



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VICTÓRIA AKEMI ITAKURA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS
SOFOROLIPÍDIOS DE *Candida bombicola* CONTRA
BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

Londrina
2019

VICTÓRIA AKEMI ITAKURA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS
SOFOROLIPÍDIOS DE *Candida bombicola* CONTRA
BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Londrina
2019

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

Silveira, Victória Akemi Itakura.

Avaliação do potencial antimicrobiano dos soforolipídios de *Candida bombicola* contra bactérias contaminantes da indústria avícola. / Victória Akemi Itakura Silveira. Londrina, 2019.

105 f.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Soforolipídios 2. Processos fermentativos 3. Atividade antibacteriana 4. Patógenos avícolas - Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

VICTÓRIA AKEMI ITAKURA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS
SOFOROLIPÍDIOS DE *Candida bombicola* CONTRA BACTÉRIAS
CONTAMINANTES DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Maria Antonia Pedrine
Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Cristiani Baldo da Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 13 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado a vida e juntamente a ela, pessoas especiais que tornaram a caminhada diária mais leve e alegre.

Agradeço por todo apoio e incentivo que recebo da minha família, minha mãe Márcia e meu pai Eduardo, por terem sempre priorizado a minha educação e minha felicidade, acompanhando de perto e torcendo muito por mim.

À minha orientadora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi pelo enorme aprendizado, oportunidades e crescimento profissional que me proporcionou. Tenho grande admiração pelo seu trabalho e comprometimento com o desenvolvimento científico, assim como da sua enorme disposição e acessibilidade à todos seus alunos. Obrigada pela paciência e incentivo para o desenvolvimento desta pesquisa.

À professora Renata Kobayashi pela parceria e disponibilidade do seu laboratório que contribuíram muito com este trabalho e ao doutorando Erick Nishio pela paciência e grande aprendizado.

Aos meus eternos professores, os quais considero minha família, Mayka e Fábio por sempre estarem ao meu lado, acompanhando as diferentes fases da minha vida, dando apoio e conselhos valiosos, os quais muitos desses me fizeram estar onde estou hoje, meu muito obrigada!

Às pessoas queridas que encontrei durante o mestrado e sei que levarei para a vida, Amanda, Beatriz, Mariane, Leandro, Gabrielly, Eloisi e Christiane por todos os conselhos, incentivo e companheirismo, com certeza o caminho foi muito mais divertido com vocês!

À dupla dinâmica do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Ismael e Nelson por toda dedicação, auxílio e amizade!

Agradeço também as minhas amigas de faculdade, Ana Clara, Rebeca e Raísa, as quais desde o início da graduação compartilhavam do mesmo sonho e hoje, apesar de caminhos diferentes, sempre se mantiveram próximas, acompanhando e torcendo por mim, assim como eu por elas.

Às minhas amigas Daiane, Jaqueline, Milena e Ranubia que me acolheram e fizeram o final da minha graduação ser totalmente diferente do que eu esperava! Muito obrigada pela amizade e carinho.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu respeito e gratidão.

“Go girl, seek happy nights to happy days”
(William Shakespeare)

SILVEIRA, Victória Akemi Itakura. **Avaliação do potencial antimicrobiano dos soforolipídios de *Candida bombicola* contra bactérias contaminantes da indústria avícola.** 2019. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Soforolipídios são biossurfactantes pertencentes à classe de glicolipídios extracelulares compostos por uma molécula de soforose (O β -D-glicopiranosil-2 \rightarrow 1- β -D-glicopiranosose) unida a uma cadeia de ácido graxo. São produzidos por microrganismos, com destaque para a levedura *Candida bombicola*, na forma de uma mistura de estruturas relacionadas, sendo divididas em dois grupos principais: acídicos e lactônicos. Podem apresentar outras variações, as quais influenciam diretamente suas características físico-químicas e biológicas. Dentre as diversas aplicações, os soforolipídios têm chamado atenção por sua ação antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias e fungos. O setor avícola no Brasil apresenta um grande impacto social e econômico, porém perdas de produção ocorrem pela elevada contaminação microbiana. Considerando esses aspectos, o presente trabalho teve como objetivo produzir e verificar a ação antibacteriana de soforolipídios de *C. bombicola* ATCC 22114 contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* e *Clostridium perfringens*, os quais são os principais microrganismos contaminantes da carne de frango. As produções atingiram 71,98; 50,63 e 69,83 g/L nas fermentações com volumes de 50 mL, 100 mL e em biorreator, respectivamente; predominando 95% de formas lactônicas. Os soforolipídios produzidos tiveram ação contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens* e *C. jejuni* e a associação com ácido láctico resultou em interação aditiva para as cepas testadas, com exceção de *E. coli* e *Salmonella*. O soforolipídio apresentou efeito citotóxico em concentrações $\geq 62,5$ μ g/mL, portanto a associação com o ácido láctico em concentrações $\leq 0,6$ %, apresenta viabilidade de aplicação do soforolipídio como agente sanitizante com ausência de toxicidade. Assim, o soforolipídio se apresenta como um produto inovador com perspectiva de aplicação na indústria avícola, para a redução da contaminação e aumento da produtividade industrial.

Palavras-chave: Soforolipídios. Processos fermentativos. *Candida bombicola*. Patógenos avícolas. Atividade antibacteriana. Ácido láctico.

SILVEIRA, Victória Akemi Itakura. **Evaluation of the antimicrobial potential of sophorolipids produced by *Candida bombicola* against bacteria of the poultry industry.** 2019. 105 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Sophorolipids are biosurfactants belonging to the extracellular glycolipid class, composed of a sophorose moiety (O β -D-glycopyranosyl-2 \rightarrow 1- β -D-glucopyranose) linked to a fatty acid chain. It is produced by a variety of microorganisms, highlighting the yeast *Candida bombicola*, in a mixture of related structures, divided in two main groups: acidic and lactonic forms. It also may vary in other structures aspects, which has direct influence in their physical-chemical and biological characteristics. Among the diverse applications, sophorolipids has increased attention due to their antimicrobial activities against various bacteria and fungi. The Brazilian poultry industry represents a social and economic impact, although there are huge losses in the sector due to microbial contamination. Considering these aspects, the present work aimed to produce and verify the antibacterial activity of sophorolipids from *C. bombicola* ATCC 22114 against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens*, which are the major pathogens found in chicken meat. The productions achieved 71.98; 50.63 and 69.83 g/L in the fermentations with 50 mL, 100 mL and in bioreactor, respectively; predominating 95% of lactonic forms. The produced sophorolipids had action against *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens* and *C. jejuni* and the association with lactic acid resulted in an additive interaction for the tested strains, with exception for *E. coli* and *Salmonella*. Sophorolipid presented cytotoxicity at concentrations ≥ 62.5 μ g/mL, thus the combination with lactic acid at concentrations ≤ 0.6 % presents the viability of application of this biosurfactant as a sanitizer agent without toxicity. Therefore, sophorolipids presents itself as an innovative product with perspective of application in the poultry industry, to reduce contamination and increase industrial productivity.

Keywords: Sophorolipids. Fermentation processes. *Candida bombicola*. Antibacterial activity. Chicken pathogens. Lactic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Formas estruturais dos sofrorolipídios: A – lactônica B – acídica20
- Figura 2** – Via da biossíntese de sofrorolipídios24

ANEXO A

- Figure 1a** – Lactonic sophorolipid structure.....81
- Figure 1b** – Acidic sophorolipid structure81
- Figure 2** – Consume of glucose and oleic acid, biomass and sophorolipid production by *C. bombicola* in Fermentation 1 (50 mL), 30 °C, 150 rpm for 288 h81
- Figure 3** – Consume of glucose and oleic acid, biomass and sophorolipid production by *C. bombicola* in Fermentation 2 (100 mL), 30 °C, 150 rpm for 288 h82
- Figure 4** – Consume of glucose and oleic acid, biomass and sophorolipid production by *C. bombicola* in Fermentation 3 (bioreactor), 30 °C, 450 rpm, 1 vvm for 288 h.....82
- Figure 5** – Time-kill assay of *Clostridium perfringens* in treatment absence (Control), lactic acid (LA), sophorolipid (SL) and combination of both (SL + LA)83

ANEXO B

- Figure 1** – Chemical structure of lactonic (A) and acid (B) sophorolipids from *C. bombicola*102
- Figure 2** – Growth curve of *Staphylococcus aureus* in treatment absence (Control), lactic acid (LA), sophorolipid (SL) and combination of both (SL + LA)103
- Figure 3** – Growth curve of *Listeria monocytogenes* in treatment absence (Control), lactic acid (LA), sophorolipid (SL) and combination of both (SL + LA)103

Figure 4 – SEM images of *S. aureus* cells: A - Control, B- 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of sophorolipid, C- 0.31 % of lactic acid and D- 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of sophorolipid + 0.15 % lactic acid for 5 h. Magnification: 15,000 x. Arrows indicate the protuberances and lumps on the surface of cells.....104

Figure 5 – SEM images of *L. monocytogenes* cells: A - Control, B- 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of sophorolipid, C- 0.62 % of lactic acid and D- 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of sophorolipid + 0.31 % lactic acid for 5 h. Magnification: 15,000 x. Arrows indicate the protuberances and lumps on the surface of cells105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores	17
Tabela 2 – Empresas mundiais de produção de biossurfactantes	19
Tabela 3 – Microrganismos produtores de sofrolipídios	21
Tabela 4 – Dados de produção de sofrolipídio variando as condições de cultivo	28
Tabela 5 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de diferentes tipos de sofrolipídio contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	32

ANEXO A

Table 1 – Production, productivity and yield of sophorolipids by <i>C. bombicola</i> in Fermentations 1 (50 mL), 2 (100 mL) and 3 (bioreactor) for 288 h	82
---	----

ANEXO B

Table 1 – Minimum inhibitory concentration and fractional inhibitory concentration of sophorolipid and lactic acid against wild-type isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Listeria monocytogenes</i>	101
--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	BIOSURFACTANTES: MICRORGANISMOS E PRODUÇÃO COMERCIAL	16
3.2	SOFOROLIPÍDIOS: ESTRUTURA E BIOSÍNTESE	19
3.3	CONDIÇÕES DE CULTIVO NA SÍNTESE DE SOFOROLIPÍDIOS	24
3.4	APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS.....	29
3.4.1	Atividade Antimicrobiana	30
3.5	PERSPECTIVAS ATUAIS SOBRE A SEGURANÇA ALIMENTAR EM PROCESSAMENTO DE PRODUTOS AVÍCOLAS.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	MATERIAIS.....	41
4.1.1	Microrganismos	41
4.1.2	Meios de Cultura.....	41
4.1.2.1	Preservação, ativação e pré-inóculo da <i>C. bombicola</i>	41
4.1.2.2	Fermentações.....	41
4.1.2.3	Meios da Atividade Antibacteriana.....	42
4.1.2.4	Meios do Teste de Citotoxicidade.....	42
4.2	MÉTODOS.....	42
4.2.1	Preservação, Ativação e Pré-Inóculo da <i>C. bombicola</i>	42
4.2.2	Produção de Soforolipídios.....	42
4.2.3	Extração e Quantificação dos Soforolipídios	43
4.2.4	Crescimento Microbiano e Consumo de Substratos.....	43
4.2.5	Atividade Antibacteriana do Soforolipídios	44
4.2.5.1	Concentração Inibitória Mínima	44
4.2.5.2	Teste de Checkerboard	44
4.2.5.3	Curva de Crescimento e Morte Bacteriana.....	45

4.2.6	Citotoxicidade	45
4.2.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
4.2.8	Análise Estatística	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	63
	ANEXO A – Application of sophorolipids produced by <i>Candida bombicola</i> against pathogens of poultry industry	64
	ANEXO B – Antibacterial properties of sophorolipids and lactic acid against poultry pathogens.....	83

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de aves no Brasil tem apresentado constantes crescimentos e espera-se, de acordo com as projeções do agronegócio brasileiro realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), uma taxa de crescimento anual de 2,8 % para o período de 2016/17 a 2026/27. Em relação ao consumo, o crescimento anual projetado é de 2,6 %, representando um aumento de 29,5 % no consumo da carne de frango nos próximos dez anos (BRASIL, 2017). Segundo dados do Relatório Anual de 2018 da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), a produção de frango brasileira superou 13 milhões de toneladas, ocupando o segundo lugar mundial. Os estados brasileiros que apresentam uma produção mais expressiva são Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, destacando o Paraná como o maior exportador.

Esse crescimento na produção, aumentou o risco e a preocupação com a transmissão de patógenos, assim como a necessidade de um maior controle da qualidade higiênico e sanitário dos produtos. Os alimentos de origem animal, com destaque para as aves, são os maiores responsáveis pela disseminação de microrganismos causadores de toxinfecções alimentares.

