



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ISADORA CERNACH CARNEIRO DA FONTOURA

**SOFOROLIPÍDIOS DE *Candida bombicola*:**  
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES  
ANTIBACTERIANAS CONTRA PATÓGENOS HUMANOS

ISADORA CERNACH CARNEIRO DA FONTOURA

**SOFOROLIPÍDIOS DE *Candida bombicola*:**  
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES  
ANTIBACTERIANAS CONTRA PATÓGENOS HUMANOS

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia  
da Universidade Estadual de Londrina para  
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia  
Pedrine Colabone Celligoi

Coorientadora: Profa Dra. Cristiani Baldo

Londrina  
2018

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

FONTOURA, ISADORA CERNACH CARNEIRO DA FONTOURA.

Soforolipídios de *Candida bombicola* : produção, caracterização e propriedades antibacterianas contra patógenos humanos / ISADORA CERNACH CARNEIRO DA FONTOURA FONTOURA. - Londrina, 2018.

75 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Coorientador: Cristiani Baldo da Rocha.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Glicolipídios - Tese. 2. Biomoléculas - Tese. 3. Agentes antibacterianos - Tese. 4. Biotecnologia microbiana - Tese. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone. II. Rocha, Cristiani Baldo da. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

ISADORA CERNACH CARNEIRO DA FONTOURA

**SOFOROLIPÍDIOS DE *Candida bombicola*:**  
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES  
ANTIBACTERIANAS CONTRA PATÓGENOS HUMANOS

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia  
da Universidade Estadual de Londrina para  
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa Dra. Maria Antonia Pedrine  
Colabone Celigo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Sergio Paulo Dejato da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 08 de março de 2018

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora doutora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, por me transmitir conhecimento, profissionalismo, conselhos e amizade.

À minha coorientadora professora doutora Cristiani Baldo por toda ajuda, conselhos e amizade.

Ao professor doutor Segio Rocha pelo profissionalismo e pela orientação nas análises de atividade antimicrobiana, assim como ao aluno Gustavo por me acompanhar nos experimentos realizados.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pela disponibilidade e atenção.

A professora doutora Nicole Pan pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia por todo aprendizado transmitido.

Ao Ismael Rodrigues pela amizade e ajuda com conhecimentos sobre cromatografia.

Ao técnico de laboratório, Nelson Janeiro Rodriguez, pela dedicação e auxílio durante o desenvolvimento experimental do trabalho

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelas trocas de experiência, conhecimento, e também, preocupações. Em especial à Gabi, Andressa, Melissa, Mayara, Dayane, Juliano, Victória, Nicole, Leandro. Agradeço à companhia no dia a dia, às noites em claro no biorreator, por toda ajuda, paciência, idéias e incentivos.

Aos meus pais, Ana e Eduardo, e meus avós, Doroty e Wanderley, pelas vezes que meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados com vocês. Pelo carinho, apoio e amor em todas as situações.

CERNACH, I. C. F. **Soforolipídios de *Candida bombicola***: produção, caracterização e propriedades antibacterianas contra patógenos humanos. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Os sofrorolipídios são glicolipídios extracelulares que apresentam uma molécula de sofrorose (D-glicopiranosil- $\beta$ -D-glicopiranosose) conectada em sua extremidade redutora a diferentes ácidos graxos, podem ser acídicos ou lactônicos e sua estrutura química influencia nas suas aplicações. Esses compostos são promissores biossurfactante, produzidos pela levedura *Candida bombicola* e possuem diversas aplicações destacando na área da saúde, com agente antimicrobiano. No presente trabalho foram produzidos sofrorolipídios de *C. bombicola* em resíduo lipídico da indústria avícola, esses foram caracterizados e posteriormente aplicados contra as bactérias Gram-negativas *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*; e Gram-positivas *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. A fermentação foi realizada em biorreator de bancada com volume operacional de 4 L do meio de fermentação em ( $\text{g L}^{-1}$ ): 77,5 de glicose, 2,5 de extrato de levedura, e 75 de gordura da indústria de frango, 30°C, aeração 1,0 vvm e agitação de 450 rpm. A produção atingiu  $27,86 \text{ g L}^{-1}$  com produtividade de  $1,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em 120h. Pelas diferentes técnicas analíticas (CCD, CLAE, UHPLC MS/MS), foi possível caracterizar estruturalmente os sofrorolipídios produzidos destacando 73,55 % de formas acídicas com o ácido graxo linoleico (C18:2) monoacetilado, e 26,44 % lactônicos com ácido oleico (C18:1) diacetilado. Quanto a atividade antibacteriana as bactérias submetidas à exposição com sofrorolipídios apresentaram redução de viabilidade, nas doses de 500  $\mu\text{g/ml}$  e 2000  $\mu\text{g/ml}$  para as bactérias Gram positivas e Gram negativas respectivamente.

**Palavras-chave:** Sofrorolipídio. *Candida bombicola* biossurfactante. Propriedades antibacterianas. Resíduo lipídico. Métodos analíticos. UPLC MS/MS. HPLC. Caracterização estrutural.

CERNACH, I. C. F. ***Candida bombicola* sophorolipids**: production, characterization and antibacterial properties against human pathogens. 75 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Sophorolipids are extracellular glycolipids that have a molecule of sophorose (D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranose) connected at their reducing end to different fatty acids, can be acidic and lactonic and their chemical structure influences their applications. They are promising biosurfactants produced by the yeast *Candida bombicola* and have several applications highlighting the area of health, with an antimicrobial agent. In the present work, *C. bombicola* sophorolipids were produced in the lipidic residue of the poultry industry. These were characterized and later applied against Gram-negative bacteria: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*; and Gram-positive: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans*. Fermentation was performed in a bench-fed bioreactor with a 4 L operating volume of the fermentation medium in (g L<sup>-1</sup>): 77.5 glucose, 2.5 yeast extract, and 75 chicken fat, 30 ° C, 1.0 vvm aeration and stirring at 450 rpm. The production reached 27.86 g L<sup>-1</sup> with a productivity of 1.16 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in 120h. By the different analytical techniques (TLC, HPLC, UHPLC MS / MS), it was possible to characterize structurally the sophorolipid produced by highlighting 73,55% of acidic forms with monoacetylated linoleic fatty acid (C18: 2) and 26,44% (C18: 1) diacetylated. Regarding the antibacterial activity, the bacteria submitted to the exposure with sophorolipids had a reduction of viability at the doses of 500  $\mu$ g / ml and 2000  $\mu$ g / ml for Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively.

**Key words:** Sophorolipids. *Candida bombicola* biosurfactant. Antibacterial properties. Lipid residue analytical methods. UPLC MS/MS. HPLC. Structural characterization.

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>10</b> |
| 2.1      | GERAL.....  | 10        |
| 2.2      | ESPECÍFICOS .....   | 10        |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | <b>11</b> |
| 3.1      | SOFOROLÍPIDIOS: ESTRUTURA QUÍMICA E PROPRIEDADES .....                              | 11        |
| 3.1.1    | Biossíntese de Soforolipídios .....   | 13        |
| 3.2      | PRODUÇÃO DE SOFOROLÍPIDIOS .....  | 15        |
| 3.3      | MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO .....   | 19        |
| 3.4      | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SOFOROLÍPIDIOS .....                                    | 20        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>24</b> |
| 4.1      | MATÉRIA PRIMA .....   | 24        |
| 4.2      | MICROORGANISMOS E MEIOS DE PRESERVAÇÃO.....   | 24        |
| 4.2.1    | Produção de Soforolipídios .....  | 24        |
| 4.2.2    | Atividade Antimicrobiana.....   | 24        |
| 4.3      | PRODUÇÃO DE SOFOROLÍPIDIOS .....  | 25        |
| 4.3.1    | Inóculo e Meio de Fermentação.....  | 25        |
| 4.3.2    | Fermentação em Biorreator de Bancada.....   | 25        |
| 4.4      | DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS .....   | 25        |
| 4.4.1    | Quantificação de Biomassa .....   | 25        |
| 4.4.2    | Quantificação dos Soforolipídios, Açúcares e Gorduras Residuais .....               | 26        |
| 4.5      | CARACTERIZAÇÃO DE SOFOROLÍPIDIOS .....  | 26        |
| 4.5.1    | Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....   | 27        |
| 4.5.2    | Análise de Soforolipídios por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ..... | 27        |
| 4.5.3    | Ultra Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas (UHPLC-MS/MS).....   | 27        |
| 4.6      | ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....  | 28        |
| 4.6.1    | Microdiluição em Caldo.....   | 28        |
| 4.6.2    | Difusão em Ágar .....   | 29        |
| 4.7      | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 29        |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 30 |
| 5.1      | Artigo 1: Atividade antibacteriana de soforolipídios de <i>Candida bombicola</i> contra patógenos humanos.....   | 30 |
| 5.2      | Artigo 2: Caracterização e identificação dos soforolipídios produzidos por <i>Candida bombicola</i> em resíduo lipídico da indústria avícola por UHPLC-MS/MS ..... | 50 |
| 5.3      | Patente: Processo de utilização da gordura residual da indústria de frango para a produção de Soforolipídios.....  | 68 |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 69 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 70 |

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, uma das principais causas da mortalidade em todo o mundo são infecções bacterianas, que ocorrem devido ao grande número de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais. Por essa razão, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a resistência aos antibióticos como uma ameaça global à saúde pública. Desse modo, houve um aumento da busca por novas moléculas antimicrobianas que possam ser utilizadas no tratamento e prevenção das infecções. A procura por novas substâncias deve acompanhar o desenvolvimento de agentes patogênicos resistentes que possam ser efetivamente capazes de substituir os antibióticos convencionais. Dentre essas moléculas, os soforolipídios surgem como alternativa uma vez que apresentam boa capacidade de atuar como surfactante e por possuir atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-HIV, atraindo o interesse da área da saúde. Além disso, os soforolipídios podem ser produzidos por microrganismos destacando a *Candida bombicola*, essa levedura apresenta alta produção e ausência de patogenicidade, sendo reconhecida como segura para saúde humana (GRAS).

Os soforolipídios são glicolipídios extracelulares que apresentam uma molécula de soforose ( $\text{D-glicopiranosil } \alpha(2-1) \beta\text{-D-glicopiranosose}$ ) conectada em sua extremidade redutora a um ácido graxo. Este ácido graxo pode ser desacetilado, mono, ou diacetilado na posição 6' e/ou 6" da soforose. Apresentam duas formas distintas, a acídica e lactônica, com diferentes graus de acetilação, comprimentos da cadeia do ácido graxo, saturações e posição de hidroxilação.

A forma estrutural dessas moléculas define suas propriedades físico-químicas e sua futura aplicação. Dependendo do tipo de interação e da forma do ordenamento das moléculas, os soforolipídios apresentam diversas propriedades como: emulsificante, lubrificante, formação de micelas, detergência, dispensabilidade, molhabilidade e formação de espuma. Apresentam vantagens quando comparados aos surfactantes químicos tais como baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental e atividade específica em condições extremas de temperatura, pH e salinidade

Uma vez que os soforolipídios apresentam grande interesse na área da saúde, a melhoria dos processos de produção deve ser intensificada, direcionando para moléculas com estrutura desejada e que tenha uma grande atividade antimicrobiana.

Além disso para dar sustentabilidade ao processo, que ainda é muito oneroso, o uso de resíduos da indústria avícola contribui para torna-los economicamente mais viáveis.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Produzir e caracterizar sofrorolipídios de *Candida bombicola* (ATCC® 22214™) e avaliar seu efeito antimicrobiano contra principais patógenos da área médica.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir sofrorolipídios por *C. bombicola* utilizando como fonte hidrofóbica a gordura residual da indústria avícola em biorreator;
- Acompanhar o processo fermentativo, o consumo de gordura e glicose, crescimento microbiano e produção de sofrorolipídio por 120 horas de fermentação em biorreator;
- Extrair, quantificar e caracterizar os sofrorolipídios por técnicas gravimétricas e cromatográficas;
- Identificar e caracterizar estruturalmente os sofrorolipídios por técnicas analíticas combinadas de CCD, CLAE e UHPLC-MS/MS.
- Testar a capacidade dos sofrorolipídios como agente antimicrobiano em bactérias Gram positivas e Gram negativas *in vitro*;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

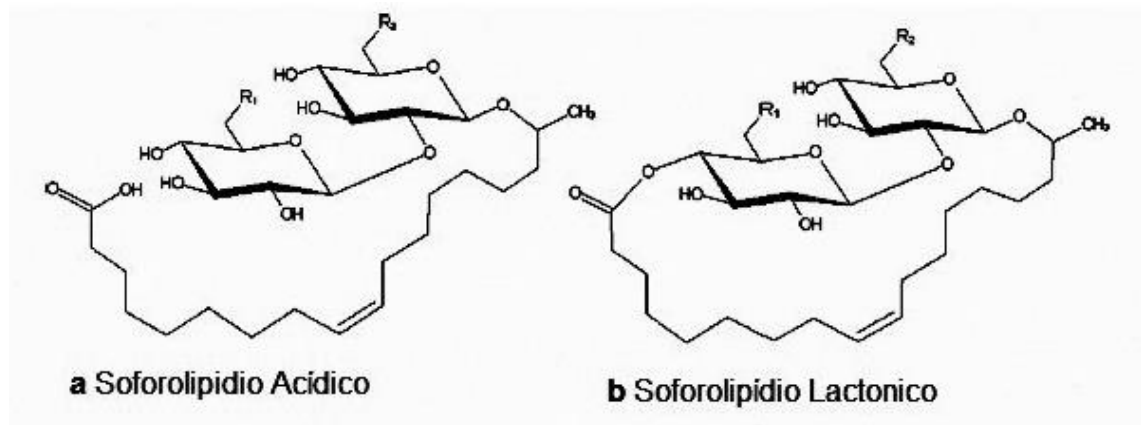
#### 3.1 SOFOROLIPÍDIOS: ESTRUTURA QUÍMICA E PROPRIEDADES

Metabólitos secundários são produzidos por microrganismos e denotam uma diversidade, muito grande de moléculas com aplicações variadas (BANAT et al.,2010). Dentre elas, encontram-se os biossurfactantes, que são surfactantes naturais produzidos principalmente por microrganismos como por exemplo bactérias, leveduras e fungos (MARCHANT; BANAT, 2012).

São classificados em dois grandes grupos, de acordo com sua composição química e origem microbiana: biossurfactantes de baixo peso molecular (glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros) e de alto peso molecular (biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados) (DESAI; BANAT, 1997; KAUR SEKHON; KHANNA; CAMEOTRA, 2012). As suas propriedades surfactantes e/ou emulsificantes são determinados pela localização, tamanho e polaridade dos grupos funcionais que compõem a molécula. Assim as aplicações práticas dos biossurfactantes são totalmente dependentes da sua estrutura química. (BRUMANO; SOLER; SILVA, 2016).

Dentre o grupo dos glicolipídios destacam-se os sofrorolipídios, que possuem um dissacarídeo, sofrorose (fração polar) ligados por ligação  $\beta$ -glicosídica a uma longa cadeia de ácido graxo (fração apolar). A sofrorose ( $\alpha$ -D-glicopiranosil (2-1)  $\beta$ -D-glicopiranosose) está conectada em sua extremidade redutora a um ácido graxo C16 (palmítico) ou C18 (esteárico). Os sofrorolipídios naturais podem ser desacetilados, mono, ou diacetilados na posição 6' e / ou 6'' da sofrorose. Apresentam-se nas formas acídicas e nas lactônicas e grupamento carboxila do ácido graxo pode estar esterificado a sofrorose nos carbonos C4'', C6' ou C6'' (esterificação no C4'' é mais frequente) ou a forma acídica (onde o grupamento carboxila do ácido graxo encontra-se livre), essas características que definem as suas propriedades físico-químicas (Figura 1) (ASMER et al., 1988; CIESIELSKA et al.,2014).

**Figura 1** - Estrutura de sofrorolípido ácido (a) e lactônico (b).



**Fonte:** Ciesilska et al., 2016

A variedade das estruturas dos sofrorolípídios permite uma amplitude de suas propriedades. Dependendo do tipo de interação e da forma do ordenamento das moléculas, os surfactantes apresentam diversas propriedades como: emulsificante, lubrificante, formação de micelas, detergência, dispensabilidade, molhabilidade e formação de espuma.

Koh, Linhardt e Gross (2016) descrevem sobre a importância de avaliar a propriedade micelar crítica de sofrorolípídios. Os sofrorolípídios de *Candida bombicola* apresentaram capacidade de diminuir a tensão superficial da água de 72.80 mN/m para 40-30 mN/m, com concentração micelar crítica (CMC) de 11 a 250 mg L<sup>-1</sup>. Demonstrando com esses valores eficácia com relação as aplicações como emulsificante e estabilizante de soluções (DEVELTER; LAURYSEEN, 2010).

Além das propriedades descritas a sua baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, maior eficácia de atuação em diferentes condições ambientais (pH, temperatura e alta força iônica) além da biocompatibilidade, são algumas das vantagens desses biossurfactantes quando comparados aos sintéticos (FAKRUDDIN et al., 2012). Essas moléculas também possuem propriedades anti-adesiva e biocidas, que podem despertar o interesse como antimicrobianos, prevenindo a contaminação microbiana (CORTÉZ-SÁNCHEZ; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ; JAMILLO-FLORES, 2013). Pesquisas com sofrorolípídios mostram que em alguns casos as suas diferentes formas podem ter aplicações diferentes em relação a outra. Os sofrorolípídios ácidos, por exemplo, tem sido descritos em tratamentos terapêuticos para fibrinólise, cicatrização de feridas, descamação, despigmentação e

ativação de macrófagos (CIESIELSKA et al., 2016). E a forma lactônica dos soforolipídios apresentou-se mais ativo em relação às atividades antimicrobiana, anti-câncer e também foi aplicada em cosméticos, como componente de desodorantes e hidratantes, e também no tratamento de doenças da pele (GROSS et al., 1999; SCHOLZ et al., 1998).

