, VIVIAN ALINE MARIANO *et al.* **O controle da contaminação microbiológica de produtos magistrais.** ReBraM , v. 20, n 1,julho, 2017 p. 35-48.

OCHSENREITHER K, GLÜCK C, STRESSLER T, FISCHER L AND SYLDATK C. **Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils.** Front. Microbiol. 2016, 7:1539.

RABINOVITCH, Leon *et al*, (org.). **COLETÂNEA DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS E METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA O ESTUDO DE *Bacillus* E GÊNEROS ESPORULADOS AERÓBIOS CORRELATOS.** 2015. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/Coletanea%20de%20Procedimentos%20Técnicos%20para%20Bacillus.PDF> . Acesso em: 29 nov. 2019.

RATLEDGE, C. **Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production.** Biochimie 86, 2004, 807–815.

SUBCOMITÊ DE TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS (SUBCOMMITTEE ON ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING -AFST) DO COMITÊ EUROPEU PARA TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (ESCMID, EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING -EUCAST) *et al.* **Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para leveduras.** Tradução por BrCAST, 20 ago. 2018. Disponível em: <http://brcast.org.br/wp-content/uploads/2020/03/TSA-leveduras-E.Def-7.3.1.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2020.

UTFPR. **Covid-19: UTFPR suspende oficialmente calendário acadêmico.** Ordem de Serviço. 30 mar. 2020. Disponível em: <http://portal.utfpr.edu.br/noticias/geral/covid-19/utfpr-suspende-oficialmente->

[calendario-academico-para-graduacao-e-pos-graduacao](#). Acesso em: 18 jun. 2020.