No processamento de abate, algumas etapas são consideradas pontos críticos de controle. Destacando a contaminação que é uma das principais causas de perdas econômicas na indústria, ocorrendo devido a uma diversidade de microrganismos, tais como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, os quais representam um risco potencial à saúde do consumidor. Dessa forma, é importante ressaltar as perdas econômicas ocasionadas por esses microrganismos, seja por custo com tratamentos médicos, como também na produtividade da indústria.

Afim de melhorar a qualidade microbiológica e diminuir essas perdas, estudos têm sido direcionados em busca de alternativas na descontaminação das carcaças de frango. As práticas descritas na literatura abordam o uso de refil, lavagem de carcaças, rinsagem com água quente, pasteurização por vapor, cloro e derivados, ácidos orgânicos e ozônio.

Algumas dessas estratégias são aprovadas e amplamente utilizadas no exterior, como nos Estados Unidos e União Europeia, que permitem o uso de determinados descontaminantes químicos para a remoção bacteriana da superfície

de carnes. A legislação brasileira permite somente a lavagem com água em baixos níveis de cloração, apenas 1 ppm de cloro livre. Desse modo, estudos que apontem para novos agentes sanitizantes que possam ser introduzidos na cadeia produtiva de aves, tais como antimicrobianos naturais, como os soforolipídios, se destacam como uma inovação de importância, podendo contribuir para uma maior competitividade do setor produtivo.

Os soforolipídios, biossurfactantes microbianos e atóxicos, possuem características físico-químicas desejáveis para diversas aplicações industriais e biotecnológicas, sendo de maior destaque atualmente a sua potencial aplicação como agente antimicrobiano para uma série de cepas bacterianas e fúngicas, no tratamento de infecções hospitalares, combate a microrganismos causadores de cáries, aumento do rendimento de plantações por seu emprego no controle de pragas, componente de misturas germicidas para a limpeza de frutas e vegetais, entre outras ações sanitizantes de grande destaque.

Os soforolipídios são glicolipídios produzidos por microrganismos, destacando-se a levedura *Candida bombicola*, que a partir de carboidratos e lipídeos excretam para o meio extracelular uma mistura de compostos de estruturas químicas relacionadas, que apresentam atividade antimicrobiana contra diversos patógenos, inclusive os frequentemente encontrados na indústria avícola. Considerando as propriedades dos soforolipídios que garantem grande aplicação industrial e a capacidade metabólica da *C. bombicola*, este trabalho visou produzir e testar a capacidade antibacteriana dos soforolipídios individualmente e em combinação com ácido láctico contra bactérias contaminantes da carne de frango, para potencial utilização como sanitizante na indústria avícola.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir soforolipídios de *Candida bombicola* e avaliar a capacidade antimicrobiana como sanitizante na indústria avícola.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir soforolipídios de *C. bombicola* por batelada alimentada em frascos agitados e em biorreator de bancada;
- Acompanhar os processos fermentativos por consumo dos substratos hidrofílicos e hidrofóbicos, crescimento microbiano e produção de soforolipídios;
- Extrair, quantificar e identificar os soforolipídios produzidos por gravimetria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Testar a capacidade antibacteriana dos soforolipídios e/ou do ácido láctico contra *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *Clostridium perfringens* ATCC 3623 e os isolados da carne de frango *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*;
- Verificar o efeito citotóxico do soforolipídios em linhagem celular HepG2;
- Analisar por microscopia eletrônica de varredura alterações na morfologia celular das bactérias após os tratamentos com soforolipídios e/ou ácido láctico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BIOSSURFACTANTES: MICRORGANISMOS E PRODUÇÃO COMERCIAL

Com a crescente preocupação ambiental nas últimas décadas, a procura por alternativas aos surfactantes sintéticos tem aumentado, levando à um maior destaque para os surfactantes obtidos de microrganismos. Estes são chamados de biossurfactantes e possuem inúmeras vantagens sobre os derivados químicos, como biodegradabilidade e sustentabilidade, baixa toxicidade, alta seletividade devido a presença de grupos funcionais específicos e eficiência de operação em condições ambientais extremas de temperatura, pH e salinidade, o que os torna adequados para uma ampla gama de aplicações industriais (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Biossurfactantes são um grupo estruturalmente diversificado de metabólitos secundários secretados ao meio de cultura por seus microrganismos produtores. Eles auxiliam no crescimento microbiano, facilitando a disponibilidade de hidrocarbonetos através do aumento da interface de contato aquosa-hidrocarboneto, devido suas propriedades anfipáticas; além de atuar na proteção do microrganismo em condições ambientais severas. São divididos em baixa massa molecular, tais como os glicolipídios, lipopeptídeos e fosfolipídios e agentes poliméricos de massa molecular elevada (SHARMA; OBEROI, 2017).

Uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras, podem produzir biossurfactantes, como listados na Tabela 1. Os primeiros relatos sobre esses surfactantes biológicos foram descritos nas décadas de 40 e 60 (BERGSTROM; THEORELL; DAVIDE, 1946; GORIN; SPENCER; TULLOCH, 1961) e atualmente diversas classes foram caracterizadas, destacando os glicolipídios, que exibem grande potencial comercial devido à sua alta produtividade microbiana.

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

Biossurfactante		Microrganismos	Referências
Grupo	Classe		
Glicolipídios	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> spp. <i>Ustilago maydis</i> , <i>Serratia rubidaea</i>	Maier; Chavez (2000), Sifour et al. (2007), Teichmann et al. (2007), Jadhav et al. (2011)
	Trehalolipídios	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp., <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Nocardia</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Brevibacterium vitarumen</i>	Franzetti et al. (2010), Kugler et al. (2015)
	Soforolipídios	<i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulopsis apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>C. antarctica</i> , <i>C. apicola</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. botisae</i>	Baviere et al. (1994), Fesle et al. (2007), Van Bogaert et al. (2010), Dolman et al. (2017)
Ácidos graxos Fosfolipídios Lipídios neutros	Ácido corinomicólico	<i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i>	Gerson; Zajic (1978) Herman; Maier (2002)
	Ácido espiculispórico	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Ishigami et al. (2000)
	Fosfatidiletanolamina	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Appanna et al. (1995), Santos et al. (2016)
Lipopeptídeos	Surfactina/ Iturina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	Arguelles et al. (2009), Liu et al. (2015)
	Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Yakimov et al. (1997), Santos et al. (2016)
Poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Santos et al. (2016)
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53	Toren et al. (2001)
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	Santos et al. (2016)
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i>	Cirigliano; Carman (1984), Santos et al. (2016)
	Manoproteína	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Santos et al. (2016)

Fonte: Sharma e Oberoi (2017)

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, que apresentam grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. O número do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) é usado para calcular a proporção destes grupos e os valores entre 0 e 60 definem a afinidade do surfactante para água ou óleo. Valores baixos de HLB são caracterizados como lipofílicos e estabilizam a emulsão de água em óleo, enquanto os emulsionantes com HLB elevado são hidrofílicos. A eficiência dos biossurfactantes baseia-se em sua concentração micelar crítica (CMC), definida como a menor concentração em que ocorre a formação de micelas de um surfactante; e na sua atividade de tensão superficial. Em termos padrão, um biossurfactante eficaz é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ e a tensão interfacial entre a água e um n-hexadecano de 40 para 1 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (DESAI; BANAT, 1997; SHARMA; OBEROI, 2017).

Apesar da crescente demanda e inúmeras vantagens frente aos compostos sintéticos, a produção comercial em larga-escala é dificultada devido aos altos custos de produção, métodos ineficazes de bioprocessos, microrganismos pouco eficientes e custos elevados de *downstream* para recuperação do produto (BANAT et al., 2014; MARCHANT; BANAT, 2012). Embora ainda se tenha uma produção restrita desses surfactantes naturais, novas cepas microbianas e intervenções de processo possibilitaram melhorar a produtividade, impulsionando o aumento no mercado de empresas produtoras dessa molécula nos últimos tempos, como listado na Tabela 2.

Tabela 2 - Empresas mundiais de produção de biossurfactantes.

Empresas	Biossurfactantes
Kao Co Ltd., Japão	Soforolipídios
Iwata Chemical Co. Ltd., Japão	Ramnolipídios
Wako Pure Chemical Industries, EUA	Surfactina
MG Intobio Co. Ltd., Coréia do Sul	Ramnolipídios
Jeneil Biosurfactant Company, EUA	Não especificado
Group Soliance, França	Soforolipídios
Ecover, Bélgica	Soforolipídios
AGAE Technologies LLC, EUA	Ramnolipídios
Apollo Biolife, Índia	Soforolipídios
Synthezyme, EUA	Soforolipídios

Fonte: Sharma e Oberoi (2017)

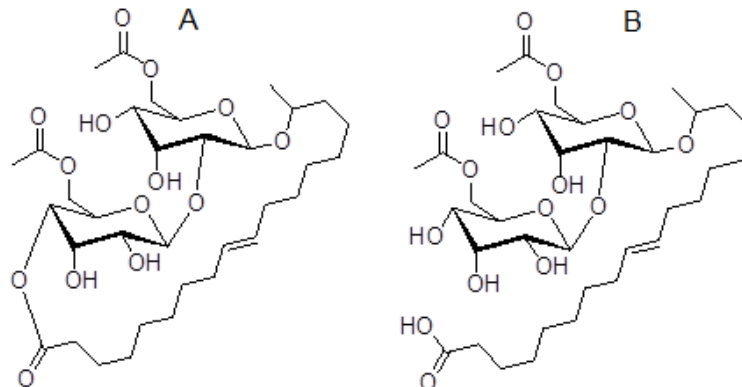
Durante a década passada, foi observado um crescimento substancial na produção de biossurfactantes. Em 2013, a produção atingiu 344.068 toneladas, a qual espera-se aumentar para 476.512 em 2018, com taxas de crescimento anual de 4,3% (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2014). Existe uma urgente necessidade no desenvolvimento de novas estratégias para produção comercial de biossurfactantes, a qual pode ser obtida por melhorias nos processos biotecnológicos.

3.2. SOFOROLIPÍDIOS: ESTRUTURA E BIOSÍNTESE

Os soforolipídios (SL) são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolipídios extracelulares, compostos por um dissacarídeo soforose (O β -D-glicopiranosil-2 \rightarrow 1- β -D-glicopiranosose) unidos por ligação β -glicosídica entre o carbono 1' e o carbono terminal (ω) ou sub-terminal (ω -1) de uma cadeia de ácido graxo de 16 ou 18 carbonos (ASHBY; SOLAIMAN, 2010). São considerados metabólitos secundários, sendo produzidos no final da fase exponencial e início da fase estacionária (HOMMEL et al., 1987). Foi primeiramente descrito em 1961, sintetizado pela levedura *Torulopsis magnoliae* (atualmente conhecida por *Candida apicola*) (GORIN; SPENCER; TULLOCH, 1961).

Esses biossurfactantes são produzidos na forma de uma mistura de diferentes moléculas, que podem ser divididas em dois grupos principais: A- lactônica e B- acídica (Figura 1). Na forma acídica, a extremidade do ácido carboxílico é livre, pois é ligado a apenas um monômero de glicose, apresentando uma cadeia aberta. A estrutura lactônica é internamente esterificada na posição 4'' da soforose, o que a faz apresentar uma estrutura de anel fechado. Essas duas formas podem sofrer outras variações estruturais em termos de acetilação das posições 6' e 6'' em sua porção da soforose e de diferenças na estrutura do ácido graxo (número de carbonos, insaturações e hidrogenação), de acordo com as condições e substratos utilizados no processo fermentativo, que refletem em alterações nos aspectos físico-químicos e em suas propriedades biológicas (ASHBY; SOLAIMAN, 2010; ASMER et al., 1988; DIAZ DE RIENZO et al., 2015).

Figura 1 - Formas estruturais dos soforolipídios: A – lactônica B – acídica



Fonte: o próprio autor.

A diversidade natural encontrada na mistura de SL é devida a variância nos padrões de acetilação, a ocorrência de esterificação interna e a natureza da hidroxilação do ácido graxo, podendo 20 ou mais congêneres estarem presentes numa única amostra de SL (DAVILA; RÉMY; VANDECASTEELE, 1992; DE OLIVEIRA et al., 2015). Em relação aos microrganismos produtores, acreditava-se que a biossíntese de SL era realizada somente pelas espécies *Candida apicola* e *Candida bombicola*, descobertas em 1961 e 1970, respectivamente. Apenas há uma década, novas cepas produtoras foram descritas (Tabela 3) (CLAUS; VAN BOGAERT, 2017).