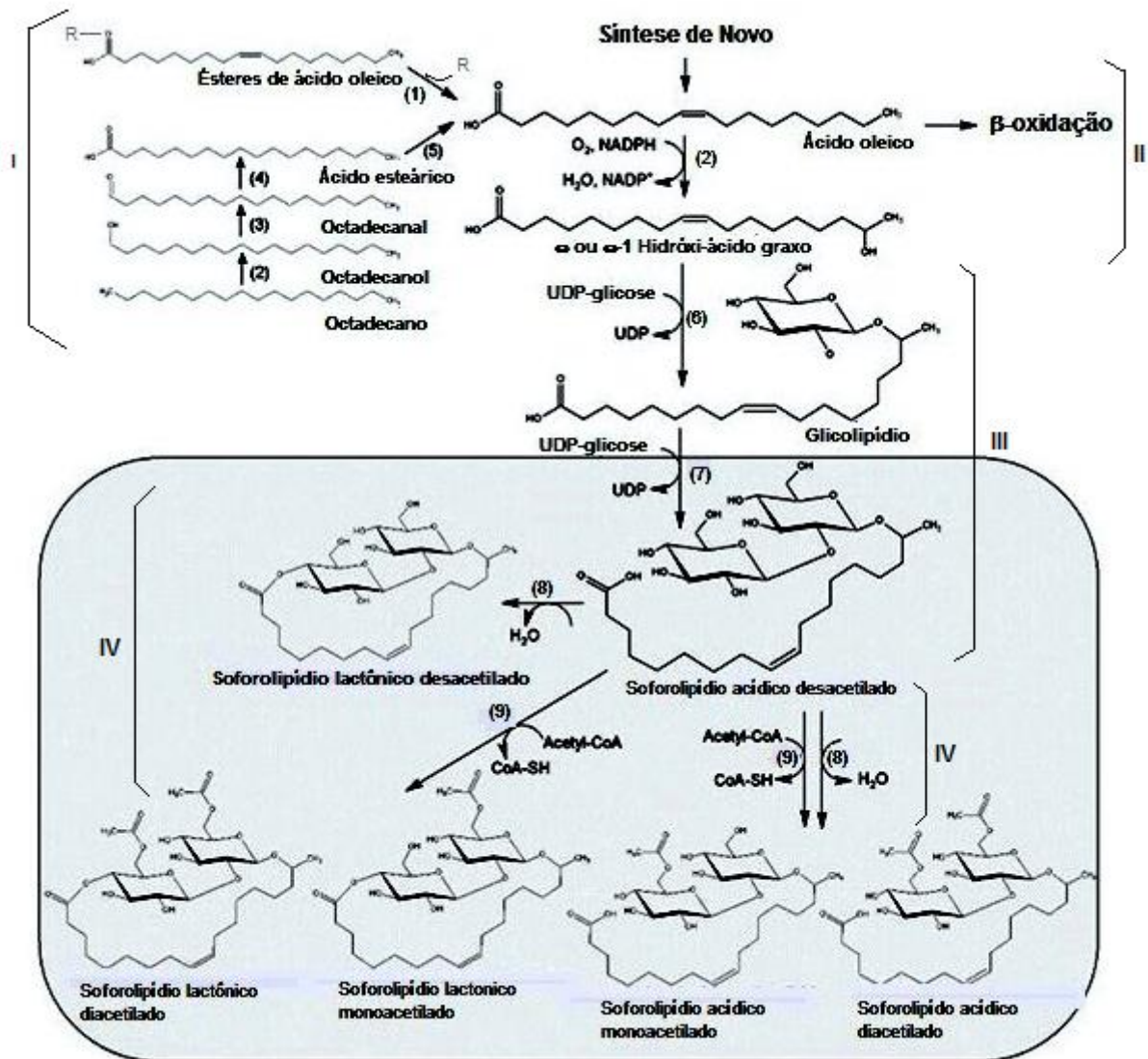
### 3.1.1 Biossíntese de Soforolipídios

Os soforolipídios são sintetizados durante a fase estacionária de maneira dissociada ao crescimento celular, e ocorrem na presença de um substrato hidrofílico como a glicose, e um lipofílico como por exemplo alcanos, ésteres, álcoois, aldeídos e ácidos graxos. Porém, na ausência da fonte hidrofóbica no meio de fermentação, os soforolipídios podem ser formados pela via de síntese de Novo, a partir de acetil-CoA derivado da glicólise. (DAVILA; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1992; CAVALERO; COOPER, 2003; VAN BOGAERT et al., 2007).

Em baixas concentrações de glicose, parte dos ácidos graxos serão conduzidos para a via de  $\beta$ -oxidação para manutenção celular em vez da síntese de soforolipídios (VAN BOGAERT et al., 2007).

A biossíntese de soforolipídios ocorre a partir de várias etapas descritas na Figura 2. Na etapa I, a fonte lipídica pode ser o ácido graxo livre ou vindo de um triacilgliceról que precisa ser degradado pelas lipases liberando os ácidos graxos. A síntese pode ocorrer também a partir de alcanos que são oxidados, por enzimas específicas, ao ácido graxo esteárico, representadas pelas enzimas 2,3,4. Esses ácidos graxos geram o ácido oleico (Figura 2). (COOPER; PADDOCK, 1984; VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

**Figura 2 – Via biossintética de sofrorolipídios**



**Fonte:** Adaptado de Van Bogaert, Zang e Soetaert (2011)

(1) lipase, (2) monooxigenase do citocromo P450, (3) álcool-desidrogenase, (4) aldeído-desidrogenase, (5) dessaturase, (6) glicosiltransferase I, (7) glicosiltransferase II, (8) lactonesterase, (9) acetiltransferase.

Na etapa II o ácido graxo oleico poderá sofrer β-oxidação ou a hidroxilação, resultado em uma cadeia de ácido graxo hidroxilado, com o mesmo comprimento de cadeia. (CAVALERO; COOPER, 2003; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011). Ocorre a conversão do ácido oleico em hidroxilado, através da enzima citocromo P450 mono-oxigenase, NADPH dependente, ligada a membrana celular. Os ácidos graxos são hidroxilados no carbono terminal ( $\omega$ ) ou subterminal ( $\omega-1$ ), que podem atuar como precursor para síntese de sofrorolipídios (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

Na etapa III, duas moléculas de glicose ativadas por UDP são adicionadas através das enzimas, glicosiltransferase I que acopla a glicose na posição C1' ao grupamento hidroxila  $\omega$  ou  $\omega-1$  do ácido graxo e a segunda glicose pela glicosiltransferase II na posição C2' (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). Hommel et al. 1994 através de seus experimentos elucidaram o processo de degradação da glicose, esta é metabolizada pela via glicolítica. Portanto, a glicose utilizada no processo pode ser derivada da gliconeogênese, pois passa a ser adicionada nos soforolipídios.

Por fim, na etapa IV as moléculas de soforolipídios ácidos não acetilados são obtidas. Segundo Van Bogaert et al. (2011) a modificação e as variações estruturais ocorrem posteriormente as reações de acetilação e lactonização. A enzima lactona estearase é que cataliza essa reação de lactonização (8 e 9) (CIESIELSKA et al., 2016).

### 3.2 PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS

A produção de soforolipídios depende da cepa produtora, condições de cultivo, componentes do meio, entre outros fatores. A *C. bombicola*, que possui como fase teleomórfica a espécie *Starmerella bombicola*, se destaca como produtora de soforolipídios com alto rendimento, ausência de patogenicidade devido a sua incapacidade de colonizar tecidos. Portanto, é utilizada na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética. Essa levedura é considerada segura para saúde humana (GRAS) e não utiliza o códon alternativo de tradução CUG (gerando serina ao invés de leucina) diferente das espécies de *Candida*, algumas patogênicas. (SUGITA; NAKASE, 1999; VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

O principal fator descrito que influência na produção de soforolipídios é a composição da fonte hidrofóbica e hidrofílica do meio de cultivo, o que pode ser verificado pela importância dessas fontes na via de síntese (Figura 2). Fontes alternativas também podem ser utilizadas para aumentar a produção reduzindo custos.

Liu et al. (2016) citam em seu trabalho que a glicose e o ácido oleico são os principais substratos usados para a produção de soforolipídios, porém os autores tiveram um foco principal de explorar recursos celulolíticos para a produção.

Os autores testaram um substrato lignocelulósico (palha de arroz) para produzir soforolípídios com *Wickerhamiella domercqiae* variando o inóculo em 1, 2, 4%, a concentração de extrato de levedura em 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 g L<sup>-1</sup> e reguladores de pH (NaOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaO, AlCl<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>). O meio de fermentação foi composto por 60 mL/L (v/v) de ácido oleico, 60 g L<sup>-1</sup> hidrolisado de palha de arroz, 3 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 1 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O e 0,05 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O. As condições ideais foram com 2% de inóculo e 0,15% de extrato de levedura atingindo um rendimento 53,70 g L<sup>-1</sup> de soforolípídios. Os resultados demonstraram o potencial do resíduo lignocelulósico pré-tratado como produtor de soforolípídios.

Outros subprodutos agroindustriais tem sido descritos para a produção de soforolípídios como, soro de leite (OTTO et al., 1999), melaço de soja (SOLAIMAN et al. 2004, 2007), mel (PEKIN et al., 2005), amido de mandioca (THANIYAVARN et al., 2008), melaço de cana-de-açúcar (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009; TAKAHASHI et al., 2011), água doce (14,4% glicerol e água) (WADEKAR et al., 2012), glicerol (BHANGALE et al., 2014).

Banghale et al. (2014) utilizaram o óleo de mamona, para produção de soforolípídios por *S. bombicola*, o meio foi composto por 10% de óleo de mamona e 10% de glicose ou glicerina a 30 ° C, 210 rpm por 200 horas. Os rendimentos foram de 6,1 g L<sup>-1</sup> e 2,7 g L<sup>-1</sup> de sofolípídios C18:1 diacetilado e C18:0 monoacetilado em glicose ou glicerina respectivamente. Os resultados sugeriram que o uso de fontes não convencionais pode dar origem a novos tipos de soforolípídios, contribuindo para expansão de suas aplicações em áreas distintas.

Em um outro estudo o hidrolisado de milho com pré tratado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ao invés de carvão ativo, foi testado para a produção de soforolípídios por *S. bombicola*. Os melhores rendimentos e produtividade foram 49,2 g L<sup>-1</sup> e 12,3 g/L/ dia. Esse método foi descrito como uma alternativa de produção ecológica utilizando hidrolisado de milho pré tratado, sem usar caro carvão ativo. (KONISHI; YOSHIDA; HORIUCHI, 2015).

Minucelli et al. (2017) avaliaram a produção de soforolípídios por *C. bombicola* ATCC 22214 em diferentes fontes hidrofílicas: melaço e caldo de cana-de-açúcar, sacarose e glicose e como fonte hidrofóbica gordura residual da indústria de frango ou óleo de girassol. A produção de soforolípídios foi de 39,81 g L<sup>-1</sup> na condição

otimizada de 75 g L<sup>-1</sup> de gordura de frango, 77,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, 2,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura sem ureia a 30 °C, 150 rpm durante 120 h.

Hoa et al. (2017) produziram sofrorolipídios por *C. bombicola* em melaço de cana-de-açúcar e óleo de coco a 10 %, em 25 ° C, pH 6, com 7 dias de cultivo a 180 rpm. Os resultados encontrados foram com um rendimento máximo de 10 g L<sup>-1</sup> em 7 dias. Os autores sugerem que o melaço e o óleo de coco podem ser utilizados para a produção de sofrorolipídios reduzindo custos.

Shah et al. (2017) avaliaram a produção e as propriedades dos sofrorolipídios produzidos por *S. bombicola* no óleo de palma e comparando com óleos brutos de Tapis, Ratawi e Melita. Neste estudo, os óleos de Tapis e Ratawi foram selecionados pois estão disponíveis no local em derrames de petróleo na Malásia, e o óleo de Melita por ser um óleo essencial que contém ácidos graxos saturados. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyers (50 mL) contendo: 100 g L<sup>-1</sup> dos diferentes substratos hidrofóbico, 100 g L<sup>-1</sup> de glicose, 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 1 g L<sup>-1</sup> de ureia, incubados a 30 °C a 180 rpm por 120 h. A produção de sofrorolipídios foi de 32 g L<sup>-1</sup>, 26 g L<sup>-1</sup>, 21 g L<sup>-1</sup> e 19 g L<sup>-1</sup> nos óleos de palma, tapis, melita e ratawi, respectivamente.

Liu et al. (2016) relataram que a produção pode se tornar mais promissora com adequações do meio de cultura em biorreatores que permite um aumento de volume, controle do fluxo de ar e concentração de oxigênio dissolvido durante o processo de fermentação. Esses parâmetros influenciam no desenvolvimento do microrganismo e conseqüentemente a produção da molécula de interesse.

Solaiman et al. (2015) avaliaram a produção de sofrorolipídios por *Rhodotorula bogoriensis* em biorreator, para verificar a atividade antimicrobiana. Os autores realizaram duas fermentações, inicialmente em frascos de Erlenmeyers para avaliar o consumo de glicose e posteriormente em biorreator. O meio foi composto por 40 g L<sup>-1</sup> de glicose e 2 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e as condições foram 25 °C, 500 rpm e aeração de 1,5 L.min<sup>-1</sup> por duas semanas. A fermentação apresentou rendimento de 51 g L<sup>-1</sup> e a identificação do sofrorolipídio com ácido graxo de 22 carbonos. Também descrevem que o consumo de glicose ocorre concomitantemente com a desacetilação do sofrorolipídios. Os testes de atividade antimicrobiana apresentaram resultados positivos, demonstrando ser um bom agente antimicrobiano.

Tendo em vista a importância da utilização de biorreatores, Jia et al. (2016) realizaram estudos para avaliar a simulação dinâmica de fluidos dos computadores

em um biorreator de placa de peneira dupla na produção de soforolipídios. O meio era composto por 120 g L<sup>-1</sup> de glicose, 120 g L<sup>-1</sup> de ácido oleico, 3,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e entre outros componentes, pH foi mantido em 3,5 a 4,0 após 20 horas de cultivo, 450 rpm, 30 °C por 320 horas. Esse meio foi suplementado com 200 g L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 2 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO. O rendimento de soforolipídios foi significativamente melhorado de 120 g L<sup>-1</sup> e 1,25 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 96 horas em biorreator convencional comparado ao novo biorreator que atingiu 484 g L<sup>-1</sup> e 1,51 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 320 horas. Os resultados indicaram que o melhoramento dos parâmetros operacionais e do design do biorreator podem maximizar a produção.

Soforolipídios foram produzidos por *S. bombicola* em biorreator e posteriormente modificados, soforolipídios com óxidos de amina. A produção foi de 199 g L<sup>-1</sup> com uma produtividade de 0,9 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> no meio com ácido oleico e extrato de levedura por 220 horas, 25°C em 350 rpm e pH mantido em 3,5. Essas modificações resultam em uma classe inovadora, os soforolipídios óxidos de amina, que não podem ser produzidos enzimaticamente, com potencial para aplicações de alto valor (DELBEKE et al., 2016).

A produção de um biossurfactante por *C. lipolytica* em biorreator com meio a base de gordura animal foi avaliada, o meio continha 5% de gordura animal e 2,5% de licor de milho com pH controlado a 5,3, 28 ° C a 200 rpm. A gordura animal era composta pelos seguintes ácidos graxos: esteárico (43,41%), palmítico (26,40%), oleico (24,16%) e mirístico (6,03%). A maior produção foi de 40 g L<sup>-1</sup>, mostrando que podem ser produzidos através de materiais de baixo custo e tem grande potencial para ser aplicado como agente de biorremediação para limpeza de derrames de óleo (SANTOS et al., 2016).

Dolman et al. (2016) produziram soforolipídios por *C. bombicola* e testaram um novo método de separação por gravidade. O processo fermentativo ocorreu em biorreator na presença de 100 g L<sup>-1</sup> de glicose, 50 g L<sup>-1</sup> de óleo de canola a 25°C, aeração de 1L min<sup>-1</sup> e o pH controlado em 3,5. A maior produção de soforolipídios foi de 623 g L<sup>-1</sup> em 1.023 horas e os soforolipídios produzidos foram caracterizados como ácido diacetilado e lactônico diacetilado ambos com o ácido oleico (C18:1).

### 3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

As técnicas de separação e purificação dos sofrorolipídios são informações de grande importância para se conhecer a estrutura do composto produzido.

Para que haja a análise estrutural dessas moléculas é importante que algumas etapas façam parte do procedimento experimental. Inicialmente as moléculas devem ser extraídas do meio de cultura, seguido de uma detecção e quantificação; posteriormente purificação e separação para que por fim haja a análise estrutural do produto (SMYTH, 2014). Essas etapas permitem uma combinação de variadas técnicas que garantem resultados mais precisos.

Desse modo, Konishi et al., 2015 avaliaram a eficiência de produção sofrorolipídios por *S. bombicola* e utilizaram os solventes acetato de etila e hexano para extrair os sofrorolipídios. As técnicas utilizadas para identificação da molécula foram cromatografia de camada fina (CCD), espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser (MALDI- TOF/MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). Os autores observaram um maior ion  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  712, indicando que o principal produto pertence a forma lactônica de di-O-acetil sofrorolipídios, isto é, 6', 6''-di-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosil-2-O- $\beta$ -D-glicopiranosiloxi-octadecenoico.

Ribeiro et al. (2016) produziram sofrorolipídios com objetivo de isola-los do meio de fermentação e realizar estudos de sorção utilizando microplacas. O solvente utilizado para extração foi acetato de etila e metanol (1:1 v/v), com adição de sulfato de sódio (desidratação). Para identificação do sofrorolipídio utilizaram um método colorimétrico (método de antrona), e posteriormente descreveram a estrutura por técnicas combinadas de cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC MS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massa de ionização por eletropray (CLAE / ESI-MS / MS). A partir dessa técnica identificaram sofrorolipídios incluindo insaturados e monoinsaturados com C16 e C18 hidroxiliados com uma sofrorse diacetilada.

Liu et al. (2016) utilizaram os solventes n-butanol, etanol e clorofórmio (10:10:1 v/v/v) para a extração dos sofrorolipídios produzidos por *W. domercqiae* em palha de arroz hidrolisado e para a identificação o foi utilizado o método de antrona.

Solaiman et al. (2016) produziram sofrorolipídios e testaram sua atividade antimicrobiana, esses foram extraídos com acetato de etila, seguido de uma filtração e posteriormente lavados com hexano. As técnicas de identificação utilizadas foram: cromatografia de camada fina (CCD) e cromatografia líquida acoplada a

espectrometria de massa (LCMS). Os autores identificaram sofrorolipídios com três tipos de ácidos graxos palmítico, oleico e esteárico.

Os sofrorolipídios de *C. bombicola* produzidos em melaço de cana de açúcar e óleo de coco foram extraídas por hexano e acetato de etila e depois submetidos à análises de cromatografia de camada fina (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), os autores puderam identificar através da CCD a presença 1',4"-Soforolactona 6',6"- diacetilado e muitas formas diferentes de sofrorolipídios. A amostra de sofrorolipídios foi analisada indicando a presença de sofrorolipídio lactônico desacetilado e diacetilado com C18: 1 e C18: 2 (HOA et al., 2017).

### 3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SOFOROLIPÍDIOS

Os sofrorolipídios apresentam diversas aplicações, porém sua característica mais reconhecida é a sua capacidade para atuar como um surfactante. Atualmente são amplamente aplicados em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e indústrias de limpeza. Contudo, essas moléculas têm atraído atenção para aplicação na área biomédica e da saúde, quando foram identificadas com atividades anti-inflamatória, anti-HIV e antimicrobiana alargando suas aplicações na indústria farmacêutica (SHAH et al., 2005).

A atividade antimicrobiana dos sofrorolipídios tornou-se interessante para a época atual, pois há um aumento da busca por novas moléculas antimicrobianas, que acompanhe a quantidade de patógenos que aparecem incessantemente e não são efetivamente susceptíveis a antibióticos convencionais (SHARMA et al, 2016). Essa atividade depende de muitos fatores destacando principalmente as formas acídicas e lactônicas, o microrganismo produtor o patógeno empregado, o tempo de exposição e a concentração do sofrorolipídio (ZHANG et al.,2017).

A patente dos autores Gross e Shah, (2005) refere-se à concentração inibitória mínima dos sofrorolipídios contra a diferentes espécies de *Candida*: *Candida albicans*, *C. antártica* e *C. tropicalis*. Sendo 30%, 32%, 25% respectivamente, a porcentagem de inibição na presença de sofrorolipídios a 5 mg ml<sup>-1</sup>, mostrando o efeito antimicrobiano do sofrorolipídio.

Shah, Badia e Ratsep (2007) avaliaram o a atividade antimicrobiana de sofrorolipídios produzidos por *C. bombicola* a partir de diferentes açúcares (glicose, frutose, xilose, ribose, lactose, manose, arabinose e galactose). As atividades

antibacterianas indicaram que os sofrorolipídios foram mais eficazes para bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. O sofrorolipídio produzido em meio contendo glicose apresentou valores de dose letal mínima (MLD): *Rhodococcus erythropolis* (0,098 mg / ml), *Bacillus subtilis* (0,098 mg / ml), *Staphylococcus epidermidis* (>6,25 mg / ml), *Streptococcus agalactiae* (0,098 mg / ml), *Moracella* sp. (0,098 mg / ml), *Pseudomonas putida* (>6,25 mg / ml), *Enterobacter aerogenes* (>6,25 mg / ml) e *Escherichia coli* (>6,25 mg / ml).

Sofrorolipídio etil éster diacetato produzido por leveduras foi testado pelo método de microdiluição de caldo, nas concentrações de 0,5 a 512  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *K. pneumoniae* ATCC 35657, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 e *Proteus mirabilis* ATCC 35659. Para todos os microrganismos o resultado de concentração inibitória mínima foi maior que 128  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Porém os derivados sofrorolipídios testados não mostraram atividade antibacteriana significativa *in vitro*, quando testados em concentrações clinicamente relevantes, mas podem ser utilizados como agentes anti-inflamatórios ou imunomoduladores sem afetar a flora bacteriana do hospedeiro (SLEIMAN et al.,2009).

*Propionibacterium acnes* é a bactéria Gram-positiva mais comum causadora de acne, uma pesquisa foi realizada para identificar uma possível atividade antimicrobiana de sofrorolipídios contra esse microrganismo. Diferentes matrizes de biopolímeros foram usadas para produzir filmes com adição de sofrorolipídios e a atividade antimicrobiana foi determinada através da técnica de disco-difusão e indicou aparecimento de halo na concentração de 0,24% de sofrorolipídios contra *P. acnes*. A forma lactônica dos sofrorolipídios exibiu a melhor ação antimicrobiana e quando em conjunto com os biopolímeros de pectina ou alginato, proporcionou um meio comparativamente transparente e bem-sucedido de utilizar esse glicolipídio, como uma solução anti-acne renovável e ambientalmente benigna. (ASHBY et al.,2011).

Sofrorolipídios produzidos por *C. bombicola* a partir de glicose e álcool láurico também foram utilizados em testes de atividade antimicrobiana em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A inibição completa do crescimento nas Gram-positivas *S. aureus* ATCC 6358 e *B. subtilis* ATCC 6633 foi de 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente em 4 h. Nas Gram-negativas *E. coli* ATCC 8739 e *P. aeruginosa*

ATCC 9027 foi a  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  nos tempos de 2 e 4 h, respectivamente (DENGLE-PULATE et al., 2013).

Dengle-Pulate et al. (2014) testaram o efeito antimicrobiano dos sofrorolipídios produzidos em glicose e álcool láurico, para a limpeza de frutas e vegetais. As frutas e vegetais foram pulverizadas, com a formulação para verificar o efeito sobre a vida útil dos vegetais. O tratamento com sofrorolipídios como germicida resultou em mais de 90 % de redução das células de *Salmonella typhimurium* ATCC 23564 e mais de 99 % em *E. coli* ATCC 8739 após 10 minutos. *Erwinia chrysanthemi* ATCC 11663 e *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 foram reduzidas totalmente após 10 minutos. Estes resultados confirmaram o efeito germicida desse glicolipídio.

A atividade antimicrobiana de sofrorolipídios de *C. bombicola* produzidos a partir de óleo de coco foi testada em *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados mostraram que os sofrorolipídios apresentaram uma inibição semelhante ao produzido em óleo de milho a 0,05 % e em *S. aureus* foi melhor em óleo de coco do que a já descrita pelos autores em óleo de milho (MORYA et al., 2013).

Pesquisadores avaliaram a atividade antimicrobiana e obtiveram os valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) contra o *P. acnes* com o sofrorolipídio C22 produzido por *R. bogoriensis*, comparado ao sofrorolipídios C18 de *C. bombicola*. A atividade antimicrobiana de C22 de *R. bogoriensis* foi mais eficiente do que a C18 de *C. bombicola* (SOLAIMAN; ASHBY; CROCKER, 2015).

Díaz de Rienzo et al. (2015) testaram as propriedades antibacterianas e antibiofilme do sofrorolipídio em diferentes concentrações em biofilmes. Os autores verificaram que em *Cupriavidus necator* ATCC 17699 (Gram-negativa) e *Bacillus subtilis* BBK006 (Gram-positiva), a concentração de 5 % (v/v) teve efeito bactericida. Além disso, foi possível identificar por microscopia de varredura, o rompimento de biofilmes formados com culturas simples e misturas de *B. subtilis* BBK006 e *S. aureus* ATCC 9144. Os autores concluíram que os sofrorolipídios podem ser compostos promissores para uso como adjuvantes com outros antimicrobianos, contra alguns agentes patogênicos, através da inibição de crescimento e/ ou o rompimento do biofilme.

Solaiman et al. (2016) estudaram a substituição de agentes convencionais preservadores de couros e peles (sal, ácido bórico e agentes antibacterianos sintéticos) por sofrorolipídios. A contaminação ocorre por várias bactérias Gram-positivas (*Bacillus Licheniformis*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *Enterococcus faecium*,

*Aerococcus viridans*, *Staphylococcus xylosus*, *S. cohnii* e *S. equorum*), bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas luteola*, *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii* e *Vibrio fluvialis*). Desse modo, a inibição determinada por CIM da mistura de sofrorolipídios palmítico, esteárico e oléico contra isolados de pele foi de  $19,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , o CIM dos sofrorolipídios separados apresentaram diferentes valores e o palmítico isoladamente não demonstrou atividade. Em conclusão os sofrorolipídios palmítico, esteárico e oleico inibiram o crescimento de 12 bactérias ocultas e cultura mista, e têm atividade de amplo espectro. Os resultados obtidos no presente estudo podem ser valiosos para o desenvolvimento desses sofrorolipídios como surfactantes antimicrobianos nos processos de preservação e imersão de peles.

As propriedades antimicrobianas de sofrorolipídios modificados e imobilizados em ouro foram testados contra *Listeria ivanovii*. Os autores também enfatizam amplo espectro de atividade desses revestimentos, demonstrando seu potencial contra cepas Gram-positivas (*E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*) e Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*). A viabilidade foi de 70 % contra as Gram negativas e de 55 a 75 % contra as Gram positivas, sugerindo que o modo de ação do sofrorolipídio pode ser ligado à composição específica da membrana externa de algumas cepas de bactérias (VALLOTEAU et al., 2017).

Zhang et al. (2017) sintetizaram sofrorolipídios a partir de glicose e ácido palmítico, esteárico ou oleico por *S. bombicola*. As formas lactônicas e acídicas dos três tipos de sofrorolipídios foram testadas nas concentrações de 0,1 %, 0,5 % e 1,0 % contra 5 cepas de *E. coli*. Em minutos de tratamento não houve diferença significativa na atividade antimicrobiana entre os sofrorolipídios, mas em períodos de 1 a 2 horas, os lactônicos foram mais eficazes destacando os que apresentam esteárico e oleico. As cinco cepas de *E. coli* apresentaram diferentes susceptibilidades para os tipos sofrorolipídios testados. A análise usando a amplificação de PCR de monoazida de etídio demonstrou que as bactérias inativadas por sofrorolipídios foram por danos na membrana celular. Em geral, os resultados indicam que o efeito de sofrorolipídios em *E. coli* patogênica depende de vários fatores (concentração, tempo de tratamento e tipo de sofrorolipídios), além disso sugerem que os sofrorolipídios associados a baixos níveis de etanol têm o potencial de inativar *E. coli* patogênica. No entanto, os dados não confirmam as diferenças entre os lactônicos e acídicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATÉRIA PRIMA

O tecido adiposo de frango foi cedido pela indústria frigorífica Big Frango localizada em Rolândia – Paraná. A gordura foi extraída do tecido adiposo por trituração em liquidificador industrial, seguido por aquecimento entre 80° a 90°C, e a gordura liquefeita foi filtrada vácuo (Whatman, nº1) por 2 vezes e posteriormente centrifugada a 9956 g x 15 min. Os resíduos sólidos foram descartados e a gordura obtida armazenada a 4 °C (Patente nº BR 10 2017 012044 9). Essa gordura foi caracterizada por Minucelli et al. 2017.

### 4.2 MICRORGANISMOS E MEIOS DE PRESERVAÇÃO

#### 4.2.1 Produção de Soforolipídios

O microrganismo utilizado na produção de soforolipídios foi a levedura *Candida bombicola* (ATCC 22214™), obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (2013). A cepa foi preservada em meio contendo (g L<sup>-1</sup>) 10 de glicose, 3 de extrato de levedura, 5 de peptona, 3 de extrato de malte e 20 de ágar, for 48 h a 30 °C. O repique foi feito a cada quatro semanas e mantido a 4°C.

#### 4.2.2 Atividade Antimicrobiana

Seis (6) cepas bacterianas, sendo três (3) Gram-negativas: *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028; e três (3) Gram-positivas: *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Staphylococcus aureus* ATCC 6336 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175. As cepas foram preservadas em meio BHI (Caldo de Infusão de Cérebro e Coração) a 37 g.L<sup>-1</sup> com 20 a 30 % de glicerol em -80 °C.

### 4.3 PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS

#### 4.3.1 Inóculo e Meio de Fermentação

O inóculo foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio de inóculo com ( $\text{g L}^{-1}$ ): 100 de glicose, 10 de extrato de levedura e 1 de ureia. As culturas foram incubadas em shaker rotatório a 150 rpm, 48 h à 30 °C. Para a fermentação em biorreator o inóculo foi padronizado em 10% v/v.

O meio para a fermentação foi na condição otimizada de 75  $\text{g L}^{-1}$  de gordura de frango, 77,5  $\text{g L}^{-1}$  de glicose, 2,5  $\text{g L}^{-1}$  de extrato de levedura sem ureia a 30 °C, 150 rpm durante 120 h (MINUCELLI et al., 2017).

#### 4.3.2 Fermentação em Biorreator de Bancada

A fermentação foi realizada utilizando biorreator (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda.) com capacidade de 5,0 L com volume operacional de 4 L do meio de fermentação. O inóculo foi de 10 % (v/v), 30 °C, taxa de aeração 1,0 vvm e agitação de 300 rpm. Amostras foram retiradas a cada 12 horas, centrifugadas a 9956  $\times$  g por 15 min a 4 °C. A partir das amostras foram quantificados os sofrorolipídios, crescimento celular, consumo de açúcares e gorduras. Ao final da fermentação o sofrorolipídios produzidos foram separados, purificados e caracterizados para aplicação como agente antimicrobiano.

### 4.4 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

#### 4.4.1 Quantificação de Biomassa

A cada 12 horas de fermentação o meio foi centrifugado a 9956  $\times$  g x 15 min a 4° C. Do sobrenadante foi determinado o açúcares e gorduras residuais. A biomassa foi quantificada gravimetricamente por peso seco a 70 °C.

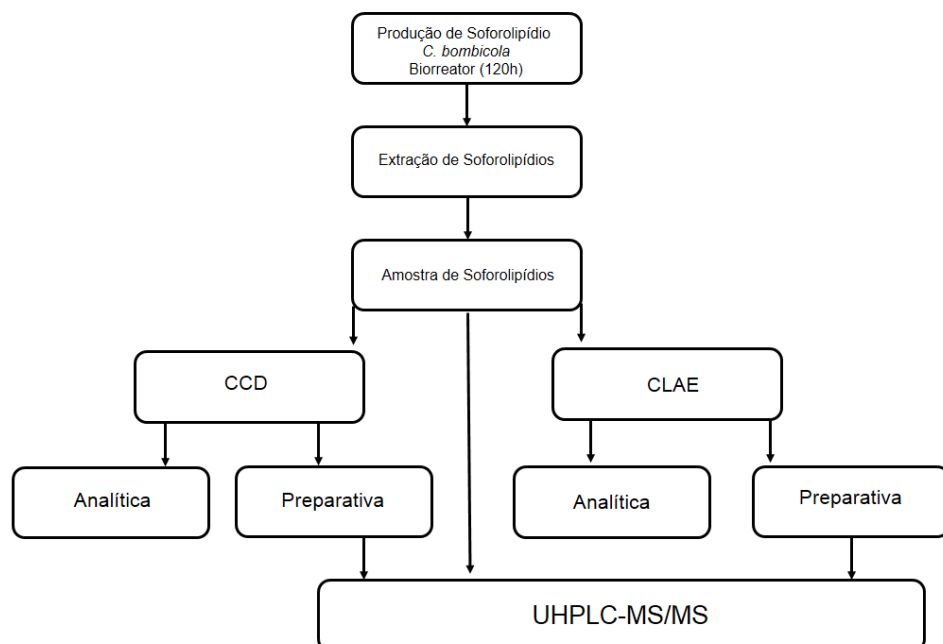
#### 4.4.2 Quantificação dos Soforolipídios, Açúcares e Gorduras Residuais

Os sofrorolipídios foram extraídos do meio de fermentação, após centrifugação para a retirada da biomassa, com acetato de etila (1:1 v/v) 3 vezes em funil de separação. A fase aquosa foi descartada e na fase orgânica foi adicionado metanol água (4:1 v/v) e posteriormente hexano com metanol e água (1:1 v/v), formando duas fases, a fase superior (hexânica) contendo a gordura residual e a inferior (metanólica) os sofrorolipídios. Na fase com sofrorolipídios foram efetuadas mais 3 lavagens, com acetato de etila e água (1:3 v/v), com intervalos de 40 min cada a 4°C. A mistura de sofrorolipídios foi monitorada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (HAQUE et al., 2016). A biomassa e o gordura residual foram quantificados por gravimetria a 70 °C e açúcares totais por fenol sulfúrico (DUBOIS et al. 1956). Os sofrorolipídios foram quantificados, caracterizados e utilizados para verificação da atividade antibacteriana.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS

O processo de caracterização dos sofrorolipídios produzidos no final da fermentação (120 h) estão esquematizados na Figura 3.

**Figura 3** – Fluxograma das etapas de análise e caracterização dos sofrorolipídios de *C. bombicola*



**Fonte:** o próprio autor.

#### 4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD preparativa foi realizada para monitoramento dos soforolipídios produzidos ao final da fermentação. A fase estacionária foi com sílica gel 60 F<sub>254</sub> (20 x 20 cm) e fase móvel composta por metanol e diclorometano (1:1) acidificada com 7 % (solução de ácido acético a 1%), revelação por luz UV. As bandas foram extraídas da fase estacionária com acetato de etila seguido de metanol. As frações resultantes analisadas foram por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e UHPLC-MS/MS (Ultra Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro Massa) para identificação das diferentes estruturas dos soforolipídios (RAU et al 1999; RIBEIRO et al., 2012 modificado). A CCD analítica, foi realizada nas mesmas condições da preparativa e reveladas com p-anisaldeído a 110 °C por 20 minutos (Haque, 2016, modificado).