Os soforolipídios são sintetizados em altas concentrações e geralmente por cepas não patogênicas, tornando esse grupo de moléculas particularmente atrativo para produções comerciais e futuras aplicações, considerando os aspectos de segurança (PAULINO et al., 2016; VAN BOGAERT et al., 2007). O principal microrganismo produtor é a levedura não patogênica *C. bombicola*, devido aos seus rendimentos de produção bastante expressivos e seu status GRAS (Generally recognized as safe), o que a faz ser a mais utilizada e estudada atualmente para essa produção (PAULINO et al., 2016).

Tabela 3 - Principais microrganismos produtores de soforolipídios

Microrganismos	Referências
<i>Candida albicans</i> 0-13-1	Yang et al. (2012)
<i>Candida apicola</i> NRRL-Y-2481	Kurtzman et al. (2010)
<i>Candida batistae</i> CBS8550	Konishi et al. (2008)
<i>Candida floricola</i>	Imura et al. (2010)
<i>Candida kuoi</i> NRRL Y-27208	Kurtzman et al. (2010); Price et al. (2012)
<i>Candida riodecensis</i> NRRL Y-27859	Kurtzman et al. (2010)
<i>Candida rugosa</i>	Chandran; Das (2011)
<i>Candida stellata</i> NRRL Y-1446	Kurtzman et al. (2010)
<i>Candida tropicalis</i> Y9	Chandran; Das (2011)
<i>Cryptococcus</i> sp. VITGBN2	Basak; Das (2014)
<i>Cyberlindnera samutprakarnensis</i>	Poomtien et al. (2013)
<i>Lachancea thermotolerans</i> BBMCZ7FA20	Mousavi et al., 2015
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Chandran; Das (2011)
<i>Rhodotorula babjevae</i> YS3	Sen et al. (2017)
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Davila et al. (1997); Kurtzman et al. (2010); Price et al. (2012); Dolman et al. (2017)
<i>Pseudohyphozyma (Rhodotorula) bogoriensis</i>	Tulloch et al. (1968); Nuñez et al. (2004)
<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	Chen et al. (2006)
<i>Wickerhamomyces (Pichia) anomalus</i> PY1	Thaniyavarn et al. (2008)

Fonte: Claus e Van Bogaert (2017)

Os substratos normalmente empregados na síntese da molécula de sofrorolípido são carboidratos e ácidos graxos. Na ausência de fontes hidrofóbicas no meio, ácidos graxos serão formados por síntese “de novo” a partir da acetil-CoA derivada da glicólise. Por outro lado, se a concentração de açúcares for baixa, parte dos ácidos graxos serão conduzidos para a via de β -oxidação para manutenção celular, ao invés da síntese de SL (VAN BOGAERT et al., 2007).

A via metabólica de produção do SL pode ocorrer de duas formas: síntese “de novo” ou incorporação direta. Na síntese “de novo”, os substratos lipídicos são primeiramente oxidados à ácidos graxos, quebrados em moléculas menores, hidroxilados e incorporados à molécula de SL. Essa quebra ocorre pela via da β -oxidação, sendo os substratos metabolizados a cada 2 carbonos, como acetil-CoA, podendo esta ser utilizada no processo de respiração celular ou na construção de biomoléculas. A segunda via de síntese é a incorporação direta, a qual o substrato oxidado não é quebrado, e imediatamente hidroxilado e incorporado ao SL. Dessa forma, o comprimento da cadeia do ácido graxo será igual ao substrato lipídico (GUPTA, 2012).

A incorporação direta é aumentada quando substratos adicionais são fornecidos, como glicose, que pode ser utilizada para manutenção celular. Não há evidência de incorporação direta de outros açúcares na biossíntese de glicolípídios por *C. bombicola*. Apesar do emprego diversos açúcares, como sacarose, frutose, galactose e lactose, apenas a sofrorose foi observada no glicolípido, independentemente do tipo de açúcar utilizado (ZHOU; KOSARIC, 1993, 1995).

Em leveduras, as enzimas da citocromo monooxigenase P450 estão presentes e são responsáveis pela hidroxilação dos ácidos graxos ou alcanos na posição terminal (ω) ou sub-terminal ($\omega-1$). Assim os ácidos graxos sofrem a ação da enzima citocromo monooxigenase P450 (NADP), sendo convertidos a ácidos graxos hidroxilados (VAN BOGAERT et al., 2011). Após a formação do ácido graxo hidroxilado, duas moléculas de glicose uridina difosfato ativada (UDP-glicose) são adicionadas em série para completar a síntese de SL.

A glicose é acoplada glicosidicamente (posição C1') ao grupo hidroxila do ácido graxo através da ação da glicosiltransferase específica I. A ação da transferase exige a molécula de glicose ativada por nucleotídeos (UDP-glicose) como doador de grupo glicosil. Em seguida, uma segunda glicose é adicionada na posição C2' da primeira porção da glicose pela glicosiltransferase II (VAN BOGAERT

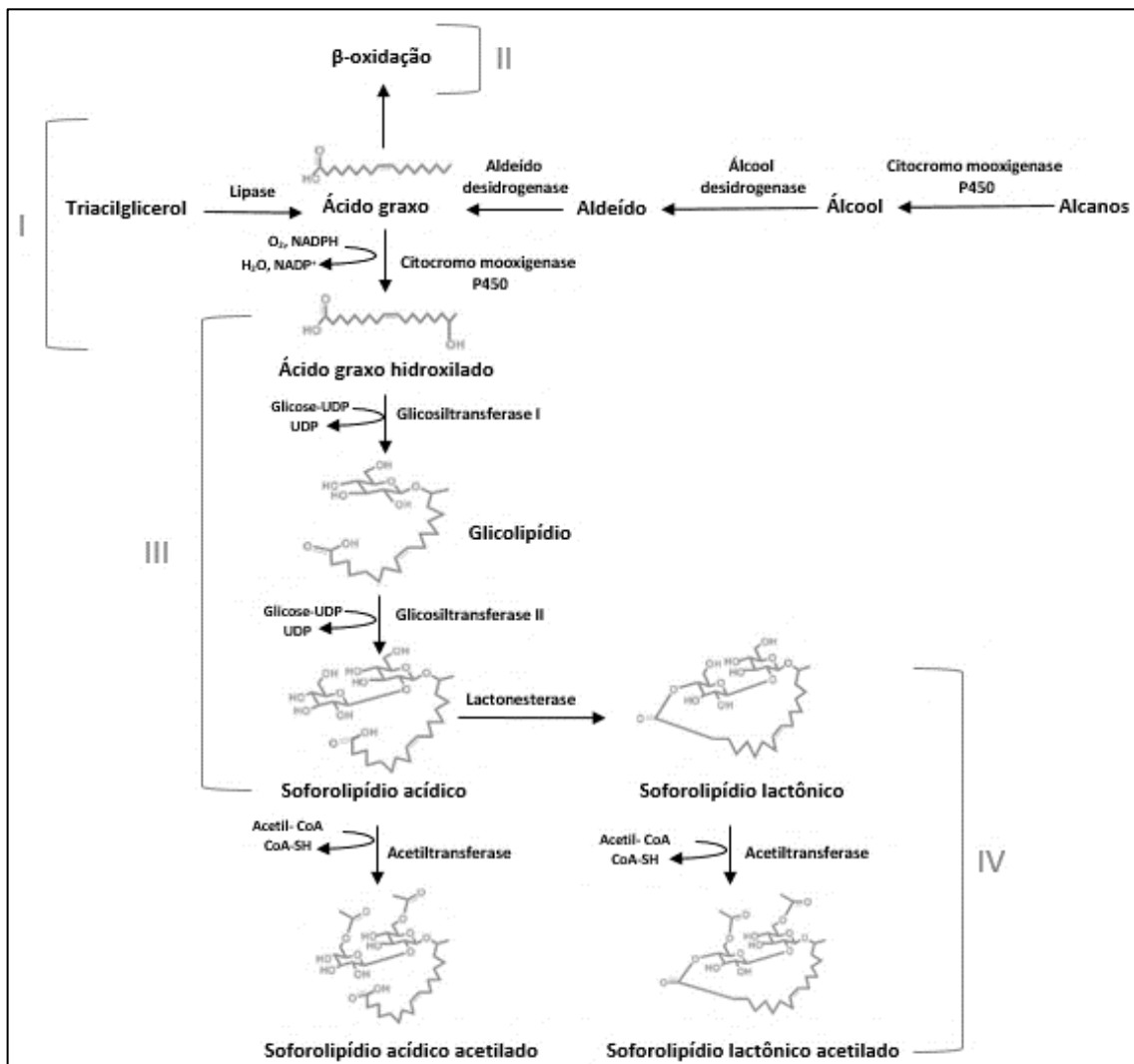
et al., 2007). O produto obtido após a ação da glicosiltransferase II é classificado como moléculas de SL ácidas não-acetiladas (GUPTA, 2012).

Além disso, modificações na estrutura do SL podem ocorrer tanto por esterificação interna (lactonização) como por acetilação da soforose. SL lactônicos são formados por uma reação de esterificação, catalisada por uma esterase lactônica específica (ASMER et al., 1988). A acetilação na posição 6' e/ou na posição 6'' é realizada pela acetil transferase dependente de acetil-CoA (ESDERS; LIGHT, 1972).

A Figura 2 apresenta a via metabólica da síntese de SL por *C. bombicola* proposta por Asmer et al. (1988). Na etapa I, a síntese pode ser iniciada pelo fornecimento de diferentes fontes lipídicas, a partir de alcanos, álcoois ou aldeídos para obtenção do ácido graxo livre, ou ainda vindo de triacilgliceróis, que precisam ser degradados pelas lipases liberando os ácidos graxos (COOPER; PADDOCK, 1984; VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). O ácido graxo poderá sofrer β -oxidação (Etapa II) ou hidroxilação (Etapa III), resultado em uma cadeia de ácido graxo hidroxilado (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). O caminho que o ácido graxo será direcionado dependerá das condições metabólicas da célula e da disponibilidade de substratos para manutenção celular e síntese de biomoléculas.

Na etapa III, com a formação do ácido graxo hidroxilado, duas moléculas de UDP-glicose serão adicionadas através das enzimas, glicosiltransferase I que acopla a glicose na posição C1' ao grupamento hidroxila ω ou $\omega-1$ do ácido graxo e a segunda glicose pela glicosiltransferase II na posição C2' (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). Por fim, na etapa IV as moléculas de soforolipídios ácidos não acetilados são obtidas, podendo sofrer ações das enzimas lactonesterase e acetiltransferase, formando estruturas lactônicas não acetiladas ou acetiladas e ácidas acetiladas, respectivamente.

Figura 2 - Via da biossíntese de sofrorolípídios



Fonte: Gupta (2012) modificado

3.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO NA SÍNTESE DE SOFOROLÍPIDIOS

A biossíntese dos sofrorolípídios ocorre no final da fase exponencial e início da fase estacionária, em condições de nitrogênio limitantes, que elevam a atividade das enzimas envolvidas no processo, estimulando a produção dessa biomolécula (CASAS; GARCÍA DE LARA; GARCÍA-OCHOA, 1997; RAU et al., 2001; ZHOU; KOSARIC, 1995).

Estudos demonstraram que a produção é aumentada quando ambas fontes de carbono primária (substratos hidrofílicos) e secundária (substratos hidrofóbicos) são fornecidas ao meio (ASMER et al., 1988; COOPER; PADDOCK, 1984; DAVILA;

RÉMY; VANDECASTEELE, 1992). De acordo com Linton (1991), quando a fonte de carboidrato é suplementada com um substrato lipídico, a disponibilidade do mesmo poderá ser direcionada para fornecimento de energia, assim como ser utilizado como precursor direto da soforose, favorecendo dessa forma, tanto o suprimento de energia da célula como para precursor de lipídios.

A influência de substratos hidrofílicos alternativos tem sido investigada na produção de SL. Diversas fontes já foram relatadas, como sacarose, frutose, manose, maltose, rafinose, lactose, galactose e xilose. Porém, majoritariamente a glicose tem se mostrado como a fonte preferencial do microrganismo produtor, pois nenhum substrato foi capaz de atingir os mesmos valores de rendimentos obtidos no emprego desse açúcar. Zhou e Kosaric (1993) compararam diferentes fontes: glicose, sacarose, galactose e lactose na produção de soforolipídios com *C. bombicola* e obtiveram resultados de produção de 136,6 g.L⁻¹, 58,32 g.L⁻¹, 46,46 g.L⁻¹ e 24,41 g.L⁻¹, respectivamente. Em contrapartida, a busca por fontes alternativas, como subprodutos industriais, se faz importante para diminuição do custos de produção.