#### 4.5.2 Análise de Soforolipídios por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a análise de soforolipídio por CLAE as amostras foram solubilizadas e diluídas em metanol, filtradas em filtro Millex<sup>®</sup> 0,45 µm (Merck Millipore). A injeção foi de 20 µL. em um equipamento com coluna Shim-pack CLC-ODS(M)<sup>®</sup> C18 (4,6 x 250 mm; 4,6 µm; 12 nm), bomba LC-20AT, detector SPD-M20A, auto amostrador SIL-20AHT, forno CTO-20<sup>a</sup>, degasser DGU-20A<sub>5R</sub> e software LabSolution (Shimadzu), detecção em  $\lambda = 207$ . A fase móvel foi água (A) e acetonitrila (B) com gradiente de eluição inicial em 30 % de B até 5 min, depois com 80 % de B em 30 min, permanecendo com 80 % de B até 55 min, retornando a 30 % de B em 60 min e tempo de equilíbrio até 62 min, na vazão de 0,50 mL/min (WADEKAR et al., 2012).

#### 4.5.3 Ultra Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas (UHPLC-MS/MS)

As frações de soforolipídios da CCD preparativa foram analisados pelo sistema cromatográfico Shimadzu LC-20AD, detector SPD-20A, auto amostrador SIL-20AHT, forno CTO-20A, degasser DGU-20<sup>a</sup><sub>3R</sub>, coluna Shimadzu C18 Shim-pack XR-ODS<sup>®</sup> C18 (2,0 x 75 mm; 2,2 µm; 12 nm). Acoplado ao espectrômetro de massa Compact triple-quadrupole ESI-OTOF II equipado com fonte de ionização eletrospray (ESI) (Bruker<sup>®</sup>, Cologne, Alemanha). As condições de ionização do eletrospray (ESI)

foram: voltagem 3,200 kV, temperatura do gás de secagem 200 °C, fluxo de gás do cone de 9 L min<sup>-1</sup>, pressão do nebulizador de 4 bar, modo negativo, tratamento dos dados pelo software Bruker DataAnalysis 4.2. Fase móvel água (A) e acetonitrila (B) com programação de eluição iniciando em 20 % de B até 0,50 min, elevando a 80 % de B em 12 min, permanecendo em 80 % de B até 17 min; retornando a 20 % de B em 19 min e tempo de equilíbrio até 20 min. Vazão de 0,20 mL min<sup>-1</sup> e injeção de 1,0 µL. Todas as amostras foram suspensas em metanol MS e filtradas em filtro Millex® 0,22 µm (Merck Millipore).

#### 4.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As seis (6) cepas bacterianas para o teste de atividade antibacteriana foram cultivadas em caldo triptona de soja (30,0 L<sup>-1</sup>) por 18 a 24 h, 37 °C. As Gram-negativas foram transferidas para ágar MacConkey (50,0 g.L<sup>-1</sup>) e as Gram-positivas para o meio Müeller-Hinton (38,0 g.L<sup>-1</sup>) mantidas por 24 h a 37 °C.

##### 4.6.1 Microdiluição em Caldo

A suspensão bacteriana foi ajustada em 10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup> em solução salina (NaCl 0,9 %) utilizando a escala de 0,5 McFarland padrão. O soforolipídio foi solubilizado em 2% clorofórmio e metanol (1:1), com concentração final de 2.000 µg ml<sup>-1</sup>, diluições em série foram realizadas em meio triptona de soja. 50 uL de solução de soforolipídios foram inoculadas com 50 uL das diferentes suspensões bacterianas, atingindo a concentração final de 5 x 10<sup>5</sup> UFC, incubadas a 37°C por 18 a 24 horas, resultado em 9 concentrações (2000 µg ml<sup>-1</sup>, 1000 µg ml<sup>-1</sup>, 500 µg ml<sup>-1</sup>, 250 µg ml<sup>-1</sup>, 125 µg ml<sup>-1</sup>, 62,5 µg ml<sup>-1</sup>, 31,2 µg ml<sup>-1</sup>, 15,6 µg ml<sup>-1</sup> e 7,8 µg ml<sup>-1</sup>). O efeito inibitório foi detectado pela turbidez. Quando necessário, para confirmação, 10 uL da cultura dos poços foram plaqueadas em Ágar Müeller-Hinton (38 g.L<sup>-1</sup>) e após 18 a 24 h as unidades formadoras de colônias foram contadas. O padrão de soforolipídios utilizado foi 1',4"-sophorolactona 6', 6"-diacetato (Sigma-Aldrich) e a metodologia CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute, 2015).

#### 4.6.2 Difusão em Ágar

As suspensões celulares ajustadas em  $10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  (em NaCl 0,9 %) segundo a escala 0,5 McFarland foram plaqueadas por swab em meio ágar Müller-Hinton. Discos contendo 2,0  $\mu\text{g}$  de soforolipídio foram dispostos na placa, incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antibacteriana do soforolipídio foi verificada pela formação de halo ao redor do disco, indicando a zona de inibição. O teste foi realizado segundo as normas do CLSI, (The Clinical & Laboratory Standards Institute, 2015).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O perfil da produção de soforolipídio e síntese de biomassa foram modelados usando regressão não linear logística (Equação 1) pelo Software R (R CORE TEAM, 2016).

$$P = P_{max}/(1 + \exp[(x_0 - x)/k]) \quad (\text{Eq.1})$$

em que  $P_{max}$  é o valor máximo assintótico,  $k$  é o parâmetro de escala numérica no eixo de entrada,  $x_0$  o valor  $x$  no ponto de inflexão da curva. Para significância dos parâmetros foi usado o teste  $t$ . A qualidade de ajuste da equação dos modelos foi expressa pelo coeficiente de determinação  $R^2$  e sua significância estatística foi pelo teste  $F$ . Os pressupostos dos modelos, normalidade e homogeneidade de variância dos resíduos, foram pelo teste de Shapiro-Wilk (Shapiro; Wilk, 1965) e análise gráfica, respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de artigos e patente.

5.1 Artigo 1: Atividade antibacteriana de soforolipídios de *Candida bombicola* contra patógenos humanos.

Apresentado de acordo com as normas do periódico Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.

Normas:[https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/523888?generatepdf=true](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/523888?generatepdf=true)

**Atividade antibacteriana de Soforolipídios de *Candida bombicola* contra patógenos humanos**

Isadora Cernach Carneiro da Fontoura<sup>1</sup>, Gustavo Issamu Asai Saikawa<sup>2</sup>, Victória Akemi Itakura Silveira<sup>1</sup>, Nicole Caldas Pan<sup>3</sup>, Ismael R. Amador<sup>1</sup>, Cristiani Baldo<sup>1</sup>, Sergio Paulo Dejato da Rocha<sup>2</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas. <sup>2</sup> Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas. <sup>3</sup> Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid-Pr 445 Km 380-Campus universitário, Caixa postal 10.011, Londrina, PR CEP: 86057-970, Brasil

### **E-mail dos Autores**

isaacernach1@gmail.com

gustavojpsaikawa@hotmail.com

victoriiakemi@hotmail.com

nicolepan@uel.br

ir.amador@hotmail.com

crislianibaldo@uel.br

spdejatorocha@yahoo.com.br

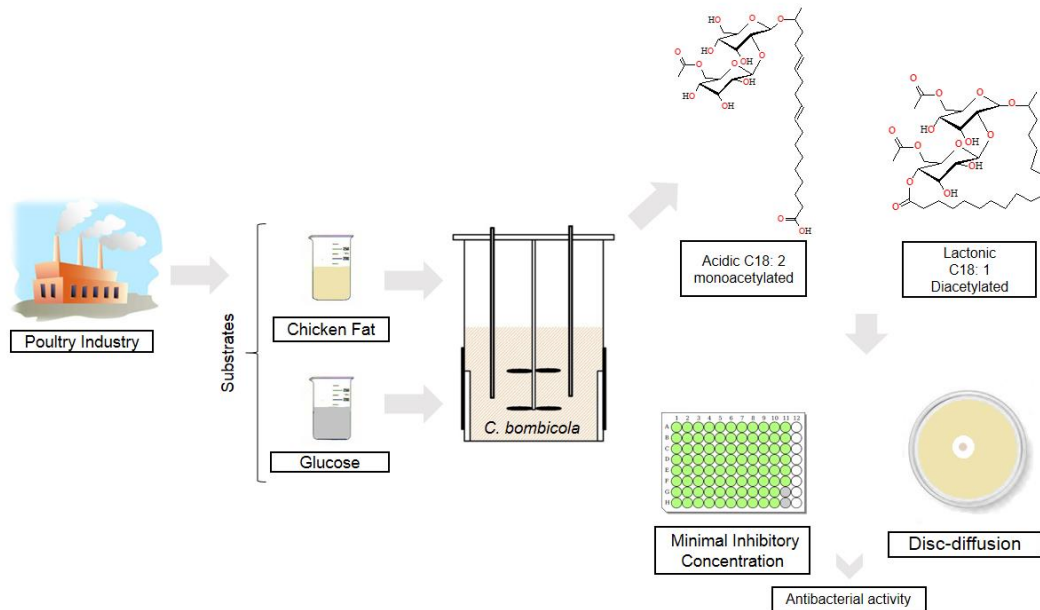
macelligoi@uel.br (autor de correspondência)

## Resumo

Os soforolipídios são glicolipídios que têm aplicações em diversas áreas destacando a farmacêutica que pelas suas propriedades são classificados como agentes antimicrobianos naturais. O presente estudo objetivou produzir soforolipídio de *Candida bombicola* em meio a base de gordura residual de frango que foram purificados, caracterizados quimicamente e aplicados como agente antibacteriano contra as Gram-negativas: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*; e Gram-positivas: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. A produção e produtividade de soforolipídios neste resíduo lipídico atingiu 27,86 g L<sup>-1</sup> e 1,16 g/L h<sup>-1</sup> respectivamente. Com base na caracterização estrutural, 73,55% dos soforolipídios apresentam forma ácida com: C18: 2 monoacetilados, enquanto que 26,44% foram lactônicos com: C18: 1 diacetilados. As bactérias submetidas à exposição aos soforolipídios apresentaram redução de viabilidade nas doses de 500 µg ml<sup>-1</sup> e 2000 µg ml<sup>-1</sup> contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas respectivamente. Esses resultados podem contribuir com informações uteis para diversas indústrias, podendo aplicar o soforolipídio como um antimicrobiano natural, sem causar risco à saúde humana e animal.

**Palavras-chave:** Soforolipídio, *Candida bombicola* Biosurfactante, propriedades antibacterianas, resíduo lipídico.

## Resumo Gráfico



## Destaques

Alta produtividade de  $1,16 \text{ g} / \text{L h}^{-1}$  em biorreator com godura residual de frango.

Os sofrorolípídios produzidos têm alto conteúdo ácido monoacetilado com C18: 2.

Os sofrorolípídios foram sensíveis para seis linhagens, sendo maiores para as Gram-positivas.

O biossurfactante sofrorolípídios é inibidor do crescimento de bactérias médicas.

O resíduo lipídico da indústria avícola é uma matéria-prima sustentável para a produção de sofrorolípídios.

## Introdução

Atualmente as infecções bacterianas são as principais causas de doenças crônicas e mortalidade [1]. As bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* apresentam 50% de resistência aos medicamentos de uso comum e também a escassez de novas classes de medicamentos com propriedades antibacterianas, principalmente para as Gram-negativas [2]. Assim, pesquisas de impacto, desenvolvendo novos compostos naturais para aplicação no tratamento e/ou na prevenção de doenças humanas, vem aumentando ao longo dos anos [3].

A busca por essas moléculas, que possam atuar sobre patógenos novos ou resistentes aos antibióticos convencionais, tem objetivo focado na diversidade estrutural dos componentes dos biofilmes, que agrava o desenvolvimento dessa resistência aos antibióticos e dificulta erradicação [4].

O soforolipídio surge como uma molécula que possui propriedades anti-adesivas e biocidas, podendo ser definido como antimicrobiano prevenindo ou eliminando as contaminações por patógenos [5]. A atividade dos soforolipídios depende de diversos fatores, tais como o microrganismo produtor, a estrutura química da molécula, o patógeno testado e o tempo e a concentração de exposição do soforolipídios testados com agente antimicrobiano [6].

Os soforolipídios pertencem a classe de glicolipídeos extracelulares, produzidos por vários microrganismos [7-8] e a *Candida bombicola* se destaca pelo alto rendimento, ausência de patogenicidade e a incapacidade de colonizar tecidos, o que a torna aplicável nas indústrias de alimento, farmacêutica, cosmética e outras [9].

Estruturalmente possui uma soforose (D-glicopiranosil  $\alpha$  (2-1)  $\beta$ -D-glicopiranosose) como uma ligação  $\beta$ -glicosídica a uma cadeia de ácido graxo, principalmente o palmítico (C16) ou esteárico (C18). Podem ser desacetilados, mono, ou diacetilados na posição 6' e/ou 6'' da soforose, podem ser sintetizados em misturas de formas acídicas e lactônicas. O grupamento carboxila do ácido graxo pode estar esterificado a soforose nos carbonos C4'', C6' ou C6'' (esterificação no C4'' é mais frequente) formando as lactônicas ou grupamento carboxila do ácido graxo livre, forma acídica. De acordo com essas características são definidas suas propriedades físico-químicas e as futuras aplicações [10].

Dependendo do tipo de interação e da forma de ordenamento das moléculas esses glicolipídios podem apresentar diversas propriedades tais como: emulsificante, lubrificante, formação de micelas, detergência, dispersabilidade, molhabilidade formação de espuma. São

considerados “nature-friendly products” devido a sua baixa toxicidade e grande biodegradabilidade. Apresentam eficiência de atuação em diferentes condições ambientais tais como pH, temperatura, força iônica, além da biocompatibilidade, que os tornam vantajosos quando comparados aos surfactantes sintéticos [11].

Os soforolipídios estão em destaque devido as suas propriedades antimicrobianas, que são verificadas pela relação entre a densidade superficial e a atividade dos soforolipídios contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Devido as suas características a produção em larga escala e aplicação na área da saúde podem ser desenvolvidas [12]. Os mecanismos de ação antimicrobiana dos soforolipídios são relatados como a desestabilização ou alteração da permeabilidade da membrana celular do patógeno, modificações das propriedades de carga-carga e a capacidade da soforose em danificar os envelopes bacterianos. Assim, os soforolipídios são promissores para a inibição / ruptura de biofilmes formados por microrganismos Gram-positivos e negativos, e esta atividade tem sido reforçada pelo tipo de ácido graxo presente na molécula [12-13].

A eficiência dos soforolipídios contra bactérias patogênicas Gram positivas e negativas já são comprovadas [14-18]. O objetivo desse trabalho foi produzir, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana de soforolipídios de *Candida bombicola* produzidos em meio com gordura rde frango, contra bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*) e Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*) de importância para saúde humana.

## **Material e Métodos**

### *Microrganismos e meio de preservação*

Para a produção de soforolipídios: *Candida bombicola* (ATCC 22214™) obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (2013). Meio de preservação em

(g L<sup>-1</sup>): 10 de glicose, 3 de extrato de levedura, 5 de peptona, 3 de extrato de malte e 20 de ágar, for 48 h a 30 °C. A manutenção foi a cada quatro semanas, mantida a 4 °C.

Para a atividade antibacteriana: seis (6) cepas sendo três (3) Gram-negativas: *P. mirabilis* ATCC 7002, *E. coli* ATCC 8739, *S. enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028; e três (3) Gram-positivas: *E. faecium* ATCC 6569, *S. aureus* ATCC 6336 e *S. mutans* ATCC 25175. Foram preservadas em meio BHI (Caldo de Infusão de Cérebro e Coração) a 37 g.L<sup>-1</sup> com 20 a 30 % de glicerol a -80 °C.

Padrão de soforolipídio: 1',4"-sophorolactona 6', 6"-diacetato (Sigma Aldrich, USA) foi utilizado nas quantificações e nos testes de atividade antibacteriana.

#### *Produção de soforolipídios em gordura de frango*

A fermentação foi realizada em biorreator de bancada (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda.) com capacidade de 5,0 L com volume operacional de 4 L do meio de fermentação a 30 °C, taxa de aeração 1,0 vvm e agitação de 450 rpm. O meio de fermentação em (g L<sup>-1</sup>): 77,5 de glicose, 2,5 de extrato de levedura, e 75 de gordura da indústria de frango com a composição de 0,65 % de ácido mirístico 23,9 % de ácido palmítico; 6,69 % ácido esteárico; 38,46 % ácido oleico; 28,21 % de ácido linoleico e 2,06 % de ácido linolênico [19]. O inóculo foi de 10 % (v/v). Amostras foram a cada 12 horas para acompanhar a produção de soforolipídios, biomassa, consumos de açúcares e lipídios. A gordura de frango foi extraída de tecido residual da indústria de frango, da região de Londrina-Paraná, segundo a Patente n° BR 10 2017 012044 9 [20].

#### *Quantificação dos Soforolipídios*

Os soforolipídios foram extraídos do meio de fermentação, após centrifugação para a retirada da biomassa, com acetato de etila (1:1 v/v) 3 vezes em funil de separação e na fase orgânica foi adicionado metanol água (4:1 v/v) e posteriormente hexano com metanol e água (1:1 v/v), formando duas fases, a fase superior (hexânica) contendo a gordura residual e a

inferior (metanólica) os soforolipídios. Na fase com soforolipídios foram efetuadas mais 3 lavagens, com acetato de etila e água (1:3 v/v), com intervalos de 40 min cada a 4°C. A mistura de soforolipídios foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD) (Haque et al., 2016). A biomassa e o gordura residual foram quantificados por gravimetria a 70 °C e açúcares totais por fenol sulfúrico [21]. A mistura de soforolipídios foi quantificada, caracterizada e utilizada para verificação da atividade antibacteriana.

#### *Caracterização dos soforolipídios*

##### *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de iodo (CLAE)*

Foi usado detector de arranjo de iodo e coluna Shim-pack CLC-ODS(M)<sup>®</sup> C18 da Shimadzu (4,6 x 250 mm; 4,6 µm; 12 nm), comprimento de onda 207 nm, fase móvel em gradiente composto por 30 % de acetonitrila e 70 % de água por 5 minutos, aumentando para 80 % de acetonitrila e 20 % de água por 50 minutos [22].

##### *Espectrometria de Massa (MS)*

Foi utilizado espectrômetro de massa marca Bruker modelo Compact triple-quadrupole ESI-OTOF II (Bruker<sup>®</sup>, Cologne, Alemanha) equipado com fonte de ionização eletrospray (ESI). As amostras foram preparadas em metanol grau MS e as análises por injeção direta. As condições foram: ionização eletrospray (ESI) em modo negativo de 3200 V, temperatura do capilar de 200°C, fluxo de gás no cone de 4 L min<sup>-1</sup> e pressão do nebulizador de 4 bar. Os dados foram analisados pelo software Bruker DataAnalysis 4.2.

##### *Atividade Antibacteriana*

As bactérias preservadas no item 2.1 foram cultivadas em caldo triptona de soja (30,0 L<sup>-1</sup>) por 18 a 24 h, 37 °C. As Gram-negativas foram transferidas para ágar MacConkey (50,0 g.L<sup>-1</sup>) e as Gram-positivas para o meio Müeller-Hinton (38,0 g.L<sup>-1</sup>) mantidas por 24h a 37 °C.

### *Microdiluição em Caldo*

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo teste de microdiluição em caldo, onde as suspensões bacterianas foram ajustadas em  $10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  (NaCl 0,9 %) utilizando 0,5 a escala de McFarland. O soforolipídio foi solubilizado em 2% clorofórmio e metanol (1:1) com concentração final de 2.000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , diluições em série foram realizadas em meio triptona de soja. 50  $\mu\text{L}$  de soforolipídios foram inoculadas com 50  $\mu\text{L}$  das diferentes suspensões bacterianas, atingindo a concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC, incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas, resultado nas concentrações (2000  $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$ , 1000  $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$ , 500  $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$ , 250  $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$ , 125  $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$ , 62,5  $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$ , 31,2  $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$ , 15,6  $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$  e 7,8  $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$ ). O efeito inibitório foi detectado pela turbidez. Como os soforolipídios apresentaram-se turvos quando diluídos em MHB, para confirmar o MIC, 10  $\mu\text{L}$  da solução dos poços foram plaqueadas em Ágar Müeller-Hinton (38  $\text{g.L}^{-1}$ ) e após 18 a 24 h as unidades formadoras de colônias foram contadas. Comparado ao padrão de soforolipídios seguindo a metodologia do *CLSI* (The Clinical & Laboratory Standards Institute, 2015).

### *Disco-difusão*

As suspensões bacterianas de concentração  $5 \times 10^5$  UFC foram também plaqueadas por swab em meio ágar Müeller-Hinton. Discos contendo 2,0  $\mu\text{g}$  de soforolipídio foram dispostos nas placas e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. A atividade antibacteriana do soforolipídio foi verificada pela formação de halo ao redor do disco, indicando a zona de inibição. O teste foi realizado segundo as normas do CLSI, 2015 [23].

### *Análise Estatística*

O perfil da produção de soforolipídio e biomassa foram modelados usando regressão não linear logística (Equação 1) pelo Software R [24].

$$P = P_{max} / (1 + \exp[(x_0 - x)/k]) \text{ (Eq.1)}$$

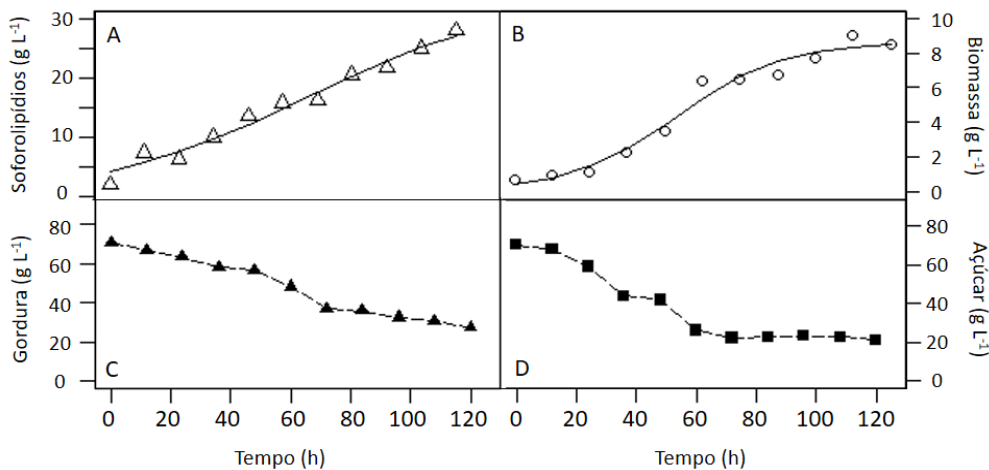
em que  $P_{\max}$  é o valor máximo assintótico,  $k$  é o parâmetro de escala numérica no eixo de entrada,  $x_0$  o valor  $x$  no ponto de inflexão da curva. Para significância dos parâmetros foi usado o teste  $t$ . A qualidade de ajuste da equação dos modelos foi expressa pelo coeficiente de determinação  $R^2$  e sua significância estatística foi pelo teste  $F$ . Os pressupostos dos modelos, normalidade e homogeneidade de variância dos resíduos, foram pelo teste de Shapiro-Wilk [24] e análise gráfica, respectivamente.

## Resultados e Discussão

### *Produção de soforolipídios em gordura de frango*

A produção atingiu  $27,86 \text{ g L}^{-1}$  com uma produtividade de  $1,16 \text{ g/L h}^{-1}$  em 120 h e a máxima assintótica de acordo com o modelo foi de  $33,42$ , uma variação de 19%, demonstrando coerência nos resultados. Os consumos de glicose e gordura aumentaram progressivamente com o tempo de fermentação atingindo 72,8 % e 63,8 % respectivamente (Figura 1). O crescimento microbiano atingiu  $8,48 \text{ g L}^{-1}$  em 120 h, sendo a máxima prevista de  $8,68$  pelo modelo.

**Figura 1** – Produção de soforolipídios (A), biomassa (B), consumo de gordura de frango (C) e açúcar (d) por *C. bombicola* a  $30^\circ\text{C}$ , 450 rpm, 1,0 vvm em biorreator. A e B foram ajustados à equação exponencial e logística.



O modelo proposto (Equação 1) mostraram elevada concordância entre os valores preditos e observados, como  $R^2$  de 0,97 para as variáveis respostas em estudo. As análises de resíduos apresentaram normalidade (Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ) e homogeneidade de variância dos resíduos, atendendo aos pressupostos dos modelos. Os parâmetros cinéticos definidos pela equação 1 foram estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ) para soforolipídio e biomassa [25].

A produção de soforolipídios é afetada diretamente pelo meio de cultivo empregado, fontes alternativas podem levar a redução dos custos e proporcionar sustentabilidade à produção dos biossurfactantes [9]. Substratos alternativos tem sido foco de estudo pelo nosso grupo e o emprego da gordura residual da indústria avícola, como fonte lipídica no meio de cultivo produziu de  $39.81 \text{ g L}^{-1}$  de soforolipídios em frascos de Erlenmeyer [19];

O elevado custo de produção desse biossurfactante está ligado a complexidade dos meios de cultivos, que pode atingir 60 % dos custos totais do processo fermentativo [26]. Para a escolha de um resíduo é necessário conhecer seus nutrientes e se esses atendem as necessidades do crescimento do microrganismo e da produção do metabólito desejado, assim pode se ter dificuldades na escolha dos resíduos agroindustriais, como substratos alternativos para processos fermentativos [27]. Porém a utilização desses substratos pode reduzir significativamente, o custo de produção e colaborar com a sustentabilidade ambiental.

Os soforolipídios de *C. bombicola* foram produzidos em melaço de cana-de-açúcar e óleo de coco (10 %) em 168 horas cultivo a 180 rpm, atingindo uma máxima produção de  $10 \text{ g L}^{-1}$  [28]. Em óleo de mamona a produção de soforolipídios atingiu  $6,1 \text{ g L}^{-1}$  essa baixa produção pode ser pela baixa concentração de ácido palmítico (9,9 %) que pode ter reduzido a produção [29]. No nosso trabalho com a gordura de frango a produção foi de  $27,86 \text{ g L}^{-1}$  em biorreator em 120 h, essa produção foi superior sendo 4,6 vezes maior o que pode ter sido influenciada pela maior quantidade de ácido palmítico (23,9 %).

Em estudos de produção de soforolipídios de *C. bombicola* utilizando um substrato lipídico convencional, ácido oleico, a produção foi de  $199 \text{ g L}^{-1}$  correspondendo a produtividade de  $0,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}$  [30]. Esses dados quando comparado ao obtido no nosso trabalho ( $1,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}$ ) mostrou que o uso desse substrato residual foi positivo para a produção de soforolipídios.

#### *Caracterização dos soforolipídios*

A caracterização dos soforolipídios podem contribuir para a expansão das aplicações em áreas distintas. Os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massa (MS) por foram utilizados para separação e identificação dos soforolipídios produzidos por *C. bombicola*. Os principais tipos de soforolipídios produzidos por *C. bombicola* encontrados no perfil cromatográfico foram no tempo 39,56 min predominando a forma acídica C18:2 monoacetilado, e em 43,39 min a forma lactônico C18:1 diacetilado, dados foram confirmados pela espectroscopia de massa íon molecular  $m/z$  685 ( $[M+Na^+]$ ) e 711 ( $[M+Na^+]$ ). A composição estrutural foi de 73,55 % de acídico C18:2 monoacetilado e 26,44 % de lactônico C18:1 diacetilado. Um outro tipo de soforolipídio encontrado foi lactônico C18:0 diacetilado (48,17 min), representado pelo íon molecular  $m/z$  713 ( $[M+Na^+]$ ).

#### *Atividade Antibacteriana*

A atividade foi avaliada pela Concentração Inibitória Mínima (Tabela 1) e por disco-difusão (Figura 2). Os menores valores de CIM foram encontrados para as bactérias Gram positivas usando soforolipídios a 250 (padrão) a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (amostra), e as Gram negativas mostram-se menos susceptíveis a essa molécula, necessitando de concentrações maiores de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  tanto para a amostra como para o padrão. A comparação da atividade do padrão como os soforolipídios produzidos por *C. bombicola* (predominando acídico C18:2

monoacetilado) não apresentou diferença, mostrando que o produzido teve o mesmo efeito do padrão.

**Tabela 1** – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos soforolipídios de *C. bombicola* e do padrão contra patógenos humanos

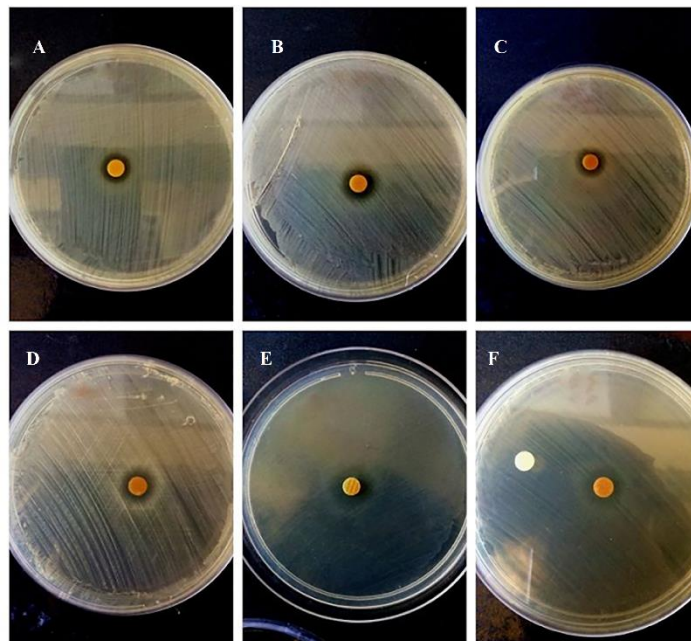
| Patógenos                        | CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) |             |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------|
|                                  | Padrão*                       | Sofolipídio |
| <i>Escherichia coli</i> (-)      | 2000                          | 2000        |
| <i>Salmonela entérica</i> (-)    | 2000                          | 2000        |
| <i>Proteus mirabilis</i> (-)     | 2000                          | 2000        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (+) | 500                           | 500         |
| <i>Streptococcus mutans</i> (+)  | 500                           | 500         |
| <i>Enterococcus faecium</i> (+)  | 250                           | 500         |

\*1',4"-Sophorolactona 6', 6"-diacetato

O efeito antimicrobiano foi observado por alguns autores que demonstraram que os [12] soforolipídios nas concentrações de 50 e 500  $\text{mg L}^{-1}$ , levaram a uma redução da viabilidade celular de bactérias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*) Os valores encontrados no presente trabalho foram melhores para bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* que apresentaram o MIC de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e *E. coli* de 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mostrando-se mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas (Tabela 1). Outros resultados semelhantes de atividade antimicrobiana de soforolipídios, também foram relatados com concentrações de MIC de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e >750  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *S.aureus* e *E. coli*, respectivamente [31]; A atividade antimicrobiana também foi verificada em valores mais altos de MIC para *Bacillus subtilis* de 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e para *Pseudomonas.aeruginosa*, *E.coli* e *S. aureus* de 10.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  [13]

A comprovação da atividade antimicrobiana foi verificada pelo teste de disco difusão, onde houve a formação dos halos quando usado 2 µg de soforolipídios, Figura 2 (A – F). Esse biossurfactante também têm sido relatado como agente antimicrobiano também pelo método de poço-difusão contra *Bacillus subtilis* e *S. aureus*, autores observaram a inibição do crescimento em 0,5 % e 1,0 %, equivalente a uma massa de 30 µg e 60 µg, respectivamente [13]. Em outro trabalho houve a formação de halos para bactérias *Propionibacterium acnes* (gram-positiva) na presença de filmes com 1,8 g de soforolipídios e poli-hidroxibutirato (PHB) [18]. Os resultados de formação de halo encontrados nos trabalhos corroboram com a atividade antibacteriana em Gram-positivas e Gram-negativas na presença de soforolipídios.

**Figura 2** – Teste de disco difusão do soforolipídio de *Candida bombicola* contra bactérias Gram Negativa (A-C) e Gram Positiva (D-F)



A-*Escherichia coli*, B-*Salmonella enterica* subsp. *enterica*, C-*Proteus mirabilis*, D-*Staphylococcus aureus*, E- *Streptococcus mutans* e F- *Enterococcus faecium* com um disco branco (controle) sem nenhum antimicrobiano.

O mecanismo de ação antibacteriano dos soforolipídios tem sido descrito principalmente pelo extravasamento dos conteúdos citoplasmáticos, que foi comprovado pela liberação da enzima malato-desidrogenase. Com a perda do conteúdo diminui a probabilidade de bactérias adquirirem resistência aos antibióticos [13].

Os soforolipídios são comprovadamente mais eficazes para bactérias Gram-positivas do que para Gram-negativas [14] sugerindo que o modo de ação do soforolipídio pode ser ligado à composição específica da membrana externa de algumas cepas de bactérias quanto ao envelope celular, sendo das Gram negativas mais complexo, sendo compostos por uma membrana externa de lipopolissacarídeo e fosfolipídio antes da camada de peptidoglicano e membrana plasmática interna [12].

As diferenças entre os envelopes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas conferem diferentes cargas. As relações de carga e adesão são difíceis de serem estabelecidas, pois dependem de constituintes da membrana e da espécie das bactérias [33,31]. Em pH próximo ao neutro a carga superficial de *E.coli* apresenta-se mais negativo do que *S. aureus*, isso ocorre pois a composição das membrana das bactérias gram negativas, é em maior porcentagem de lipopolissacarídios (LPS). No pH neutro algumas moléculas de soforolipídios são ionizadas e também apresentam cargas negativas que podem repelir essas bactérias gram negativas [31], justificando a menor potencial antibacteriano dos soforolipídios para as bactérias Gram-negativas.

Alguns autores relatam que os soforolipídios podem apresentar menores atividades contra *E. coli* [32], o que foi possível verificar com o soforolipídio de *C.bombicola* que necessitou de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de soforolipídios para inibir o crescimento de *E.coli* (Tabela 1).

A atividade antimicrobiana de soforolipídios produzidos por *Starmerella bombicola* foi testada contra *E. coli*. As formas lactônicas e acídicas dos soforolipídios com ácido palmítico, esteárico ou oleico foram testadas nas concentrações de 0,1 %, 0,5 % e 1,0 % contra 5 cepas de *E. coli*. Em períodos de 1 a 2 horas os lactônicos foram mais eficazes destacando o esteárico e oleico. Todas as cepas de *E. coli* apresentaram diferentes susceptibilidades para os três tipos soforolipídios testados, as bactérias inativadas por soforolipídios sofreram danos na membrana celular, não foi confirmado diferenças entre os lactônicos e acídicos [6].

## Conclusão

Este estudo demonstrou a possibilidade de produzir soforolipídios através de um substrato residual da indústria, a gordura de frango, em biorreator. A produção foi de 27,86 g L<sup>-1</sup> e uma produtividade de 1,16 g/L h<sup>-1</sup> em 120 h, próxima à estimada estatisticamente de 33,42 g L<sup>-1</sup> demonstrando que o processo foi eficiente. O soforolipídio foi caracterizado, predominando as formas acídicas C18:2 monoacetiladas e lactônicas C18:1 diacetiladas. A atividade antimicrobiana foi comprovada pelo CIM e teste de disco difusão sendo 500 µg de soforolipídios para inibir as bactérias Gram positivas e 2000 µg para as Gram negativas. O trabalho sugere que o soforolipídio, produzido em gordura de frango, por *C. bombicola* apresentou atividade antimicrobiana e pode ser uma alternativa sustentável de produção e aplicação na área da saúde.