Daniel, Reuss e Syldatk (1998) utilizaram soro de leite desproteínizado em conjunto com óleo de canola, porém esse não demonstrou ser um bom substrato, já que a lactose não consegue ser metabolizada pela *C. bombicola* e o máximo rendimento de SL obtido foi devido, principalmente, ao consumo de óleo de canola. Daverey e Pakshirajan (2009) e Solaiman et al. (2007) reportaram o uso de melão de soja e melão de cana-de-açúcar como fontes de carbono e nitrogênio para produção de SL. Apesar do menor rendimento encontrado no emprego dessas fontes de baixo custo em comparação com a glicose, a produção de SL foi possível e um aumento foi observado quando esses resíduos passaram por processos de pré-tratamento e refinamento, podendo atingir valores de produção próximos a de fontes tradicionalmente utilizadas.

Em relação a fonte lipídica, existem evidências da sua influência no rendimento e estrutura do SL. Diferentes fontes de carbono, como alcanos, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos e óleos vegetais têm sido empregados. Cavaleiro e Cooper (2003) reportaram que no uso de alcanos, à medida que o comprimento da cadeia aumenta de C12 para C18, a porcentagem de ácidos graxos hidroxilados é aumentada e diretamente incorporada na estrutura do SL, sendo hexadecano e octadecano os que apresentaram os melhores rendimentos de produção. A mesma

tendência foi observada na incorporação de ácidos graxos e seus ésteres na molécula de SL.

Fontes lipídicas alternativas tem sido testadas, como óleo de girassol, milho, soja, canola e gorduras animais (CASAS; GARCÍA DE LARA; GARCÍA-OCHOA, 1997; CASAS; GARCÍA-OCHOA, 1999; COOPER; PADDOCK, 1984; DANIEL; REUSS; SYLDATK, 1998; KIM et al., 2005; RAU et al., 2001). Porém ácido oleico (C18:1) é considerado o melhor substrato lipídico para a produção (ASMER et al., 1988; GUPTA, 2012; RAU et al., 2001). Cadeias mais longas restringem a biodisponibilidade e diminuem as propriedades biológicas, enquanto que cadeias médias e pequenas são facilmente metabolizados pela via da β -oxidação, não sendo incorporadas, devido restrições bioquímicas da citocromo P450 monooxigenase CYP52M1, o que resulta em baixa produção de SL no processo fermentativo (CLAUS; VAN BOGAERT, 2017; MORYA et al., 2013).

Entre as fontes de nitrogênio descritas estão o extrato de malte, peptona, ureia, milhocina e extrato de levedura, a qual tem sido a mais utilizada (CASAS; GARCÍA-OCHOA, 1999; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; RISPOLI; BADIA; SHAH, 2010). Casas, Lara e Gárcia-Ochoa (1997), exaltam a importância do uso do extrato de levedura no meio de fermentação para produção de SL, sendo descrito como ótima fonte de vitaminas, elementos traços de zinco, magnésio e ferro. A temperatura ótima de produção utilizada varia entre 25°C a 30°C (DOLMAN et al., 2017; FELSE et al., 2007; KIM; YUN; KIM, 2009).

SL são convencionalmente produzidos por fermentações submersas (FS), existindo apenas poucos estudos em fermentação em estado sólido (FES) (KIM; YUN; KIM, 2009; KOH; GROSS, 2016). Jiménez-Peñalver et al. (2016, 2017) utilizaram recentemente FES para produção de SL, empregando resíduo do processamento de refino do óleo e ácido esteárico em conjunto com farelo de trigo, obtendo 0,251 g.g⁻¹ e 0,211 g.g⁻¹ de SL, respectivamente. Parekh, Patravale e Pandit (2012) também produziram sofrorolipídios por FES utilizando resíduo seco da manga, obtendo um rendimento de 0,175 g.g⁻¹. As vantagens reportadas pelos autores quanto ao uso da FES são o emprego de substratos sólidos baratos e diminuição de potenciais problemas associados à formação de espuma.

Entretanto, apesar dos estudos em busca da otimização de bioprocessos, a produção em larga escala e seu custo relativamente elevado, ainda são um desafio. Assim, a fim de derrubar essa barreira comercial e torná-lo economicamente

competitivo, a adoção de algumas medidas são necessárias, como a utilização de substratos de baixo custo e o desenvolvimento de processos otimizados, objetivando a máxima produção e conseqüente diminuição dos custos (SATPUTE; PŁAZA; BANPURKAR, 2017). Dentre os substratos alternativos descritos, destacam-se a gordura animal, resíduos de ácidos graxos, óleo residual de restaurantes, águas residuais de laticínios, soro do leite desproteínizado, melão de cana-de-açúcar e soja, glicerol bruto e subprodutos do biodiesel e do refino de óleo de soja (ASHBY et al., 2005; DANIEL; REUSS; SYLDATK, 1998; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009; FELSE et al., 2007).

Outra alternativa para viabilizar a produção comercial desse biossurfactante seria a aplicação de ferramentas estatísticas combinadas a técnicas de engenharia genética, afim de se obter processos mais otimizados e microrganismos com maiores capacidades produtivas (PAULINO et al., 2016). A Tabela 4 compila dados de autores na produção de SL em diferentes condições de cultivos e substratos.

Tabela 4 - Dados de produção de soforolipídio variando as condições de cultivo

Tipo de Fermentação	Substrato	Tempo (horas)	pH	Temperatura (°C)	Soforolipídio (g/L)	Referência
batelada simples	Gordura de frango	120	Sem controle	30	39, 81	Minucelli et al. (2017)
batelada simples	Sabugo de milho hidrolisado	120	Sem controle	28	49,29	Konishi; Yoshida; Horiuchi (2015)
batelada alimentada	Óleo usado	168	3,5	25	52,1	Samad et al. (2017)
batelada alimentada	Derivado do biodiesel	168	3,5	26	60	Ashby et al. (2005)
batelada alimentada	Resíduo do óleo de soja	168	3,5	30	90	Kim et al. (2005)
batelada alimentada	Gordura animal	240	Sem controle	30	120	Felse et al. (2007)
batelada alimentada	Óleo de canola	192	3,5	25	365	Kim; Yun; Kim (2009)
batelada alimentada	Óleo de canola	120	3,5	25	300	Rau et al. (2001)
batelada alimentada	Óleo de canola	192	3,5	25	320	Davila; Rémy; Vandecasteele (1992)
batelada alimentada	Óleo de canola	312	3,5	25	325	Dolman et al. (2017)
batelada alimentada	Ácido oleico	312	Sem controle	30	350	Guilmanov et al. (2002)
batelada alimentada	Óleo de milho	432	3,5	25	>400	Pekin; Vardar-Sukan; Kosaric (2005)
batelada alimentada	Óleo de canola	408	3,3	30	422	Daniel; Reuss; Sylдатk (1998)
Semicontínua	Ácido oleico	300	3.5-4	30	477	Zhang et al. (2018)

Fonte: o próprio autor

3.4. APLICAÇÕES DOS SOFOROLIPÍDIOS

Devido suas propriedades anfílicas, os sofrorolipídios possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial de diversos compostos, tornando-os potencialmente aplicáveis nas mais amplas áreas, como agentes detergentes e emulsificantes. A redução da tensão superficial e os valores de CMC dos SL são comparáveis aos surfactantes comercialmente disponíveis, como a surfactina (GUPTA, 2012). De fato, os sofrorolipídios têm sido vastamente estudados como um substituto natural para os surfactantes normalmente empregados na indústria (KAUR; SANGWAN; KAUR, 2017; REBELLO et al., 2018; VAN BOGAERT et al., 2007).

Os SL também possuem outras propriedades de alto valor agregado, tais como componentes em misturas germicidas aplicadas na limpeza de frutas e verduras (PIERCE; HEILMAN, 1998), lise de microrganismos patogênicos da pele e cabelo (MAGAR; ROTHLSBERGER; WZGNER, 1987), biopesticidas e agentes antifúngicos de patógenos de plantas (YOO; LEE; KIM, 2005), ações antiinflamatórias, antimicrobianas, antivirais e anticancerígenas (BORSANYIOVA et al., 2015; DEY et al., 2015; DIAZ DE RIENZO et al., 2015; VAN BOGAERT et al., 2007; ZHANG et al., 2016a) estimulação do metabolismo de fibroblastos dérmicos (CONCAIX, 2003) e eliminação de radicais livres (HILLION, 1998).

Diferentes propriedades, como capacidade emulsificante, formação de espuma e atividade antimicrobiana, são dependentes de suas propriedades de superfície, as quais podem sofrer alterações conforme variações estruturais do SL. Formas acídicas possuem melhor solubilidade e formação de espuma, enquanto que as lactônicas apresentam melhores propriedades de tensão superficial e ação antimicrobiana (PAULINO et al., 2016).

Os SL possuem baixa citotoxicidade e seus produtos são considerados aceitos e aprovados pela Food and Drug administration (FDA) (GUPTA, 2012). Atualmente, são os biossurfactantes mais aplicados na indústria e seus produtos estão disponíveis em nível comercial. Destacam-se as aplicações em formulações de cosméticos (MAENG et al., 2018; MORYA et al., 2013), agentes de limpeza (GUPTA, 2012), recuperação de petróleo (BANAT, 1995; BROWN; ROBINSON; SPRINGHAM, 1986; PESCE, 2002), biorremediação (MILLER, 1995; MINUCELLI et al., 2017; TANG et al., 2018; YE et al., 2016) na indústria de alimentos como

estabilizantes e emulsificantes (AKARI; AKARI, 1987; NITSCHKE; COAST, 2007; NITSCHKE; SILVA, 2017), na indução de enzimas (LO; JU, 2009; GROSS; SHAH, 2007) e na área da saúde como antivirais, anticâncer e anti-inflamatórios (SHAH et al., 2005; CHEN et al., 2006; RASHAD et al., 2014; SHAO et al., 2012; JOSHI-NAVARE; SHIRAS; PRABHUNE, 2011; ZIEMBA et al., 2017). Outra atividade biológica de grande importância é sua ação antimicrobiana, que tem sido de grande destaque atualmente.

3.4.1 Atividade Antimicrobiana

Os sofrolipídios possuem propriedades químicas e biológicas únicas e têm ganhado atenção devido a diversos fatores, como o aumento da preocupação ambiental na busca de alternativas aos compostos químicos tradicionais, por suas características desejáveis para ampla aplicação industrial e por sua alta produtividade (ZHANG et al., 2016b). Nessa vertente, uma das principais propriedades investigadas atualmente são suas atividades antimicrobianas, haja vista a importância e necessidade da descoberta de possíveis substituintes de antibióticos, germicidas e sanitizantes convencionais por compostos naturais e biodegradáveis, como os sofrolipídios (GUPTA, 2012).

A ação antimicrobiana do SL está relacionada à sua natureza anfifílica, a qual através de interações sinérgicas entre as porções da sofrose e ácido graxo produz o efeito surfactante, sendo capaz de diminuir a tensão interfacial e superficial de compostos e materiais, e assim promover alterações da adesão de microrganismos (PONTES et al., 2016; VALOTTEAU et al., 2017). Sua ação envolve mecanismos de desestabilização e alteração da permeação da membrana, o que leva a ruptura e extravasamento do conteúdo celular (DE OLIVEIRA et al., 2015; DENGLE-PULATE et al., 2014; FRACCHIA et al., 2015). Lydon et al. (2017) destacam que os efeitos antimicrobianos dos SL dependem da sua estrutura e da classe da bactéria examinada.

A atividade antibacteriana do SL tem sido descrita (Tabela 5). Embora apresentem resultados de inibição contra bactérias Gram-negativas, SL demonstrou ter melhor ação em cepas Gram-positivas. Isso se deve à sua especificidade de ação em membranas, uma vez que existem diferenças estruturais nessas bactérias. Em Gram-positivas, a parede celular é constituída por uma membrana citoplasmática

circundada por uma espessa camada de peptidoglicano, enquanto que em Gram-negativas ela é composta de uma fina camada de peptidoglicano e duas membranas, tornando o envelope celular de bactérias Gram-negativas mais complexo de interagir (DENGLE-PULATE et al., 2014; ZHANG et al., 2016a).