## Referências

- [1] B. Fathima, J. Pugazhendhi, A. R. Venis. Microbial Pathogenesis Synthesis and characterization of ZrO<sub>2</sub> nanoparticles-antimicrobial activity and their prospective role in dental care. *Microb. Pathogenesis*. 110 (2017) 245–251. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.06.039.
- [2] WHO - World Health Organization. Guia de Estudos. 2014. Disponível em: <http://sinus.org.br/2014/wp-content/uploads/2013/11/OMS-Guia-Online.pdf> Acesso em: 15 dez. 2017.
- [3] S. Donadio, S. Maffioli, P. Monciardini, M. Sosio, D. Jabes. Descoberta de antibióticos no século vinte e um: tendências atuais e perspectivas futuras. *J Antibiot* 63 (2010) 423-430. DOI: 10.1007/s00253-010-2877-8.
- [4] D. Sharma. Biosurfactants in Food. *SpringerBriefs in Food* , 2016. DOI 10.1007/978-3-319-39415-2\_3

- [5] A.D. J Cortés-sánchez, H. Hernández-sánchez, E. M. Jaramillo-flores. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiological Research* 168 (2013) 22–32, 2013. DOI: 10.1016/j.micres.2012.07.002
- [6] X. Zhang, R. D. Ashby, D.K.Y. Solaiman, Y. Liu, X. Fan. Antimicrobial activity and inactivation mechanism of lactonic and free acid sophorolipids against *Escherichia coli* O157 : H7 ☆. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 11, (2017) 176–182. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.07.002.
- [7] A.N.I. Van Bogaert, K. Saerens, D.C. Muynck, D. Develter, W. Soetaert, J.E.Vandamme. Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microb. and Biotech.* 76 (2007) 23–34. DOI: 10.1007/s00253-007-0988-7.
- [8] P.C. Kurtzman, N.P.J. Price, K.J. Ray, M.T. Kuo. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. *FEMS Microbiology Letters*, 311, no. 2 (2010) 140–146. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02082.x
- [9] I. N. A. Van bogaert, J. Zhang, W. Soetaert. Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochemistry*, 46, n. 4 (2011) 821–833. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.01.010
- [10] H-J. Asmer, S. Lang, F. Wagner. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J Am Oil Chem Soc* (1988) 65: 1460. DOI: 10.1007/BF02898308
- [11] M. D, Fakruddin. Biosurfactant: Production and Application. *Petroleum & Environmental*. 3, n. 4 (2012). doi: 10.4172 / 2157-7463.1000124
- [12] C. Valotteau, M. I. Banat, C.A. Mitchell, H. Lydon, R. Marchant, F. Babonneau, C. Pradier, N. Baccile, V. Humblot. Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 157, (2017) 325–334. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.072

- [13] M. A. Díaz de rienzo, I. M. Banat, Bem Dolman, J. Winterburn, P. J. Martin. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New Biotechnology*.32, n. 6, (2015) 720–726. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.009
- [14] V. Shah, D. Badia, P. Ratsep, S. Wallner, R. Gross, R. M. Hammerschlag, E. M. Zenilman, H.M. Bluth, Sophorolipids Having Enhanced Antibacterial Activity Letters to the Editor Sophorolipids Having Enhanced Antibacterial Activity. 51, n. 1, (2007). DOI: 10.1128 / AAC.01118-06
- [15] N.J. Sleiman, A.S. Sleiman, M.P. Roblin, S. Wallner, R. Gross, R. M. Hammerschlag, E. M. Zenilman, M. H. Bluth. Sophorolipids as Antibacterial Agents. *Annals of Clinical Laboratory Science*. 39, n. 1 (2009) 60–63.
- [16] V. K. Morya, J. Park, J. T. Kim, S. Jeon, E. Kim. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. *Bioresource technology*.143, (2013) 282–8. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.094
- [17] V. Denge-pulate, P. Chandorkar, S. Bhagwat, A.A. Prabhune. Antimicrobial and SEM Studies of Sophorolipids Synthesized Using Lauryl Alcohol. (, 2013) 543-552. DOI: 10.1007/s11743-013-1495-8
- [18] K.Y.D. Solaiman, D.R. Ashby, M. Birbir, P. Caglayan. Antibacterial Activity of Sophorolipids Produced by *Candida bombicola* on Gram-positive and Gram-negative Bacteria Isolated from Salted Hides. 111 (2016) 358–364.
- [19] T. Minucelli, M.R.R. Viana, D. Borsato, A.B. Galdino, V. T. M. Cely, M.R. Oliveira, C. Baldo, M.A.P.C. Celligoi. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. *Waste and Biomass Valorization*.7, n. 3 (2017) 1–11. DOI: 10.1007/s12649-016-9592-3.

- [21] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, n. 3 (1956) 350–356. DOI: 10.1021 / ac60111a017
- [22] S. Wadekar, S. Kale, A. Lali. Sophorolipid Production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from Virgin and Waste Frying Oils , and the Effects of Activated Earth Treatment of the Waste Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, (2012) 1029–1039. DOI: 10.1007/s11746-011-1986-6>
- [23] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved 371 standard - 12th Edition, vol M02-A12. Clinical and Laboratory Standards Institute, 372 Wayne, PA, (2015).
- [24] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2016).
- [25] S. S. Shapiro, M. B. Wilk. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52 n. 3 (1965) 591–611. DOI: 10.2307 / 2333709
- [26] B. S. Saharan, R. K. Sahu, D. A. Sharma, Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. 2011, (2012) 1–14.
- [27] M. Nitschke, C. Ferra, G. M. Pastore. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35 n. 1–2 (2004) 81–85. DOI: 10.1590/S1517-83822004000100013
- [28] H. L. N. Hoa, Q. L. Loan, K Eun-ki, T.T. Ha, D.N. Duy, Q. H. Khanh, H. N. Dung. Production and characterization of sophorolipids produced by *Candida bombicola* using sugarcane molasses and coconut oil. 22, n. 2 (2017) 66–75.
- [29] L.C. Sousa; E.D. Rocha, R.P. Cunha, C.P. Rocha. Caracterização por cromatografia gasosa do óleo de mamona visando a produção de biodiesel. (2014).

- [30] E. I. P. Delbeke, W.K.L. Roelants, N. Matthijs, B. Everaert, W. Soetaert, T. Coenye, V.M.K. Grem, V.C. Stevens. Sophorolipid amine oxide production by a combination of fermentation scale-up and chemical modification. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, (2016). DOI:10.1021 / acs.iecr.6b00629
- [31] C. Pontes, M. Alves, C. Santos, M. H. Ribeiro, L. Gonçalves, A. F. Bettencourt, I. A. C. Ribeiro. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, (513) 697–708. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.074
- [32] E. Kulakovskaya, B. S. Saharan, R. K. Sahu, D. A. Sharma. The Antibiotic and Membrane-damaging Activities of Cellobiose Lipids and Sophorose Lipids *Biochemistry and Biotechnology*. 2011, (2012) 1–14. DOI: 10.5650/jos.ess14037
- [33] Palmer, J., Flint, S., Brooks, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2007, 34(9), 577-588. DOI: 10.1007 / s10295-007-0234-4

5.2 Artigo 2: Caracterização e identificação dos soforolipídios produzidos por *Candida bombicola* em resíduo lipídico da indústria avícola por UHPLC-MS/MS.

Apresentado de acordo com as normas do periódico Journal of Chromatography B:

Normas:<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-chromatography-b/1570>

0232generatepdf=true

## **Caracterização e identificação dos sofrorolipídios produzidos por *Candida bombicola* usando resíduo lipídico da indústria avícola por UHPLC-MS/MS**

Isadora Cernach Carneiro da Fontoura<sup>1</sup>, Ismael Rodrigues Amador<sup>1</sup>, Cristiani Baldo<sup>1</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Estrada Celso Garcia Cid-Pr 445 Km 380-Campus universitário, Caixa postal 10.011, Londrina, PR 86057-970, Brasil

### **E-mail dos Autores**

isaacernach1@gmail.com

ir.amador@hotmail.com

cristianibaldo@uel.br

macelligoi@uel.br

### **Resumo**

A identificação dos componentes dos sofrorolipídios de *Candida bombicola* produzidos em gordura residual de frango foram realizadas por metodologias associadas de CCD, HPLC, UHPLC MS/MS. Pelos resultados as formas predominantes foram lactônicas diacetiladas C18:1, C18:0 e C18:3 com 38,02; 21,17 e 8,82% do total de sofrorolipídios produzidos. Os sofrorolipídios acídicos foram mono e diacetilados predominando C18:0 (8,97%); C18:1(4,3%); C18:2 (2,7%) e C18:3 (1,6%). A maior parte dos sofrorolipídios produzidos foram diacetilado (91,43%,). As técnicas preparativas CCD e CLAE foram eficientes e podem auxiliar na identificação dos diferentes tipos de sofrorolipídios para possíveis aplicações industriais.

**Palavras-chave:** Soforolipídios, *Candida bombicola*, biossurfactante, análises químicas, sofrorolipídios acídicos e lactônicos

## 1. Introdução

Os sofrorolipídios são biossurfactantes extracelulares pertencentes a classe de glicolipídios que possuem um dissacarídeo de sofrorse D-glicopiranosil  $\alpha$  (2-1)  $\beta$ -D-glicopiranosose conectada pela extremidade redutora a uma longa cadeia de ácido graxo. Os sofrorolipídios naturais podem ser desacetilados, mono, ou diacetilados na posição 6'e / ou 6"da sofrorse e a apresentam duas formas estruturais, acídica (onde o grupamento carboxila do ácido graxo encontra-se livre) e lactônica onde pode estar esterificado a sofrorse nos carbonos C4'', C6' ou C6'' (esterificação no C4'' é mais frequente). As características químicas dos sofrorolipídios definem as propriedades físico-químicas que são determinantes para suas futuras aplicações (Asmer et al., 1988; Ciesielska et al.,2014).

Dependendo do tipo de interação e do ordenamento das moléculas, os surfactantes apresentam propriedades de emulsificante, lubrificante, formação de micelas, detergência, dispensabilidade, molhabilidade e formação de espuma. Essas características são determinadas pela localização, tamanho e polaridade dos grupos funcionais que compõem a molécula. As aplicações práticas dos biossurfactantes são totalmente dependentes do conhecimento da sua estrutura química (Brumano; Soler; Silva, 2016).

Os sofrorolipídios podem ser produzidos por diversos microrganismos, destacando a levedura *Candida bombicola*, que é uma grande produtora, com alto rendimento, ausência de patogenicidade e a incapacidade de colonizar tecidos, podendo ser usada na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética por ser considerada segura para saúde humana (GRAS) (Van Bogaert; Zhang; Soetaert, 2011).

*C. bombicola* produz soforolipídios com diferentes isômeros em suas formas ácidas e lactônicas. Devido essa amplitude de formas, que variam desde formas ácidas muito polares a lactônicas apolares, podendo ser acetiladas ou não torna-se difícil uma separação efetiva de cada grupo estrutural dessas moléculas (Smyth et al., 2014). Essa variedade estrutural faz com que a busca por diferentes métodos de identificação e caracterização seja objetivo de estudos para colaborar com as aplicações (Hirata et al., 2009)

A caracterização dos soforolipídios de *C. floricola* foram realizadas por CLAE onde foi identificada a glicose como o açúcar presente na estrutura, CG-MS identificou a composição dos ácidos graxos e por NMR foi confirmado que 95% dos soforolipídios são formas acídicas acetiladas (6',6''-di-O-acetylated) e que essa linhagem não produziu forma lactônica (Konishi et al. 2017).

Bajaj e Annapure, 2015 analisaram as estruturas dos soforolipídios de *S. bombicola* produzidos em óleo rico em ácido ricinoleico (*ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenóico*), por várias técnicas analíticas associadas, destacando LC-MS e <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H NMR e os resultados indicaram que 98,1% forma lactônicos. e que o ácido ricinoleico foi incorporado na molécula de soforolipídio, podendo ser aplicado com surfactante, agente antimicrobiano, cosmético e emulsificante.

Ribeiro et al., 2016 identificaram os componentes da mistura dos soforolipídios, produzido por esse mesmo microrganismo, em meio a base de glicose e peptona, por (HPLC-ELSD), (LC-ESI-MS), cromatografia líquida com ionização por eletrospray e espectrometria de massa (LC-ESI-MS/MS) e otimizaram a separação e identificação das formas acídicas e lactônicas, predominando 93,2% de lactônicos que se torna importante para diferentes atividades biológicas.

A identificação dos componentes dos soforolipídios produzidos por *Rhodotorula bogoriensis* foi realizada por HPLC-MS e os autores confirmaram a predominância da forma

acídica com o 13-hydroxydocosanoic acid (OH-C22) desacetilado, que foi testada para a atividade antimicrobiano (Solaiman et al. 2015).

Hoa et al., 2017 caracterizaram os sofrorolipídios de *C. bombicola* produzidos em melaço de cana de açúcar e óleo de coco por CCD e CLAE e os resultados mostraram predominância de sofrorolipídios lactônicos diacetilados com C18:1 e C18:2

Os métodos de identificação, caracterização e purificação dos componentes da mistura de sofrorolipídios são determinantes para elucidar as estruturas químicas dos diferentes sofrorolipídios, que poderá correlacionar às futuras aplicações. O objetivo deste estudo foi separar, purificar, caracterizar e identificar por diferentes técnicas analíticas e preparativas, os componentes da mistura dos sofrorolipídios produzidos por *C. bombicola* em gordura residual da indústria avícola.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 *Materiais e Solventes*

Os materiais foram: glicose (Biotec), extrato de levedura (Reactec), peptona (Acumedia), extrato de malte (Himedia), ágar (Himedia), ureia (Biosolve), gordura residual de frango (Industria da região), Sílica Gel 60G (Merck), placa de Sílica Gel 20 x 20 cm (Alugram<sup>®</sup> Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>) e padrão de sofrorolipídios 1',4"-Sophorolactona 6', 6"-diacetate (Sigma Aldrich). Solventes foram: acetato de etila (Reactec), metanol PA (CRQ), hexano (Dinâmica), clorofórmio PA (Synth), água destilada, água ultrapura (Sistema USF Elga Maxima), metanol grau MS (LiChrosolv), acetonitrila PA (J.T Baker) e Clorofórmio deuterado (Sigma Aldrich).

### 2.2 *Produção de sofrorolipídios*

*Candida bombicola* (ATCC 22214<sup>™</sup>) foi preservada em (g L<sup>-1</sup>): 10 de glicose, 3 de extrato de levedura, 5 de peptona, 3 de extrato de malte e 20 de ágar, mantidos por 48 h a 30

°C e estocada a 4°C. O meio de inoculo foi em (g L<sup>-1</sup>): 100 de glicose, 10 de extrato de levedura e 1 de ureia e o meio de fermentação composto em (g L<sup>-1</sup>): 77,5 de glicose, 2,5 de extrato de levedura, e 75 de gordura de frango (Minucelli et al., 2017). A produção de soforolipídios foi em biorreator de bancada (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda., capacidade de 5,0 L) com 4 L do meio de fermentação a 30 °C, taxa de aeração 1,0 vvm e agitação de 450 rpm e inóculo de 10 % (v/v). Ao final de 120 horas os soforolipídios produzidos foram extraídos e caracterizados.

### *2.3 Extração de Soforolipídios*

Os soforolipídios foram extraídos do meio fermentado com acetato de etila (1:1; v/v, 3x) em funil de separação. O solvente orgânico foi rotaevaporado, formando o extrato bruto (EB), que foi solubilizado em metanol/água (4:1; v/v) e particionado com hexano (1:1; v/v), para retirar a gordura residual do EB. A fase hexânica contendo a gordura residual foi seca a 70 °C e quantificada por gravimetria, a metanólica foi removida com evaporação sob pressão reduzida 60°C, formando extrato com soforolipídios (ESL). Para remover resíduos hidrofílicos esse extrato foi homogeneizado em acetato de etila e água (1:3; v/v) três vezes, com 40 min de repouso a 4 °C. A mistura de soforolipídios foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD) (Haque et al., 2016).

### *2.4 Análise e Caracterização de Soforolipídio*

O extrato com soforolipídios (ESL) foi submetido as técnicas de CCD e CLAE analíticas e preparativas. As amostras das técnicas preparativas e o extrato com soforolipídios foram também analisados por UHPLC-MS/MS

#### *2.4.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)*

A CDD preparativa foi com fase estacionária sílica gel 60 F<sub>254</sub> (20 x 20 cm) e fase móvel metanol/diclorometano (1:1) acidificada com 7 % de solução de ácido acético

(1%), revelada por luz UV. As bandas foram extraídas da fase estacionária com acetato de etila seguido de metanol. As frações resultantes foram analisadas por UHPLC-MS/MS para identificação das diferentes estruturas dos sofrorolipídios (Rau, 1999; Ribeiro, 2012 modificado). A CCD analítica foi realizada nas mesmas condições da preparativa diferindo na revelação com p-anisaldeído a 110 °C por 20 minutos (Haque, 2016, modificado).

#### 2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para CLAE analítica foi utilizada a coluna Shim-pack CLC-ODS(M)<sup>®</sup> C18 (4,6 x 250 mm; 4,6 µm; 12 nm), bomba LC-20AT, detector SPD-M20A, auto amostrador SIL-20AHT, forno CTO-20<sup>a</sup>, degasser DGU-20A<sub>5R</sub> e software LabSolution (Shimadzu). A fase móvel foi água (A) e acetonitrila (B) com gradiente de eluição inicial em 30 % de B até 5 min, depois com 80 % de B em 30 min, permanecendo com 80 % de B até 55 min, retornando a 30 % de B em 60 min e tempo de equilíbrio até 62 min, na vazão de 0,50 mL/min (Wadekar, 2012). As amostras do extrato com sofrorolipídios diluídas em metanol, filtradas em Millex<sup>®</sup> 0,45 µm (Merck Millipore) e injeção de 20 µL. A detecção em  $\lambda = 207$  nm. Após definição do solvente a CLAE preparativa foi realizada com a coluna Betasil C18, bomba LC-6AD, detector SPD-10 A e software CLASS-CR10, fluxo 1,8mL/min por 140 minutos, injeção 1mL em acetonitrila a 65,4% em água.