Tabela 5 - Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de diferentes tipos de soforolipídio contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias	Tipos de soforolipídio	CIM	Referências
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lactônico diacetilado /oleico e linoleico Álcool laurílico Mistura acídica e lactônica 75% lactônico e 25% acídico; Lactônico diacetilado /esteárico, oleico e linoleico	4.500 µg/ml; 6 µg/ml; 5% (50.000 µg/ml); 400 µg/ml; 50 µg/ml	Hoa et al. (2017); Dengle-Pulate et al. (2013); Diaz de Rienzo et al. (2015); Joshi-Navare et al. (2013); Pontes et al. (2016)
<i>Staphylococcus xylosus</i> ; <i>Staphylococcus cohnii</i> ; <i>Staphylococcus equorum</i>	Palmitico ou oleico Esteárico	19,5 µg/ml; 4,88 µg/ml	Solaiman et al. (2016)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Acídico não acetilado	50 µg/ml	Valotteau et al. (2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	Lactônico diacetilado / oleico e linoleico Álcool laurílico	5.000 µg/ml; 5% (50.000 µg/ml)	Hoa et al. (2017); Diaz de Rienzo et al. (2015)
<i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>B. pumilos</i> e <i>B. mycoides</i>	Palmítico ou oleico Esteárico	19,5 µg/ml; 4,88 µg/ml	Solaiman et al. (2016)
<i>Enterococcus faecium</i>	Palmítico ou oleico Estearico	19,5 µg/ml; 9,76 µg/ml	Solaiman et al. (2016)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Acídico não acetilado	50 µg/ml	Valotteau et al. (2017)

<i>Aerococcus viridans</i>	Palmítico ou oleico Esteárico	19,5 µg/ml; 9,76 µg/ml	Solaiman et al. (2016)
<i>Listeria ivanovii</i>	Acídico não acetilado	50 µg/ml	Valotteau et al. (2017)
<i>Listeria spp.</i>	Lactônico	0,10% (1.000 µg/ml)	Zhang et al. (2016)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Acídico não acetilado	50 µg/ml	Valotteau et al. (2017)
<i>Streptococcus mutans; S. salivarius e S. sobrinus</i>	Lactônico	≥50 µg/ml	Solaiman et al. (2017)
<i>Lactobacillus acidophilus e L. fermentum</i>	Lactônico	1.000 µg/ml	Solaiman et al. (2017)
<i>Escherichia coli</i>	Lactônico diacetilado / oleico e linoleico Álcool laurílico Acídico não acetilado 75% lactônico e 25% acídico; Lactônico diacetilado / esteárico, oleico e linoleico	10.000 µg/ml; 30 µg/ml; 50 µg/ml; 1.000 µg/ml; 750 µg/ml	Hoa et al. (2017); Dengle-Pulate et al. (2013); Valotteau et al. (2017); Joshi-Navare et al. (2013); Pontes et al. (2016)
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	Lactônico / esteárico e oleico	1% SL (10.000 µg/ml) + 20% Etanol	Zhang et al. (2017)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lactônico diacetilado / oleico e linoleico Álcool laurílico Acídico não acetilado Acídico / oleico	10.000 µg/ml; 1 µg/ml; 50 µg/ml; 5.000 µg/ml	Hoa et al. (2017); Dengle-Pulate et al. (2013); Valotteau et al. (2017); Lydon et al. (2017)
<i>Pseudomonas luteola</i>	Palmítico ou oleico Esteárico	19,5 µg/ml; 4,88 µg/ml	Solaiman et al. (2016)
<i>Enterobacter cloacae and E. sakazakii</i>	Palmítico ou oleico Esteárico	19,5 µg/ml; 9,76 µg/ml	Solaiman et al. (2016)
<i>Vibrio fluvialis</i>	Palmítico ou oleico Esteárico	19,5 µg/ml; 9,76 µg/ml	Solaiman et al. (2016)

<i>Salmonella typhimurium</i>	Acídico não acetilado	50 µg/ml	Valotteau et al. (2017)
<i>Salmonella spp.</i>	Lactônico / Esteárico	1% (10.000 µg/ml)	Zhang et al. (2016)

Fonte: o próprio autor.

Pontes et al. (2016) conduziram um estudo sobre a aplicação de SL em cateteres de silicone para inibir a formação de biofilmes bacterianos. Foram testadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, como microrganismos representativos de infecções vasculares e urinárias. Os resultados revelaram que a presença de SL na superfície do silicone foi capaz de diminuir a hidrofobicidade do material com consequente redução na formação de biofilmes pelas duas bactérias. *S. aureus* mostrou ser mais vulnerável à ação desse biosurfactante, sendo erradicada em sua forma planctônica na concentração de 50 µg/mL.

Contrariamente, não foi possível observar inibição completa da *E. coli* dentro das concentrações testadas (MIC < 750 µg/mL). A justificativa dessa diferença antimicrobiana seria explicada pela hidrofobicidade e cargas que a bactéria carrega. Bactérias Gram-negativas possuem carácter menos hidrofóbico e mais negativo, o que as faz ser menos afetadas pelas alterações de superfície promovidas pelo SL. Além disso, em pH neutro, SL podem ser ionizados negativamente, repelindo bactérias com carga negativa.

Morya et al. (2013) também testaram a ação do SL para as mesmas bactérias e observaram a influência na atividade de SL quando produzidos a partir de diferentes substratos. SL derivado do óleo de coco exibiu melhor atividade antibacteriana contra *S. aureus*, mas não apresentou diferença em relação ao SL produzido com óleo de milho para *E. coli*. Esse glicolípido é produzido na forma de uma mistura de estruturas relacionadas e os substratos empregados e condições de cultivo têm relação direta com a formação dessas estruturas, que podem alterar suas propriedades químicas e biológicas, refletindo em suas atividades antimicrobianas (VAN BOGAERT et al., 2007).

Dessa forma, um ponto relevante na atividade antimicrobiana de SL é o predomínio das formas acídicas e lactônicas. Formas lactônicas possuem melhores propriedades de redução da tensão superficial e atividade antimicrobiana em comparação com a forma acídica, assim o aumento nas proporções lactônicas poderia melhorar a ação antibacteriana do SL (VAN BOGAERT et al., 2007; ZHANG et al., 2016a). Estudos anteriores também mostraram a influência da porção de sofrorose nas atividades antimicrobianas. Shah, Badia e Ratsep (2007) relataram que SL obtidos de meios contendo arabinose mostraram-se mais efetivos que meios com glicose, contra três das quatro bactérias Gram-positivas testadas e contra *Moraxella*

spp. Por outro lado, quando arabinose foi empregada, não foi observado inibição no crescimento de *E. coli*.

Ações sinérgicas dos soforolipídios com outros compostos também têm sido descritas. Joshi-Navare e Prabhune (2013) relataram interação entre SL e antibióticos tradicionais (cefaclor e tetraciclina), apresentando efeitos melhorados na atividade contra *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, respectivamente. Díaz de Rienzo e colaboradores (2016a) além de reportarem ação antimicrobiana dos SL contra *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Bacillus subtilis* NCTC 10400, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 e *E. coli* NCTC 10418 (CIM > 5%), também investigaram a ação conjugada de SL 1% e ácido caprílico 0,8% na inibição de biofilmes formados por *P. aeruginosa*, *E. coli* e *B. subtilis*, sugerindo uma interação sinérgica entre os compostos. Em outro estudo, os mesmos autores (2016b) verificaram a combinação glicolipídica de soforolipídios e ramnolipídios (0.04%/ 0.01%) contra biofilmes de *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 9144 e uma cultura mista de ambas, obtendo resultados positivos para os dois últimos casos.

Zhang et. al (2017) investigaram os mecanismos de ação do SL e do etanol assim como sua ação combinada contra *Escherichia coli* O157:H7. Os resultados mostraram que utilizando o padrão de etanol 20% ou o SL de formas isoladas, não houve redução significativa na população da bactéria. Na presença de 10% de etanol, nenhuma das formas acídicas e lactônicas obtiveram resultados promissores. Contudo, reduções significativas foram observadas com todos os SL na presença de 20% de etanol, sugerindo um efeito sinérgico entre eles, com aumento na atividade antimicrobiana do SL.

Em adição a todas essas atividades antibacterianas descritas, os soforolipídios também são destacados por sua ação antifúngica. Haque et al. (2016) reportaram valores de CIM entre 30-120 µg/mL para várias espécies de *Candida spp.* Atividades sinérgicas entre SL e os antifúngicos anfotericina b e fluconazol também foram descritas, apresentando um aumento na eficácia contra formação de biofilmes por *C. albicans*, sugerindo uma potencial aplicação no tratamento de candidíase. Sen e colaboradores (2017) apresentaram atividades antifúngicas contra os fungos de plantas *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* e *Fusarium verticillioides*, obtendo valores de CIM na faixa de 62-1000 µg/mL.

De modo geral, os efeitos dos SL são mais eficazes contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas, e em relação a sua estrutura, formas lactônicas, independente das variações, possuem melhor atividade antimicrobiana que as estruturas acídicas (RIBEIRO et al., 2012). Estes estudos demonstram o grande potencial dessa classe de glicolipídios como agentes antibacterianos e antifúngicos alternativos, tanto no tratamento de doenças, como sanitizantes ou germicidas em diversos setores industriais. Dessa forma, considerando a importância do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos no controle de cepas resistentes e formação de seus biofilmes, em conjunto com as propriedades dos SL que garantem grande aplicação industrial, os SL podem ser vistos como moléculas de grande potencial e aplicação.

3.5 PERSPECTIVAS ATUAIS SOBRE A SEGURANÇA ALIMENTAR EM PROCESSAMENTO DE PRODUTOS AVÍCOLAS

A carne de frango é uma importante *commodity* alimentar e a previsão de produção é que se atinja 134,5 milhões de toneladas até 2026, assegurando a liderança entre todos os tipos de produção de carne (AHMED; HIREMATH; JACOB, 2016a). O setor avícola no Brasil apresenta um grande impacto social e econômico, ocupando o primeiro lugar no ranking mundial de exportações de carne de frango, concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sendo que o estado do Paraná contribui com 34,32% do volume abatido total do país (ABPA, 2018). Em contrapartida com esse cenário de crescimento econômico, há também um aumento no risco de contaminações e preocupação com a transmissão de patógenos, assim como a necessidade de um maior controle da qualidade higiênico e sanitário dos produtos.

Diante da importância mundial da avicultura brasileira e as exigências dos mercados importadores, o processo produtivo tem sido constantemente aprimorado com automações, visando a melhoria de produtividade e diminuição de perdas. Porém este é um assunto contraditório, pois ao passo que agiliza o processo, melhorando fluxos e reduzindo o tempo de permanência da carne no processamento, pode levar também a um descumprimento de procedimentos sanitários operacionais (PSO), decorrente de deficiência operacional e desuniformidade de matéria prima.

As taxas mundiais de condenação de carcaças de aves variaram de 0,41 a 4,13 %, e no Brasil chegam até 8,97 %, porcentagens superiores à média mundial (OLIVEIRA et al., 2016). Uma das principais causas dessas condenações é devido a contaminação microbiológica, que provém tanto das aves vivas como por incorporação em alguma fase do abate. Os microrganismos que entram nas plantas de abate com os frangos, são contaminantes potenciais dos equipamentos, o que pode resultar na contaminação cruzada das carcaças à medida que essas se movem pela fábrica (DEPNER, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

Surtos de doenças alimentares são um problema de saúde pública, causando anualmente 600 milhões de doenças e 420.000 mortes em todo o mundo (WHO, 2015). *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* e *Listeria spp.* estão entre os principais patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos, sendo os principais fatores de risco o manejo e o consumo de frango cru ou mal cozido e outras carnes, leite cru e águas contaminadas (AHMED et al., 2018).

Os alimentos de origem animal, com destaque para as aves, são os maiores responsáveis pela disseminação de microrganismos causadores de toxinfecções alimentares (ENDERSEN et al., 2014; MAHAMI et al., 2019; ROUGER; TRESSE; ZAGOREC, 2017). Os principais patógenos encontrados são *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (AHMED; HIREMATH; JACOB, 2016b; JAMES; PRUCHA; BREWER, 1993; SILVA, 1998). Microrganismos deteriorantes também podem estar presentes diminuindo a *shelf-life* de produtos avícolas *in natura* e dessa forma, impactar negativamente nos lucros.

Como as carnes de frango são armazenadas em ambientes refrigerados, o crescimento de bactérias mesófilas normais é desacelerado. Porém o crescimento de psicrófilos e psicrotróficos, como *Acinetobacter* e *Pseudomonas spp.* torna-se uma preocupação. Quando atingem cerca de 10^7 unidades formadoras de colônias/cm², os carboidratos disponíveis na carne são consumidos e uma vez esgotados, a bactéria começa a consumir os aminoácidos, produzindo odores característicos da deterioração (BLEVINS et al., 2018).

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas tem sido usada como indicador de qualidade, determinando se a limpeza, a desinfecção e o controle de temperaturas durante os processos industriais foram realizados de forma adequada, além de fornecer informações sobre a vida útil do produto. A presença de bactérias

do grupo coliformes indica contaminação de origem ambiental e fecal nos produtos, já a presença de alto número de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes em alimentos é indicativo da presença de patógenos intestinais (FRANCO; LANDGRAF, 2002; GILL, 1998).

As práticas descritas na literatura são o refile, lavagem de carcaças, rinsagem com água quente, pasteurização por vapor, cloro e derivados, ácidos orgânicos (lático, acético, cítrico, fumárico), sorbatos e benzoatos, fosfato trisódico (TSP), bactericidas (nisina), culturas starter (*lactobacilli* e *lactococci*), peróxido de hidrogênio, ozônio, pressão hidrostática, irradiação gama, eletricidade por campo pulsado, energia ultrassônica e luz ultra-violeta (ANDERSON et al., 1977; BOLDER, 1997; DEPNER, 2015; HUGAS; TSIGARIDA, 2008).

Uma prática tradicional utilizada na remoção da contaminação gastrointestinal visível é o refile, em que as carcaças contaminadas têm suas partes afetadas cortadas e condenadas. Além das perdas econômicas advindas da depreciação das carcaças que deixam de ser comercializadas inteiras, o processo envolve diversos operadores, que devem estar altamente instruídos para a identificação correta das contaminações e evitar contaminação cruzada. Outro método implementado em países como Brasil, Estados Unidos, Canadá e Europa é o emprego do sistema de lavagem por meio de bicos aspersores para remoção da contaminação presente nas superfícies internas e externas das carcaças, como alternativa à prática do refile, sendo considerada superior tanto no aspecto microbiológico quanto operacional (BRASIL, 2011; DEPNER, 2015; STEFANI et al., 2011).

Nos Estados Unidos e na União Europeia, a utilização de produtos químicos em carcaças de aves ou de bovinos são permitidos, tais como o hipoclorito de sódio, ozônio e ácido lático. A legislação americana permite o uso de concentrações superiores a 20 ppm de cloro na água comum e 50 ppm na água do chiller; soluções de até 5 % de ácido lático para uso em carcaças de frango após o pré-resfriamento; e utilização de ozônio para todos os produtos de carne de frango (U.S.A., 2016; COMISSÃO, 2013). Já a comunidade europeia regulamenta o uso de solução de ácido láctico, de 2 a 5% e níveis de cloração de até 5 ppm de cloro livre na água do chiller (COMISSÃO, 2013; EFSA, 2011).

Apesar do uso desses sanitizantes na indústria de carne de aves estar regulamentado, poucos estudos são realizados a respeito dos efeitos do seu uso

sobre as características de qualidade da carne. Sabe-se que a exposição prolongada ao gás ozônio em concentrações mínimas de 1 ppm pode provocar dores de cabeça e irritação no sistema respiratório do manipulador (NRC, 1995). Em relação ao uso de ácidos orgânicos, uma potencial desvantagem é a possível descoloração temporária ou permanente da carne de frango, dependendo da concentração, tempo e temperatura de aplicação (TOLDRÁ, 2009). O uso de TSP apresenta eficiência específica para bactérias da família *Enterobacteriaceae* e pouco efeito para outras bactérias psicrófilas, havendo a necessidade de utilização de vários agentes para uma redução mais eficiente dos microrganismos da superfície das carcaças (MORSHEDY; SALLAM, 2009).

Dentre os sanitizantes mencionados, o cloro é um dos agentes mais utilizados nos processos de descontaminação de carcaças, tendo seu efeito comprovado por pesquisas (LI; YANG; SWEM, 2002; PANG; YUK, 2018). Em contrapartida, a utilização desse composto é limitada quando a carne se destina à exportação para União Europeia, pois este mercado tolera a utilização de cloro a no máximo 5 ppm, devido a possibilidade da oxidação do cloro produzir agentes cancerígenos. Do mesmo modo, a utilização da lavagem das carcaças com água ativada eletroquimicamente ou água eletrolisada é limitada, pois possui alta concentração de ácido hipocloroso (RUSSEL, 2007).

No Brasil não é permitido a utilização de qualquer adjunto ou composto descontaminante no processamento de abate das aves, sendo utilizado somente cloração da água de no máximo 1 ppm de cloro livre e a água de renovação dos resfriadores até 5 ppm (BRASIL, 1998). Dessa forma, estudos que busquem o desenvolvimento e aplicação de novos sanitizantes são fundamentais para atrair a atenção dos órgãos de regulamentação do Brasil sobre a necessidade de mudanças e adesão de novos procedimentos para diminuição dos prejuízos na produção de frangos. Pesquisas sobre agentes antimicrobianos naturais, como os soforolipídios, são de grande relevância para a tentativa de melhorias no produto, tanto na questão de redução da carga microbiana e aumento da vida de prateleira, como também a redução dos custos de produção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Microrganismos

O microrganismo utilizado na produção de soforolipídios foi a levedura *Candida bombicola* ATCC 22214, obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA. Para os testes antibacterianos foram utilizadas bactérias isoladas de carcaças de frango cedidas pela empresa JBS Foods – Abatedouro Big Frango: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. As cepas de *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 e *Clostridium perfringens* ATCC 3623 foram cedidas pelo Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

4.1.2 Meios de Cultura

4.1.2.1 Preservação, ativação e pré-Inóculo da *C. bombicola*

Meio de preservação em g/L: glicose 10, extrato de levedura 3, peptona 5, extrato de malte 3 e ágar 20.

Meio de ativação em g/L: glicose 100, extrato de levedura 10 e ureia 1.

Meio de pré-inóculo em g/L: glicose 77,5, extrato de levedura 2,5 e ácido oleico 75 (MINUCELLI et al., 2017).

4.1.2.2 Fermentações

A composição do meio para as fermentações em g/L: glicose 77,5, extrato de levedura 2,5 e ácido oleico 75, seguido de pulsos de 20 g/L de ácido oleico a cada 48 h até 192 h e adição de 90 g/L de glicose em 144 h e 192 h (FELSE et al., 2007; MINUCELLI et al., 2017).

4.1.2.3 Meios da atividade antibacteriana

Para *C. perfringens* foi utilizado o meio Infusão de Cérebro e Sangue (BHI) caldo e ágar (Oxoid®); para *C. jejuni* o meio Tioglicolato (TC) caldo e ágar (Oxoid®); e as demais bactérias *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *E. coli* foram crescidas em meio Müller-Hinton (MH) caldo e ágar (Oxoid®).

4.1.2.4 Meios do teste de citotoxicidade

A linhagem celular utilizada HepG2 / C3A de hepatoma humano obtida no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) foi cultivada em meio Dulbecco MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preservação, Ativação e Pré-inóculo da *C. bombicola*

A levedura foi mantida criopreservada em 25% glicerol à - 80 ° C (GAO et al., 2013). A manutenção da cepa foi realizada em placas de Petri, sendo os repiques realizados a cada quatro semanas e mantidos sob refrigeração à 4 °C. A ativação ocorreu em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio adicionado de 2 alças de platina com o microrganismo, sendo incubadas em shaker à 30 ° C, 150 rpm por 24h. O pré-inóculo consistiu na transferência de 10% (v/v) do meio de Ativação para novo frasco Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio por 48h nas mesmas condições descritas.

4.2.2 Produção de Soforolipídios

Para a produção de SL, três fermentações foram realizadas à 30 °C, inóculo padronizado a 10 % (v/v) por 288 h. Fermentações 1 e 2 em frascos Erlenmeyers de 500 mL com volumes operacionais de 50 e 100 mL, respectivamente, a 150 rpm e sem controle de pH. Fermentação 3 em biorreator com capacidade máxima de 5 L (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda), volume operacional de 3,5 L, a 450 rpm, 1 vvm e pH controlado em 3,5. As fermentações foram acompanhadas pela coleta de

amostras, as quais foram interrompidas por centrifugação a 9956 x g por 15 min. Do precipitado foi avaliada a biomassa e do sobrenadante quantificado SL e consumo de substratos.

4.2.3 Extração e Quantificação dos Soforolipídios

A biomassa foi lavada três vezes com acetato de etila na proporção de 1:1 (v/v) para remoção de impurezas. O sobrenadante foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila (1:1) e rotaevaporado. A fração obtida foi submetida a nova extração em funil de separação com solução metanol água 4:1 (v/v) e hexano (v/v) nas proporções de 1:1 (v/v), afim de se obter o SL bruto retido na fração metanólica e remover as impurezas lipídicas presentes na fase hexânica. Após secagem do metanol, o SL bruto foi submetido à três extrações com acetato de etila e água (3:1) por 40 minutos à 4 °C para eliminação de possíveis açúcares residuais na fase aquosa.

O SL foi seco em estufa até eliminação completa do solvente e liofilizado (MINUCELLI et al., 2017). As quantificações dos sofrorolipídios foram realizadas por gravimetria (MINUCELLI et al., 2017) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em comparação com o padrão 1',4"-sophorolactona 6', 6"-diacetato (Sigma Aldrich, USA), utilizando detector de arranjo de iodo, utilizando coluna Shim-pack CLC-ODS(M)® C18 da Shimadzu (4,6 x 250mm; 4,6mm; 12nm) e 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 (HU; JU, 2001; WADEKAR et al., 2012).

4.2.4 Crescimento Microbiano e Consumo de Substratos

Para acompanhamento da biomassa, o pellet formado da centrifugação foi ressuspensão em 5 mL de água destilada, secos em estufa à 100 ° C e determinado o peso seco por gravimetria (MINUCELLI et al., 2017). A glicose e o ácido oleico residuais foram quantificados para determinar o consumo desses substratos pelo microrganismo durante e ao final da fermentação. A glicose residual foi quantificada pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), a partir do

sobrenadante. O ácido oleico foi quantificado por gravimetria, a partir da extração com hexano.

4.2.5 Atividade Antibacteriana dos Soforolipídios

4.2.5.1 Concentração inibitória mínima

Foi realizada pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços (documentos M07-A9 e M11-A6 do CLSI, 2012). As concentrações de SL testadas foram de 15,6 a 2.000 µg/mL para bactérias Gram-positivas e de 78,1 a 10.000 µg/mL para bactérias Gram-negativas. Para o ácido láctico (LA) (Labsynth®) as concentrações foram de 0,04% a 5% para todas as bactérias. Meio contendo apenas SL ou LA foram utilizados como controles.

As bactérias foram preservadas em BHI (25% de glicerol a - 80 ° C). *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella spp.* foram ativadas em meio MH à 37 °C por 24 h; *C. perfringens* em BHI em anaerobiose (Anaerocult® Merck) e *C. jejuni* em TC em microaerofilia (Microaerobac® Probac) à 42 °C por 48 h. As células bacterianas foram ajustadas a 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e essas suspensões diluídas à $5,0 \times 10^5$ UFC/poço, sendo tratadas com as diferentes concentrações de SL e LA, incubadas à 42 °C por 48h para *C. perfringens* e *C. jejuni* e à 37 °C por 24 h para as demais bactérias.

Após o período de incubação, alíquotas de 10 µL dos poços foram plaqueadas em ágar nutriente e incubadas por 24 h, sendo os resultados avaliados visualmente. A CIM foi definida como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano em comparação com o controle após plaqueamento.

4.2.5.2 Teste de Checkerboard

Para avaliar os efeitos antibacterianos da interação do SL com LA foram realizados testes de microdiluição em duplo gradiente, utilizando placas de 96 poços com as concentrações dos antibacterianos variando da CIM à oito diluições seriadas duplas. A preparação das bactérias foi realizada com a mesma metodologia do teste da CIM. A concentração fracionada inibitória (FIC) de cada composto foi

determinada pela razão entre a CIM do antibacteriano individual e a CIM do composto em combinação. A classificação da interação foi baseada nos seguintes parâmetros: $FICI \leq 0.5$: sinergismo; $0.5 < FICI \leq 1$: aditismo, $1 < FICI < 4$: indiferente e $FICI \geq 4$: antagonismo (CHIN; WEITZMAN, 1997). As interações entre os compostos foram analisadas pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI), utilizando a seguinte equação:

$$\Sigma FICI = FIC_{SL} + FIC_{LA}$$

$$\Sigma FICI = \frac{(\text{CIM do SL em combinação})}{(\text{CIM do SL})} + \frac{(\text{CIM do LA em combinação})}{(\text{CIM do LA})}$$

4.2.5.3 Curva de crescimento e morte bacteriana

Foram realizadas curvas para *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *C. perfringens* em placas de 96 poços, de acordo com o documento M-26A do CLSI (2012). Quatro condições foram avaliadas: (1) bactérias tratadas com SL, (2) bactérias tratadas com LA, (3) combinação dos antibacterianos e (4) controle. As concentrações do SL e LA foram baseadas no CIM, e para a combinação foram utilizadas as concentrações de FIC. As bactérias foram ajustadas a 0,5 da escala McFarland e incubadas à 10^6 UFC/mL. Para *L. monocytogenes* e *S. aureus*, as curvas foram construídas em oito tempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h) à 37 °C. Para *C. perfringens*, a curva de crescimento foi a cada 12 h por 48 h (42 °C). Alíquotas de 10 µL das culturas tratadas e não tratadas foram plaqueadas em ágar nutriente para quantificar as células viáveis (UFC/mL). (NCCLS, 1999).