#### 2.4.3 Ultra Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas (UHPLC-MS/MS)

As frações de sofrorolipídios da CCD, CLAE preparativas e o extrato com sofrorolipídios foram analisados por sistema cromatográfico Shimadzu LC-20AD, detector SPD-20A, auto amostrador SIL-20AHT, forno CTO-20A, degasser DGU-20<sup>a</sup><sub>3R</sub>, coluna Shimadzu C18 Shim-pack XR-ODS<sup>®</sup> C18 (2,0 x 75 mm; 2,2 µm; 12 nm). Compact triple-quadrupole ESI-OTOF II equipado com fonte de ionização eletrospray (ESI) (Bruker<sup>®</sup>, Cologne, Alemanha). Condições de ionização do eletrospray (ESI): voltagem 3,200 kV, temperatura do gás de secagem 200 °C, fluxo de gás do cone de 9 L/min, pressão do nebulizador de 4 bar, modo negativo, análise

dos dados pelo software Bruker DataAnalysis 4.2. Fase móvel água (A) e acetonitrila (B) com gradiente de eluição iniciando em 20 % de B até 0,5 min, elevando a 80 % de B em 12 min e permanecendo até 17 min; retornando a 20 % de B em 19 min e tempo de equilíbrio até 20 min. Vazão de 0,20 mL/min e injeção de 1,0 µL. Todas as amostras foram solubilizadas em metanol MS e filtradas com Millex<sup>®</sup> 0,22 µm (Merck Millipore).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Análise e Caracterização dos soforolipídios

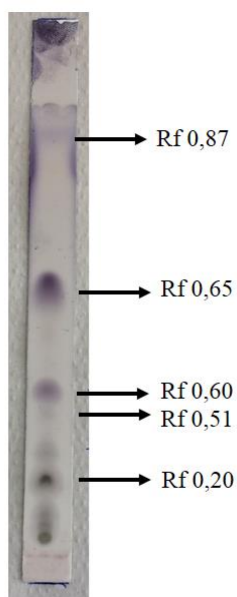
As técnicas de CCD e CLAE são utilizadas para separação e quantificação dos soforolipídios, para isso requerem um padrão de congêneres puro. Embora esses congêneres sejam comercializados, técnicas cromatográficas preparativas CCD e CLAE são necessárias para isolar os congêneres, evitando sobreposição ou supressão de sinal de compostos em menor quantidade (Clauss e Van Bogaert, 2017).

##### 3.1.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Foram avaliadas diferentes misturas de fases móveis: metanol e clorofórmio (1:1) (Koh e Gross, 2016); clorofórmio, metanol e água (65:15:2) (Ribeiro et al., 2012) e metanol e diclorometano (1:1) com 5% ou 7% de H<sub>2</sub>O acidificada (com 1 % ácido acético). A fase que apresentou melhor capacidade de separação dos soforolipídios acídicos e lactônicos foi metanol e diclorometano (1:1) com 7% de H<sub>2</sub>O acidificada com 1 % ácido acético e também usada na CCD preparativa.

Pela Figura 1 é possível observar a separação dos soforolipídios produzidos por *C. bombicola*, o R<sub>f</sub> 0,20 é atribuído aos acídicos e os R<sub>f</sub> 0,50 e 0,60 aos lactônicos. Os R<sub>f</sub> 0,65 e 0,87 são possivelmente contaminantes de baixa polaridade, extraídos juntos com o soforolipídios produzidos por *C. bombicola*.

**Figura 1** - Cromatografia de camada delgada (CCD analítica) do sofrorolipídio de *Candida bombicola* ( $R_f$  = Realtive front).



Pela CCD preparativa foi possível observar os  $R_f$  0.14 (CCD1) e  $R_f$  0.44 (CCD2) correspondendo aos acídicos e os lactônicos respectivamente, dados comparados com dos autores Mousavi et al., 2015, que descreveram a presença de acídicos localizados na parte inferior da CCD e os lactônicos na superior de acordo a polaridade.

As frações CCD 1 e CCD 2 foram extraídas da sílica com metanol, identificadas e caracterizadas por UHPLC-MS/MS (Figura 2).

### 3.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato com sofrorolipídios foi submetido à separação por CLAE preparativa com fase móvel do sistema isocrática (65,4% de acetonitrila) estabelecida pelo gradiente de eluição do ítem 2.4.2, na CLAE analítica.

Três amostras foram coletadas nos intervalos de 13,3 a 40,3; 40,9 a 61,6 e 61,6 a 120 min para identificadas e caracterizadas por UHPLC-MS/MS.

Pela Figura 3 foi possível observar a separação de três grupos, sendo um acídico (Fração 1), um lactônico (Fração 3) e uma mistura de acídicos e lactônicos (Fração 2). Essa

separação foi possível devido à padronização do sistema de eluição isocrática aqui padronizado e aplicado por Davila et al., 1993.

### *3.2 Ultra Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massa (UHPLC-MS)*

A análises dos soforolipídios por UHPLC-MS se faz necessária pela ampla variedade estrutural de seus congêneres. Essa técnica assegura a identificação e caracterização dos soforolipídios (Hu e Ju, 2001).

Considerando essa variabilidade de estruturas, a separação dos soforolipídios por UHPLC nesse trabalho foi satisfatório, separando com eficiência as diversas estruturas e com sobreposição apenas do lactônico C18:1 (monoacetilado) e acídicos C18:1 (diacetilado). A Tabela 1 descreve os diferentes soforolipídios do extrato produzidos por *C. bombicola* e suas proporções.

**Tabela 1** – Estruturas de soforolipídios, massa molecular e proporção estrutural (%) identificados por UHPLC-MS/MS produzidos por *C. bombicola* em resíduo lipídico.

| <b>Massa Molecular [M-1]</b> | <b>Estruturas dos Soforolipídios produzidos</b> | <b>% / área</b> |
|------------------------------|---|-----------------|
| 619                          | Lactônica, C <sub>16:0</sub> , Diacetetilada    | 1,02            |
| 643                          | Lactônica, C <sub>18:2</sub> , Monoacetetilada. | 1,10            |
| 645                          | Lactônica, C <sub>18:1</sub> , Monoacetetilada  | 1,60            |
| 647                          | Lactônica, C <sub>18:0</sub> , Monoacetetilada  | 4,43            |
| 659                          | Acídico, C <sub>18:3</sub> , Monoacetetilada    | 0,04            |
| 661                          | Acídica, C <sub>18:2</sub> , Monoacetetilada    | 0,50            |
| 661                          | Lactônica, C <sub>16:0</sub> , Diacetetilada    | 4,04            |
| 663                          | Acídica, C <sub>18:1</sub> , Monoacetetilada    | 0,90            |
| 679                          | Acídica, C <sub>16:0</sub> , Diacetilada        | 0,02            |
| 679                          | Acídica, C <sub>16:0</sub> , Diacetetilada      | 0,80            |
| 685                          | Lactônica, C <sub>18:2</sub> , Diacetetilada    | 8,82            |
| 687                          | Lactônica, C <sub>18:1</sub> , Diacetetilada    | 38,02           |
| 689                          | Lactônica, C <sub>18:0</sub> , Diacetetilada    | 21,14           |
| 701                          | Acídica, C <sub>18:3</sub> , Diacetetilada      | 1,60            |
| 703                          | Acídica, C <sub>18:2</sub> , Diacetetilada      | 2,70            |
| 705                          | Acídica, C <sub>18:1</sub> , Diacetetilada      | 4,30            |
| 707                          | Acídica, C <sub>18:0</sub> , Diacetetilada      | 8,97            |

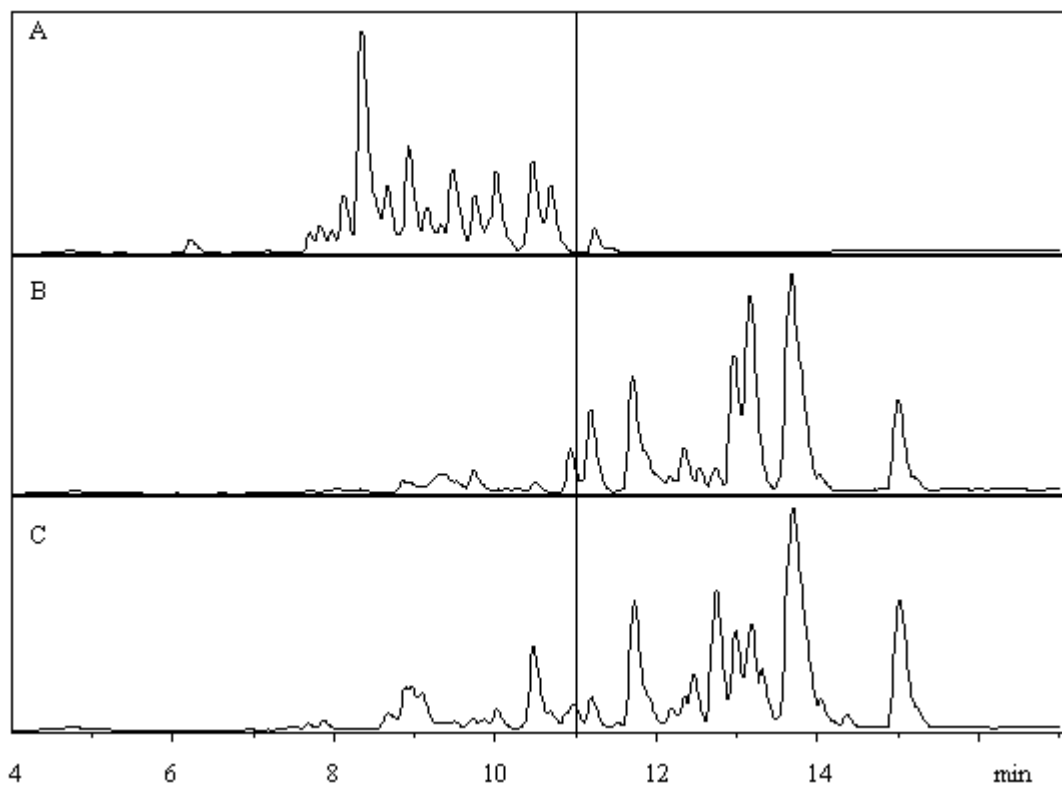
O extrato com soforolipídios apresentaram a composição de 80,17% de formas lactônicas e 19,83% acídicas, porém as formas acídicas apresentaram grande diversidade quando comparado a outros trabalhos (Hu e Ju, 2001; Nuñez et al., 2001; Ribeiro et al., 2012, Konishi et al., 2017).

As formas predominantes foram lactônicas diacetiladas C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:0</sub> e C<sub>18:3</sub> com 38,02; 21,17 e 8,82% do total de soforolipídios produzidos em gordura de frango, que apresentou na sua composição altas concentrações de C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:2</sub> (Minucelli et al., 2017)..

Os sofrorolípídios acídicos foram também mono e di-acetilados, predominando C18:0 (8,97%); C18:1(4,3%); C18:2 (2,7%) e C18:3 (1,6%). Foi possível observar que maior parte dos sofrorolípídios produzidos foram diacetilado (91,43%,) possivelmente esse fato é decorrente a maior aeração utilizada no processo fermentativo (Ratsep e Shah, 2009).

A Figura 2 apresenta as frações obtidas da CCD1 (A), CCD2 (B) e extrato de sofrorolípídios (C) por UHPLC-MS. Na Figura 2 A e 2B estão os sofrorolípídios acídicos e lactônicos extraídos da CCD preparativa respectivamente. A Figura 1C apresenta os acídicos e lactônicos do extrato com sofrorolípídios. Esses resultados demonstram que a técnica CCD preparativa foi eficiente pois além de separar os dois grupos favoreceu o ganho de sinal dos acídicos (Figura 2 A) comparando com extrato de sofrorolípídio (Figura 2C).

**Figura 2-** Cromatogramas (UHPLC-MS/MS) do extrato de sofrorolípídios e da purificação por CCD preparativa.

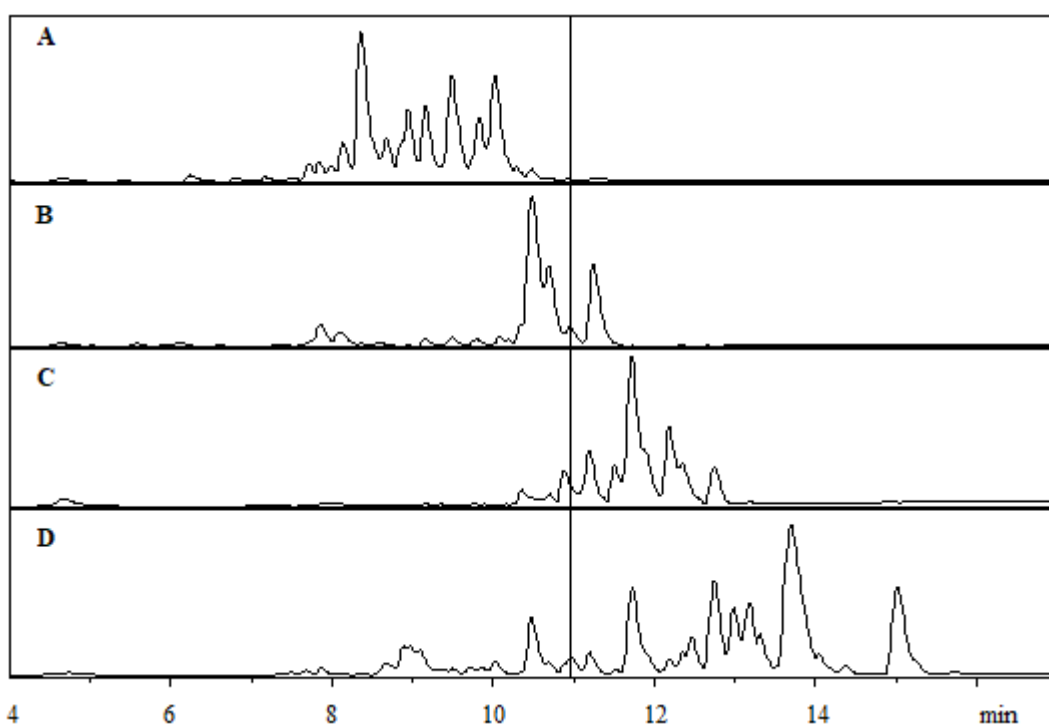


(A) Soforolípídios presentes na fração CCD1. (B) Cromatograma de sofrorolípídios presentes na fração CCD2. (C) Cromatograma do extrato de sofrorolípídios.

As 3 frações obtidas da CLAE preparativa foram analisadas por UHPLC-MS (Figura 3 A, B e C) e D o extrato com sofrorolipídios (Figura 3D). A fração 1 (Figura 3A) separou os sofrorolipídios acídicos, a fração 3 (Figura 3C) os lactônicos e a fração 2 (Figura 3B) é a mistura de sofrorolipídios acídicos e lactônico. Esses resultados são equivalência aos obtidos pela técnica CCD preparativa exceto a fração 2 que contém ambos os grupos (acídicos e lactônico).

Alguns sofrorolipídios acídicos C16:0 di-acetetilado (680) (0,82%); C18:3 mono-acet. (660) (0,04%) provavelmente ficaram retidos na CCD preparativa, ela forte polaridade da fase estacionária e baixa concentrações desses sofrorolipídios. Na técnica CLAE preparativa, os sofrorolipídios lactônicos C16:0 di-acet. (662), C18:0 di-acet. (690) e C18:1 di-acet. (688) provavelmente ficaram retidos na coluna, por apresentar baixa polaridade.

**Figura 3-** Cromatogramas (UHPLC-MS/MS) do extrato de sofrorolipídios e da purificação por CLAE preparativa.



(A) Cromatograma de sofrorolipídios presentes na fração 1. (B) Cromatograma de sofrorolipídios presentes na fração 2. (C) Cromatograma de sofrorolipídios presentes na fração 3. (D) Cromatograma do extrato de sofrorolipídios.

As técnicas identificação e caracterização dos soforolipídios produzidos por *C. bombicola*, em resíduo lipídico da indústria avícola foram eficientes e conclusivas, destacando que alguns soforolipídios acídicos, em baixa concentração, que dificilmente seriam detectados e caracterizados foram encontrados no extrato de soforolipídios. Essas técnicas definem as diversas estruturas dos soforolipídios, o que podem ser direcionadas para aplicações industriais

### **Conclusão**

As técnicas de CCD, CLAE e UHPLC-MS/MS permitiram elucidar a composição e variabilidade dos soforolipídios produzidos por *C. bombicola* em resíduo lipídico. Predominaram lactônicos com 80,17% sendo o diacetilados (C18:1) com 38,02%. Também variedade soforolipídios acídicos presentes foi maior que na maioria dos trabalhos, e um soforolipídios com três instaurações foi encontrado o que é pouco convencional (acídico mono-acet. C18:3; soforolipídio acídico di-acet. C18:3).

As duas técnicas preparativas empregadas (CCD e CLAE) são pouco utilizadas na purificação de misturas de soforolipídios, normalmente é aplicada cromatografia clássica (em coluna). Pelos resultados obtidos neste estudo, a CCD preparativa é promissora em relação as outras duas técnicas, apresenta baixo custo, menor tempo de análise e eficiência similar as demais técnicas.

## Referências

ASMER, H.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V. Siegmund. & Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion of Sophorose Lipids. v. 65, n. 9, p. 1460–1466, 1988.

BACCILE, N.; CUVIER, A.S.; VALOTTEAU, C.; VAN BOGAERT, I.N.A. Practical methods to reduce impurities for gram-scale amounts of acidic sophorolipid biosurfactants. *Eur J Lipid Sci Technol*. v. 115, p. 1404–1412, 2013.

BAJAJ, V.; TILAY, A.; ANNAPURE, U. Enhanced Production of Bioactive Sophorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by Design of Experiment Approach with Successive Purification and Characterization. v. 386, n. 7, p. 377–386, 2012.

BRUMANO, P.L.; SOLER, F.M.; SILVA, S.S. Recent Advances in Sustainable Production and Application of Biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**. v. 12, n. 1, p. 1–9, 2016.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **International Journal of Science and Nature**, v. 2, n. 1, p. 63–71, 2011.

CLAUS, S.; VAN BOGAERT, Produção de sophorolípidos por leveduras: uma revisão crítica da literatura e sugestões para futuras pesquisas. **IN Appl Microbiol Biotechnol**. n. 101, p. 7811-7821, 2017.

CIESIELSKA, K.; VAN BOGAERT, N.I; CHEVINEAU, S.; LI, B.; GROENEBOER, S.; SOETAERT, W.; VAN DE PEER, Y.; DEVREESE, B. Exoproteome analysis of *Starmerella bombicola* results in the discovery of an esterase required for lactonization of sophorolipids. **Journal of Proteomics**. v. 8 p. 159-174, 2014.

- DAVILLA, A.M.; MARCHAL, R.; MONIN, N.; VANDECASTEELE, J.P. Identification and determination of individual sophorolipids in fermentation products by gradient elution high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J Chromatogr A*. v. 648 p. 139–149, 1993
- HAQUE, F.; ALFATAH, M; GANESAN, K.; BHATTACHARYYA, S. M. Inhibitory Effect of Sophorolipid on *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Growth. **Scientific reports** v. 6, n. September 2015, p. 23575, 2016.
- HIRATA, Y.; RYU, M.; ODA, Y.; IGARASHI, K.; NAGATSUKA, A.; FURUTA, T.; SUGIURA, M. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants, **J. Biosci. Bioeng.** n. 108, p. 142-146, 2009.
- HOA, H. L. N.; LOAN, Q. L.; EUN-KI, K.; HA, T. T; DUY, D. N.; KHANH, Q. H.; DUNG, H. N. Production and characterization of sophorolipids produced by *Candida bombicola* using sugarcane molasses and coconut oil. v. 22, n. 2, p. 66–75, 2017
- HU, Y.; JU, L. K., Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS, **Technol.** ed 29 p.593-601, (2001).
- KONISHI, M.; YOSHIDA, Y.; HORIUCHI, J. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 119, n. 3, p. 317–322, 2015.
- KOH, A.; LINHARDT, R. J.; GROSS, Ri. Effect of Sophorolipid n-Alkyl Ester Chain Length on Its Interfacial Properties at the Almond Oil-Water Interface. **Langmuir** v. 32, n. 22, p. 5562–5572, 2016.
- RATSEP, P.; SHAH, V. Identification and quantification of sophorolipid analogs using ultra-fast liquid chromatography – mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods** v. 78, n. 3, p. 354–356 , 2009.

- RAU, U.; HECKMANN, R.; WRAY, V.; LANG, S. Enzymatic conversion of a sophorolipid into a glucose lipid. **Biotechnology Letters** v. 21, p. 973–977, 1999.
- RIBEIRO, A. I.; BRONZE, R. M.; CASTRO, F. M.; RIBEIRO, L.H.M. Optimization and correlation of HPLC-ELSD and HPLC – MS / MS methods for identification and characterization of sophorolipids. **Journal of Chromatography B** v. 899, p. 72–80, 2012.
- RIBEIRO, A.C.I.; BRONZE, R.M.; CASTRO, F.M; RIBEIRO, L.H.M. Selective recovery of acidic and lactonic sophorolipids from culture broths towards the improvement of their therapeutic potential. **Bioprocess Biosystems Engineering**, 2016.
- MINUCELLI, T.; VIANA, R.M.R.; BORSATO, D.; GALDINO, B.A; CELY, M.T.V.; 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. 7, n. 3, p. 1–11, 2017.
- MOUSAVI, F.; BEHESHTI-MAAL, K.; MASSAH, A. Production of sophorolipid from an identified current yeast, *Lachancea thermotolerans* BBMCZ7FA20. **Isol Honey Bee Curr Microbiol.**;n.71 p. 303, 2015.
- NUÑEZ A, ASHBY RD, FOGLIA TA, SOLAIMAN DKY Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. **Chromatographia** p. 53:673, 2001.
- VAN BOGAERT, I. N. A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 821–833, 2011.
- SOLAIMAN, K. Y. D.; ASHBY, D. R.; CROCKER, V. N. High-titer production and strong antimicrobial activity of sophorolipids from *Rhodotorula bogoriensis*. **Biotechnology Progress** v. 31, n. 4, p. 867–874, 2015.

SHAH,H.U.M; SIVAPRAGASAM,M.; MONIRUZZAMAN,M.; TALUKDER,R.M.M.; YUSUP,B.S.; GOTO, M. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. **Biochemical Engineering Journal** v. 127, p. 60–67, 2017.

SMYTH, T. J. P.; RUDDEN, M.; TSAOUSI, K.; MARCHANT, B.; BANAT, I.M.. Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids, **Springer Protocol Handbooks**, p. 29-60, 2014.

WADEKAR, S.; KALE, S.; LALI, A. Sophorolipid Production by *Starmerella bombicola* ( ATCC 22214 ) from Virgin and Waste Frying Oils , and the Effects of Activated Earth Treatment of the Waste Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, p. 1029–1039, 2012.

5.3 Patente: Processo de utilização da gordura residual da indústria de frango para a produção de Soforolipídios.

Número do Processo: BR 10 2017 012044 9.

## 6 CONCLUSÕES

A produção e produtividade de soforolipídios na gordura residual da indústria avícola atingiram  $27,86 \text{ g L}^{-1}$  e  $1,16 \text{ g/L h}^{-1}$  respectivamente, demonstrando que esse resíduo foi promissor para a obtenção desse biossurfactante.

Durante o acompanhamento da fermentação o pH reduziu de 6,0 para 3,7 que é próximo ao ótimo para a produção de soforolipídios por *C. bombicola*. Os consumos de gordura de frango e glicose aumentaram com o tempo de fermentação e atingiram  $47,86 \text{ g L}^{-1}$  (63,8 %) e  $56,42 \text{ g L}^{-1}$  (77,8%) respectivamente em 120h.

Os soforolipídios produzidos foram identificados e caracterizados por diferentes técnicas e apresentaram predominância das formas acídicas C18:2 monoacetilado (73,55 %) e lactônicas C18:1 diacetilado (26,44 %).

Os soforolipídios de *C. bombicola* apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas nas concentrações de 500  $\mu\text{g/ml}$  e 2000  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, demonstrando eficiente propriedade antibacteriana contra patógenos da área da saúde.

Esses resultados podem contribuir com informações uteis, para utilização da gordura residual da indústria de frango, para a produção de soforolipídios, bem como, a possibilidade de aplicação desse metabolito como um antimicrobiano natural, sem causar risco à saúde humana e animal.

## REFERÊNCIAS

- ASHBY, D. R.; ZERKOWSKI, A.J.; SOLAIMAN, Y.K.D.; LIU, S.L. Biopolymer scaffolds for use in delivering antimicrobial sophorolipids to the acne-causing bacterium *Propionibacterium acnes*. **New Biotechnology** v. 28, n. 1, p. 24–30, 2011.
- ASMER, H; LANG, S.; WAGNER, F; WRAY, V. Siegmund & Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion of Sophorose Lipids, v. 65, n. 9, p. 1460-1466, 1988.
- BHANGALE, P. A.; WADEKAR, D. S.; KALE, B.S.; PRATAP, P. A. Sophorolipids Synthesized Using Non-Traditional Oils with Glycerol and Studies on Their Surfactant Properties with Synthetic Surfactant. **Special theme: Green surfactants** v. 51, p. 387–396, 2014.
- BRUMANO, P.L.; SOLER, F.M.; SILVA, S.S. Recent Advances in Sustainable Production and Application of Biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**. v. 12, n. 1, p. 1–9, 2016.
- CIESIELSKA, K.; VAN BOGAERT, N.I; CHEVINEAU, S.; LI, B.; GROENEBOER, S.; SOETAERT, W.; VAN DE PEER, Y.; DEVREESE, B. Exoproteome analysis of *Starmerella bombicola* results in the discovery of an esterase required for lactonization of sophorolipids. **Journal of Proteomics**. v. 8 p. 159-174, 2014.
- CIESIELSKA, K.; ROELANTS, W.K.L.S; BOGAERT, V.; WAELE, D.S.; VANDENBERGHE, I.; GROENEBOER, S.; SOETAERT, W.; DEVREESE, B. Characterization of a novel enzyme — *Starmerella bombicola* lactone esterase ( SBLE ) — responsible for sophorolipid lactonization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 2016.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22nd informational supplement. Wayne,PA: CLSI; 2015.
- CORTÉS-SÁNCHEZ, A.D. J.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. **Microbiological Research** v. 168, n. 1, p. 22–32, 2013.
- CAVALERO, A. D; COOPER, G. D. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Journal of Biotechnology**. v. 103, p. 31–41, 2003.
- COOPER, D G; PADDOCK, D A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology** v. 47, n. 1, p. 173–176, 1984.
- DAVILA, A.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lippid production by *Candida bombicola*. p. 6–11, 1992.

- DAVEREY, A. PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International** v. 42, n. 4, p. 499–504, 2009.
- DENGLE PULATE, V.; BHAGWAT, S.; PRABHUNE, A. Microbial Oxidation of Medium Chain Fatty Alcohol in the Synthesis of Sophorolipids by *Candida bombicola* and its Physicochemical Characterization. **Journal of Surfactants and Detergents** p. 1–9, 2012.
- DENGLE-PULATE, V.; CHANDORKAR, P.; BHAGWAT, S.; PRABHUNE, A.A.; Antimicrobial and SEM Studies of Sophorolipids Synthesized Using Lauryl Alcohol.p. 543-552, 2013.
- DEVELTER, D. W. G.; LAURYSSSEN, L. M. L. Properties and industrial applications of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology** v. 112, n. 6, p. 628–638, 2010.
- DESAI, D.J.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.
- DÍAZ DE RIENZO, A. M.; BANAT, M. I.; DOLMAN, B.; WINTERBURN, J.; MARTIN, J. P. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. **New Biotechnology** v. 32, n. 6, p. 720–726, 2015.
- DOLMAN, M. B.; KAISERMANN, C.; MARTIN, J. P.; WINTERBURN, B. J. Integrated sophorolipid production and gravity separation. **Process Biochemistry**, 2016.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956
- DELBEKE, E. I. P.; ROELANTS, W.K.L; MATTHIJS, N.; EVERAERT, B.; SOETAERT, W.; COENYE, T.; GREEM, V.M.K.; STEVENS, V. C. Sophorolipid amine oxide production by a combination of fermentation scale-up and chemical modification Sophorolipid amine oxide production by a combination of fermentation scale-up and chemical modification. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2016.
- FRAKRUDDIN, M. Biosurfactant : Production and Application. **Petroleum & Environmental** v. 3, n. 4, 2012.
- GROSS, R., GUILMANOV, V., SCHOLZ, C. Glycolipids from *Torulopsis bombicola*: biosynthesis, lipase-selective modification and anti-cancer activity. **Book of abstracts, 217th ACS National Meeting**. 1999
- HAQUE, F.; ALFATAH, M; GANESAN, K.; BHATTACHARYYA, S. M. Inhibitory Effect of Sophorolipid on *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Growth. **Scientific reports** v. 6, n. September 2015, p. 23575, 2016.

- HOMMEL, R.K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RILKE, O.; KLEBER, H.P. Produção de lípidos de sophorose por *Candida (Torulopsis) apicola* crescida em glicose. **Journal of Biotechnol** 33 (2): 147-155, 1994.
- HOA, H. L. N.; LOAN, Q. L.; EUN-KI, K.; HA, T. T; DUY, D. N.; KHANH, Q. H.; DUNG, H. N. Production and characterization of sophorolipids produced by *Candida bombicola* using sugarcane molasses and coconut oil. v. 22, n. 2, p. 66–75, 2017.
- JIA, X.; QI, L.; ZHANG, Y.; YANG, X.; WANG, H. ZHAO, F.; LU, W. Computational fluid dynamics simulation of a novel bioreactor for sophorolipids production. **CJCHE**, 2016.
- JONES, D. F. Novel macrocyclic glycolipids from *Torulopsis gropengiesseri*. **Journal of the Chemical Society**, v. 39, p. 479–484, 1967.
- KAUR, S.K; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. **Microbial cell Factories** p. 1–10, 2011.
- KOH, A.; LINHARDT, R. J.; GROSS, Ri. Effect of Sophorolipid n-Alkyl Ester Chain Length on Its Interfacial Properties at the Almond Oil-Water Interface. **Langmuir** v. 32, n. 22, p. 5562–5572, 2016.
- KONISHI, M.; YOSHIDA, Y.; HORIUCHI, J. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 119, n. 3, p. 317–322, 2015.
- LENTH, R. V. Response-surface methods in R, using RSM. **Journal of Statistical Software**, v. 32, n. 7, p. 1–17, 2009.
- 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 domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. **AMB Express** v. 6, n. 1, p. 60, 2016.
- MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters** v. 34, n. 9, p. 1597–1605 , 2012.
- MINUCELLI, T.; VIANA, R.M.R.; BORSATO, D.; GALDINO, B.A; CELY, M.T.V.; 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. 7, n. 3, p. 1–11, 2017.
- MORYA, V. K.; PARK. J.; KIM, J. T.; JEON, S.; KIM, E. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource technology** v. 143, p. 282–8, 2013.
- OTTO, R. T.; DANIEL, H.J; PEKIN, G.; MÜLLER-DECKER, K.; FÜRDTENBERGER, G; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids from whey: II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 52, n. 4, p. 495–501, 1999.0175-7598.

PEKIN G, VARDAR-SUKAN F, KOSARIC N. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using turkish corn oil and honey. **Eng Life Sci.** p.357–62, 2005.

RAU, U.; HECKMANN, R.; WRAY, V.; LANG, S. Enzymatic conversion of a sophorolipid into a glucose lipid. **Biotechnology Letters** v. 21, p. 973–977, 1999.

R Core Team. R: **A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

RIBEIRO, A. I.; BRONZE, R. M.; CASTRO, F. M.; RIBEIRO, L.H.M. Optimization and correlation of HPLC-ELSD and HPLC – MS / MS methods for identification and characterization of sophorolipids. **Journal of Chromatography B** v. 899, p. 72–80, 2012.

RIBEIRO, A.C.I.; BRONZE, R.M.; CASTRO, F.M; RIBEIRO, L.H.M. Selective recovery of acidic and lactonic sophorolipids from culture broths towards the improvement of their therapeutic potential. **Bioprocess Biosystems Engineering**, 2016.

SANTOS, F.K.D; MEIRA, M.H.; RUFINO, D. R.; LUNA,M. J.; SATUBBO,A.L Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process Biochemistry.** 2016.

SCHOLZ, C., MEHTA, S., BISHT, K., GUILMANOV, V., KAPLAN, D., NICOLOSI, R., GROSS, R. Bioactivity of extracellular glycolipids — investigation of potential anti-cancer activity of sophorolipids and sophorolipid-derivatives. **Polymer Prep.** 39, 168–169, 1998.

SEKHON, K. K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. **Microbial Cell Factories.** p. 1–10 , 2011.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3, p. 591–611, 1965.

SHAH, V.; BADIA, D.; RATSEP, P. WALLNER,S.;GROSS,R.; HAMMERSCHLAG, R, M.; ZENILMAN,E, M; BLUTH,H,M. Sophorolipids Having Enhanced Antibacterial Activity Letters to the Editor Sophorolipids Having Enhanced Antibacterial Activity . v. 51, n. 1, 2007.

SHAH, H. U. M.; SIVAPRAGASAM, M.; MONIRUZZAMAN, M.; TALUKDER, R. M. M.; YUSUP, B. S.; GOTO, M. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. **Biochemical Engineering Journal** v. 127, p. 60–67, 2017.

SLEIMAN, N.J.; KOHLHOFF, A.S.; ROBLIN, M.P.; WALLNER, S.; GROSS, R.;HAMMERSCHLAG, R. M.; ZENILMAN, E. M.; BLUTH, M. H.;. Sophorolipids as Antibacterial Agents. **Annals of Clinical Laboratory Science** v. 39, n. 1, p. 60–63, 2009.

SOLAIMAN, D. K Y; ASHBY, R.D; NUÑEZ, A.; FOGLIA, T.A. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses. n. 1993, p. 1241–1245, 2004.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; ZERKOWSKI, J. A.; FOGLIA, T. A. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnol Lett** v.29, p. 1341-1347, 2007.

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

SOLAIMAN, K.Y.D.; ASHBY, D.R.; BIRBIR, M; CAGLAYAN, P. Antibacterial Activity of Sophorolipids Produced by *Candida bombicola* on Gram-positive and Gram-negative Bacteria Isolated from Salted Hides. v. 111, p. 358–364, 2016.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Biosurfactants from Genes to Applications, Ed. 1<sup>a</sup>. Germany: Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 2011, p. 216, v 8<sup>o</sup>.

SUGITA, T.; NAKASE, T. Non-universal Usage of the Leucine CUG Codon and the Molecular Phylogeny of the Genus *Candida*. **Systematic and applied microbiology** v. 22, n. 1, p. 79–86 , 1999.

SMYTH, T.J. P.; RUDDEN, M.; TSAOUSI, K.; MARCHANT, R.; BANAT, M.I. Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids. **Springer Protocols Handbooks**, 2014.

THANIYAVARN, J.; CHIANGUTHAI, T.; SAGVANICH, P.; ROONGSAWAG, N.; WASHIO, K.; MORIKAWA, M.; THANIYANVARN, S. Production of Sophorolipid Biosurfactant by *Pichia anomala*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** v. 72, n. 8, p. 2061–2068, 2008.

VALOTTEAU, C.; BANAT, M, I.; MITCHELL, C.A.; LYDON, H.; MARCHANT, R.; BABONNEAU, F.; PRADIER, C.; BACCILE, N.; HUMBLLOT, V. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 157, p. 325–334, 2017.

VAN BOGAERT, I. N. A.; SAERENS, K.; MUYNCK, D.C.; DEVELTER, D.; SOETAERT, W.; VANDAMME, J.E. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 76, n. 1, p. 23–34, 2007.

VAN BOGAERT, I. N. A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 821–833, 2011

WADEKAR, S.; KALE, S.; LALI, A. Sophorolipid Production by *Starmerella bombicola* ( ATCC 22214 ) from Virgin and Waste Frying Oils , and the Effects of Activated Earth Treatment of the Waste Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, p. 1029–1039, 2012.

ZHANG, X., ASHBY, R.D., SOLAIMAN, D., LIU, Y., FAN, X. Antimicrobial activity and inactivation mechanism of lactonic and free acid sophorolipids against *Escherichia coli* O157:H7. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 11, n. July, p. 176–18, 2017.