4.2.6 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade do SL foi realizado em triplicata por teste com Resazurina (7-hidroxi-10-óxido-fenoxazina-10-ium-3-ona) em placa de 96 poços. A linhagem celular utilizada foi HepG2 / C3A foi cultivada em frascos contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) à uma densidade de 2×10^4 células/poço por 24 h à 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Após esse período de incubação, o meio foi removido e substituído por novo com diferentes

concentrações de SL (250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 µg/mL). O DMSO foi utilizado como solvente de solubilização (concentração final de 0,2%) e testado como controle veículo. Após 24 h de tratamento, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato e a Resazurina foi adicionada a uma concentração final de 60 µM por poço. As células foram incubadas a 37 °C durante 3 h e a fluorescência lida com VICTOR 3 (Perkin Elmer) a 530-560 nm de excitação e 580-600 nm de emissão (AQUINO et al., 2013).

4.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foi utilizada para observar a morfologia celular de *L. monocytogenes* e *S. aureus* com os tratamentos SL, LA e SL + LA. As bactérias foram cultivadas em ágar MH por 24h à 37 °C e ajustadas à 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Inóculos de 500 µL foram combinados com 500 µL de meio MH (controle), meio MH + SL, meio MH + LA e meio MH + SL + LA.

As concentrações dos tratamentos foram baseadas nos resultados obtidos no MIC e FIC, e o tempo de incubação foi de 5 h à 37 °C para todos tratamentos. Os cultivos foram centrifugados três vezes a 4500 rpm por 15 min com tampão fosfato-salino. O pellet foi ressuspensão no fixador 2,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e 20 µL foram transferidos para lamínulas de vidro previamente revestidas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich).

Cada lâmina foi fixada com 2, 5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 20 h, seguido de pós fixação em OsO₄ a 1% por 30 minutos. Amostras fixadas foram desidratadas em gradiente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e secas pelo método do ponto crítico usando CO₂ (BALTED CPD 030 Critical Point Dryer). As lâminas foram revestidas com ouro (BALTED SDC 050 Sputter Coater) e observadas em MEV (FEI Quanta 200) (ZHANG et al., 2016b).

4.2.8 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o Software R (R CORE TEAM, 2016). Os dados de produção de SL foram avaliados por análise de variância (ANOVA), sendo os pressupostos do modelo, homogeneidade de variância e normalidade dos erros, verificados segundo teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) e

teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965). Para o teste de comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). A concentração inibitória de 50 % (IC_{50}), referente ao teste de citotoxicidade do SL, foi estimado com uso do pacote NPLR de regressão logística (COMMO; BOT, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigos.

Artigo 1: Production of sophorolipids by *Candida bombicola* and its application against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* (ANEXO A). O artigo foi submetido à revista Preparative Biochemistry & Biotechnology, sendo as normas apresentadas no link:

<<https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?journalCode=lpbb20&page=instructions>>

Artigo 2: Antibacterial properties of sophorolipids and lactic acid against poultry pathogens (ANEXO B). O artigo será submetido à revista Food Control, sendo as normas apresentadas no link:

<<https://www.elsevier.com/journals/food-control/0956-7135/guide-for-authors>>

6 CONCLUSÕES

- As produções de soforolipídios foram 71,98; 50,63 e 69,83 g/L correspondendo às produtividades 0,25; 0,18 e 0,24 g/L.h⁻¹ nas fermentações em Erlenmeyer com 50 mL e 100 mL e em biorreator com 3,5 L, respectivamente.
- Os consumos de glicose e ácido oleico aumentaram progressivamente com o tempo de fermentação, atingindo 78,97 e 87,04 g/L em 50 mL, 80,88 e 94,03 g/L em 100 mL e 93,89 e 72,21 g/L em biorreator em 288 h.
- Em comparação ao padrão 1',4"-Sophorolactone 6',6"-diacetate, pela análise de HPLC, a composição formada do SL foi 95 % lactônica.
- Os soforolipídios produzidos tiveram ação contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens* e *C. jejuni* em menos de 24 horas, sendo que para essas duas últimas bactérias não existem relatos bibliográficos.
- O ácido láctico inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas e a combinação com os soforolipídios resultou em uma interação aditiva, reduzindo pela metade o valor de CIM.
- As imagens da microscopia eletrônica de varredura demonstraram alterações morfológicas nas células de *S. aureus* e *L. monocytogenes* após tratamentos com soforolipídios, ácido láctico e a combinação de ambos.
- O teste de citotoxicidade dos soforolipídios realizado em células HepG2 demonstrou que concentrações $\geq 62,5$ $\mu\text{g/mL}$ reduziram de forma significativa a viabilidade celular e o IC₅₀ calculado foi de 58,97 $\mu\text{g/mL}$.
- O tratamento combinado de soforolipídios com ácido láctico demonstrou grande viabilidade de aplicação, uma vez que garante eficácia antibacteriana em concentrações abaixo do valor de citotoxicidade encontrado.

- Dessa forma, o presente trabalho demonstrou a viabilidade de produção de soforolipídios e ação antimicrobiana contra bactérias contaminantes da carne de frango, sugerindo um potencial inovador para aplicação como sanitizante na indústria avícola.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **Relatórios Anuais da Associação Brasileira de Proteína Animal**. 2018 Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em: set. 2018.
- AHMED, J.; HIREMATH, N.; JACOB, H. Antimicrobial, rheological and thermal properties of plasticized polylactide films incorporated with essential oils to inhibit *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 2, p.419-429, 2016a.
- AHMED, J.; HIREMATH, N.; JACOB, H. Efficacy of antimicrobial properties of polylactide / cinnamon oil film with and without high-pressure treatment against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* inoculated in chicken sample. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 72–78, 2016b.
- AHMED, J.; MULLA, M.; ARFAT, Y. A.; BHER, A.; JACOB, H.; AURAS, R. Compression molded LLDPE films loaded with bimetallic (Ag-Cu) nanoparticles and cinnamon essential oil for chicken meat packaging applications. **LWT – Food Science and Technology**. doi: 10.1016/j.lwt.2018.03.051, 2018.
- AKARI, S.; AKARI, Y. Method of modifying quality of wheat flour product. **Japanese patent 61205449**, 1987.
- ANDERSON, M.E.; MARSHALL, R.T.; STRINGER, W.C.; NAUMANN, H.D. Efficacies of three sanitizers under six conditions of application to surfaces of beef. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 2, p. 326–329, 1977.
- AQUINO, I.; TSUBOY, M.S.F.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; PERAZZO, F.F. Genotoxic evaluation of the antimalarial drugs artemisinin and artesunate in human HepG2 cells and effects on CASP3 and SOD1 gene expressions. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2517–2527, 2013.
- ASHBY, R.D.; NUÑEZ, A.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 9, p. 625–630, 2005.
- ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 10, p. 1429–1437, 2010.
- ASMER, H.J.; HANS, J.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 9, p. 1460–1466, 1988.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresour Technol**, v. 51, p. 1–12, 1995.

BANAT, I.M.; SATPUTE, S.K.; CAMEOTRA, S.S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N.V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–18, 2014.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, serie A, London, 160:268-282, 1937.

BERGSTROM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. Pyolipic acid, a metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea*, active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 10, p. 165–166, 1946.

BLEVINS, R.E.; KIM, S.A.; PARK, S.H.; RIVIERA, R.; RICKE, S.C. **Food and Feed Safety Systems and Analysis**, Chapter 18: Elsevier Inc., 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811835-1.00018-X>>

BOLDER, N.M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 7, p. 221–227, 1997.

BORSANYIOVA, M.; PATIL, A.; MUKHERJI, R.; PRABHUNE, A.; BOPEGAMAGE, S. Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 1, p. 85-89, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carnes de Aves. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1998. Seção 1, p. 226.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 4, de 4 de Outubro de 2011. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio Brasil 2016/17 a 2026/27. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2017.

BREITHAUPT, TB; LIGHT, RJ. Affinity chromatography and further characterization of the glucosyltransferases involved in hydroxydocosanoic acid sophoroside production in *Candida bogoriensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 16, p. 9622–9628, 1982.

BROWN, MJ; ROBINSON, JP; SPRINGHAM, D. G. Microbial enhanced oil recovery: progress and prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 2, p. 159–197, 1986.

CASAS, J. A.; GARCÍA DE LARA, S.; GARCÍA-OCHOA, F. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 3, p. 221–229, 1997.

CASAS, J. A.; GARCÍA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 488–494, 1999.

CAVALERO, D. A.; COOPER, D.G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 31–41, 2003.

CHEN, J; SONG, X; ZHANG, H; QU, Y. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 501–506, 2006.

CHIN, N.; WEITZMAN, I; DELLA-LATTA, P. In Vitro Activity of Fluvastatin , a Cholesterol-Lowering Agent , and Synergy with Fluconazole and Itraconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n.4, p.850-852, 1997.

CLAUS, S; VAN BOGAERT, INA. Sophorolipid production by yeasts: a critical review of the literature and suggestions for future research. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 21, p. 7811–7821, 2017.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard, M07-A8 — Ninth Edition. Wayne, PA, USA, 2012.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (EU) nº 101/2013 da Comissão de 4 de fevereiro de 2013 relativo à utilização do ácido láctico para reduzir a contaminação superficial microbiológica das carcaças de bovinos. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, 5 fev, 2013.

COMMO, F.; BOT, B.M. **R package nplr n-parameter logistic regressions**. p. 1–11, 2016.

CONCAIX, F. Use of Sophorolipids Comprising Diacetyl Lactones as Agent for Stimulating Skin Fibroblast Metabolism, **U S Patent 6596**, 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.

DANIEL, HJ; REUSS, M; SYLDATK, C. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 12, p. 1153–1156, 1998.

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.

DAVILA, AM; MARCHAL, R; VANDECASTEELE, JP. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 6-11, 1992.

DENGLE-PULATE, V; CHANDORKAR, P; BHAGWAT, S; PRABHUNE, AA. Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 17, n. 3, p. 543–552, 2014.

DEPNER, R. **Contaminação por mesófilos e enterobactérias e dos aspectos operacionais entre os métodos de refile**. 2015. 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Sanidade e Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

DESAI, JD; BANAT, IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47–64, 1997.

DEY, G; BHARTI, R; SEN, R; MANDAL, M. Microbial amphiphiles: A class of promising new-generation anticancer agents. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 136–146, 2015.

DIAZ DE RIENZO, MADD; DOLMAN, B; GUZMAN, F; KAISERMANN, C; WINTERBURN, J; BANAT, IM; MARTIN, P. Antimicrobial properties of sophorolipids produced by *Candida Bombicola* ATCC 22214 against gram positive and Gram-negative bacteria. **New Biotechnology**, v. 31, S66–S67, 2014.

DIAZ DE RIENZO, MA; STEVENSON, PS; MARCHANT, R; BANAT, IM. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram positive and negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 44, n. 0, p. 1–22, 2015.

DIAZ DE RIENZO, MA; STEVENSON, PS; MARCHANT, R; BANAT, IM. Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5773–5779, 2016.

DIAZ DE RIENZO, MA; STEVENSON, PS; MARCHANT, R; BANAT, IM. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm disruption using microbial surfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 868–876, 2016.

DOLMAN, BM; KAISERMANN, C; MARTIN, PJ; WINTERBURN, JB. Integrated sophorolipid production and gravity separation. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 162–171, 2017.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performances objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v. 9, n.4, p. 2105, 2011.

ENDERSEN, L.; MAHONY, J. O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MCAULIFFE, O.; COFFEY, A. Phage Therapy in the Food Industry. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 327–49, 2014.

ESDERS, TW; LIGHT, RJ. Glucosyl- and acetyltransferases involved in the biosynthesis of glycolipids from *Candida bogoriensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 1375–1386, 1972.

FELSE, PA; SHAH, V; CHAN, J; RAO, KJ; GROSS, RA. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 316–323, 2007.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091–2099, 2008.

FRACCHIA, L; BANAT, JJ; CAVALLO, M; CERESA, C; BANAT, IM. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 144–162, 2015.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.

GAO, R; FALKEBORG, M; XU, X; GUO, Z. Production of sophorolipids with enhanced volumetric productivity by means of high cell density fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1103–1111, 2013.

GILL, CO. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. **The Microbiology of Meat and Poultry**, p. 118–157, 1998.

GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.F.T.; TULLOCH, A.P. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, n. 6199, p. 846–855, 1961.

GROSS, R.; SHAH, V. Sophorolipids as protein inducers and inhibitors in fermentation medium, **World Patent 2007073371**, 2007.

GUILMANOV, V; BALLISTRERI, A; IMPALLOMENI, G; GROSS, RA. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 489–494, 2002.

GUPTA, R. **Biosynthesis of novel sophorolipids using *Candida bombicola* ATCC 22214: characterization and applications**. 2012.Tese (Doutorado em Biotecnologia), Laboratório da Divisão em Bioquímica e Química, Universidade de Pune, Pune, 2012.

HAQUE, F; ALFATAH, MD; GANESAN, K; BHATTACHARYYA, MS. Inhibitory Effect of Sophorolipid on *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Growth. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.

HILLION, G. Use of a sophorolipid to provide free radical formation inhibiting activity or elastase inhibiting activity, **US Patent 5.756.471**, 1998.

HOMMEL, R; STIIWER, O; STUBER, W; HAFERBURG, D; KLEBER, HP. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 199–205, 1987.

HU, Y.; JU, L. K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 10, p. 593–601, 2001.

HUGAS, M; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination : The role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**, v. 78, p. 43–52, 2008.

JAMES, W. O.; PRUCHA, J. C.; BREWER, R. L. Cost-Effective techniques to control human enteropathogens on fresh poultry. **Poultry Science**, v. 72, n. 1174–1176, 1993.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P; GEA, T; SÁNCHEZ, A; FONT, X. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 115, p. 93–100, 2016.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P; CASTILLEJOS, M; KOH, A; GROSS, R; SÁNCHEZ, A; FONT, X; GEA, T. Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 2735-2747, 2017.

JOSHI-NAVARE, K; PRABHUNE, A. A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

JOSHI-NAVARE, K; SHIRAS, A; PRABHUNE, A. Differentiation-inducing ability of sophorolipids of oleic and linoleic acids using a glioma cell line. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 5, p. 509–512, 2011.

KAUR, K; SANGWAN, S; KAUR, H. Biosurfactant production by yeasts isolated from hydrocarbon polluted environments. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 12, 2017.

KIM, HS; KIM, YB; LEE, BS; KIM, EK. Sophorolipid production by *Candida bombicola* ATCC 22214 from a corn-oil processing byproduct. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 55–58, 2005.

KIM, YB; YUN, HS; KIM, EK. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6028–6032, 2009.

KOH, A; GROSS, R. A versatile family of sophorolipid esters: Engineering surfactant structure for stabilization of lemon oil-water interfaces. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 507, p. 152–163, 2016.

KONISHI, M; YOSHIDA, Y; HORIUCHI, JI. 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.

LANG, S; BRAKEMEIER, A; HECKMANN, R; SPOCKNER, S; RAU, U. Production of native and modified sophorose lipids. **Chimica Oggi-Chemistry Today**, v. 18, p. 76–79, 2000.

LI, Y.; YANG, H.; SWEM, B. L. Effect of High-temperature Inside-Outside Spray on Survival of *Campylobacter jejuni* Attached to Prechill Chicken Carcasses, **Poultry Science**, v. 81, p.1371–1377, 2002.

LINTON, JD. Metabolite production and growth efficiency. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 60, n. 3–4, p. 293–311, 1991.

LO, CM; JU, LK. Sophorolipids-induced cellulose production in cocultures of *Hypocrea jecorina* Rut C 30 and *Candida bombicola*. **Enzyme Microb Technol**, v. 44, p. 107–111, 2009.

LYDON, HL; BACCILE, N; CALLAGHAN, B; MARCHANT, R; MITCHELL, CA; BANAT, IM. Adjuvant antibiotic activity of acidic sophorolipids with potential for facilitating wound healing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, 2017.

MAENG, Y; KIM, KT; ZHOU, X; JIN, L; KIM, KS; KIM, YH; LEE, S; PARK, JH; CHEN, X; KONG, M; CAI, L; LI, X. A novel microbial technique for producing high-quality sophorolipids from horse oil suitable for cosmetic applications. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 917–929, 2018.

MAGAR, H.; ROTH LISBERGER, R.; WZGNER, F. Use of sophorose-lipid lactone for the treatment of dandruffs and body odor, **European Patent 0209783**, 1987.

MAHAMI, T.; TOGBY-TETTEH, W.; KOTTOH, D. I.; AMOAKOAH-TWUM, L.; GASU, E.; NANA, S.; ANNAN, Y.; LARBI, D.; ADJEI, I.; ADU-GYAMFI, A. Microbial Food Safety Risk to Humans Associated with Poultry Feed: The Role of Irradiation. **International Journal of Food Science**. doi: 10.1155/2019/6915736, 2019.

MAKKAR, RS; CAMEOTRA, SS; BANAT, IM. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MARCHANT, R; BANAT, IM. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 9, p. 1597–1605, 2012.

MILLER, RM. Biosurfactant-facilitated remediation of metal contaminated soils. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 59–62, 1995.

MINUCELLI, T; RIBEIRO-VIANA, RM; BORSATO, D; ANDRADE, G; CELY, MVT; DE OLIVEIRA, MR; BALDO, C; CELLIGOI, MAPC. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 743–753, 2017.

MORSHEDY, A. E. M. A.; SALLAM, K. I. Improving the microbial quality and shelf life of chicken carcasses by trisodium phosphate and lactic dipping. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n.7, p.645-650, 2009.

MORYA, VK; PARK, JH; KIM, TJ; JEON, S; KIM, EK. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 282–288, 2013.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**. Approved Guideline, M26-1, v. 19, n. 18, Wayne, PA, USA: CLSI. 1999.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375–80, 1944.

NITSCHKE, M.; COAST, SG. Biosurfactants in food industry. **Trends Food Sci Technol**, v. 18, p. 252–259, 2007.

NITSCHKE, M; PASTORE, GM. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NITSCHKE, M; SILVA, SS. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, p. 1–8, 2017.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Prudent Practices in the Laboratory: handling and disposal of chemicals. Commission on Physical Sciences, Mathematics, and Applications. **National Academy Press**. Washington, D.C. 1995.

OLANYA, OM; UKUKU, DO; SOLAIMAN, DKY; ASHBY, RD; NIEMIRA, BA; MUKHOPADHYAY, S. Reductionin *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on tomato by sophorolipid and sanitiser as affected by temperature and storage time. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1303–1315, 2018.

OLIVEIRA, AA; ANDRADE, MA; ARMENDARIS, PM; BUENO, PHS. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 79–89, 2016.

OLIVEIRA, MR; MAGRI, A; BALDO, C; CAMILIOS-NETO, D; MINUCELLI, T; CELLIGOI, MAPC. Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 16, n. 2, p. 161–174, 2015.

PANG, X.; YUK, H. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the sanitizer sensitivity of *Salmonella Enteritidis* biofilm cells in chicken juice. **Food Control**, v. 86, p. 59–65, 2018.

PAREKH, VJ; PATRAVALE, VB; PANDIT, AB. Mango kernel fat : A novel lipid source for the fermentative production of sophorolipid biosurfactant using *Starmerella Bombicola* NRRL -Y 17069, **Annals of Biological Research**, v. 3, n. 4, p. 1798–1803, 2012.

PAULINO, BN; PESSÔA, MG; MANO, MCR; MOLINA, G; NERI-NUMA, IA; PASTORE, GM. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 24, p. 10265–10293, 2016.

PEKIN, G; VARDAR-SUKAN, F; KOSARIC, N. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 4, p. 357–362, 2005.

PESCE, L. A biotechnological method for the regeneration of hydrocarbons from dregs and muds, on the base of biosurfactants, **World Patent 02/062495**, 2002.

PIERCE, D; HEILMAN, TJ. **Germicidal composition, World Patent 16192**, 1998.

PONTES, C; ALVES, M; SANTOS, C; RIBEIRO, MH; GONÇALVES, L; BETTENCOURT, AF; RIBEIRO, IAC. Can sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 697–708, 2016.

RASHAD, MM; NOOMAN, MU; ALI, MM; MAHMOUD, AE. Production, characterization and anticancer activity of *Candida bombicola* sophorolipids by means of solid state fermentation of sunflower oil cake and soybean oil. **Grasas Aceites**, v. 65, n. 2, p. 1–11, 2014.

RAU, U; HAMMEN, S; HECKMANN, R; WRAY, V; LANG, S. Sophorolipids: A source for novel compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 2, p. 85–92, 2001.

R Development Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, (2016).

REBELLO, S; ANEESH, EM; SINDHU, R; BINOD, P; PANDEY, A. Biosynthesis and Technological Advancements of Biosurfactants. **Biosynthetic Technology and Environmental Challenges**, Chapter 10, p. 167–183, 2018.

RIBEIRO, IA; BRONZE, MR; CASTRO, MF; RIBEIRO, MHL. Optimization and correlation of HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS methods for identification and characterization of sophorolipids. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 899, p. 72–80, 2012.

RISPOLI, FJ.; BADIA, D; SHAH, V. Optimization of the fermentation media for sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 4, p. 938–944, 2010.

ROUGER, A.; TRESSE, O.; ZAGOREC, M. Bacterial Contaminants of Poultry Meat : Sources, Species and Dynamics. **Microorganisms**, n. 5, v. 50, 2017.

RUSSEL, S. **Chlorine: Still the Most Popular Sanitizer in the Poultry Industry**. 2007.

SAERENS, KMJ;ROELANTS, SL; VAN BOGAERT, IN; SOETAERT, WIM. Identification of the UDP-glucosyltransferase gene UGTA1, responsible for the first glucosylation step in the sophorolipid biosynthetic pathway of *Candida bombicola* ATCC 22214. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 1, p. 123–132, 2011.

SAMAD, A; ZHANG, JI; CHEN, D; CHEN, X; TUCKER, M; LIANG, Y. Sweet sorghum bagasse and corn stover serving as substrates for producing sophorolipids. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 353–362, 2017.

SATPUTE, SK; PŁAZA, GA; BANPURKAR, AG. Biosurfactants' Production from Renewable Natural Resources: Example of Innovative and Smart Technology in Circular Bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 25, n. 1, 2017.

SCHIPPERS, C; GEBNER, K; MULLER, T; SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of sophorolipid mixture. **Journal of Biotechnology**, v. 83, p. 189–198, 2000.

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

SHAH, V; DONCEL, GF; SEYOUM, T; EATON, KM; ZALENSKAYA, I; HAGVER, R; AZIM, A; GROSS, R. Sophorolipids , Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4093–4100, 2005.

SHAH, V; BADIA, D; RATSEP, P. Sophorolipids having enhanced antibacterial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 397–400, 2007.

SHAO, L; SONG, X; MA, X; LI, H; QU, Y. Bioactivities of sophorolipid with different structures against human esophageal cancer cells. **Journal of Surgical Research**, v. 173, n. 2, p. 286–291, 2012.

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

SHARMA, R.; OBEROI, H. S. Biosurfactant-Aided Bioprocessing: Industrial Applications and Environmental Impact. **Recent advances in Applied Microbiology**, Chapter 3, 2017.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 58, p. 9–14, 1988.

SOLAIMAN, DKY; ASHBY, RD; ZERKOWSKI, JA; FOGLIA, TA. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1341–1347, 2007.

SOMOGYI, M. A New Reagent for Determination of Sugars. **A new Sugar Reagent**, p. 61–68, 1945.

STEFANI, LM; BACKES, RG; FARIA, GA; BIFFI, CP; ALMEIDA, JM; KRYSTINE, H; BASSI, G; LANGARO, A. Trimming and washing poultry carcass to reduce microbial contamination : A comparative study, **Poultry Science**, p. 1–4, 2011.

TANG, J.; HE, J.; XIN, X.; HU, H.; LIU, T. Biosurfactants enhanced heavy metals removal from sludge in the electrokinetic treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, n. 73, p. 2579–2592, 2018.

TOLDRÁ, F. **Safety of meat and processed meat**. University of Georgia, U.S.A. Ed. Springer. 699 p. 2009.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Microbial Biosurfactants Market (Rhamnolipids, Sophorolipids, Mannosylerythritol Lipids (MEL) and Other) for Household Detergents, Industrial & Institutional Cleaners, Personal Care, Oilfield Chemicals, Agricultural Chemicals, Food Processing, Textile. v. 4, p. 74, 2014.

U.S.A. United States Department of Agriculture – USDA. **Food Safety and Inspection Service** – FSIS. FSIS Directive 7120.1 Revision 33. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. Washington, DC. 2016.

VALOTTEAU, C; BANAT, IM; MITCHELL, CA; LYDON, H; MARCHANT, R; BABONNEAU, F; PRADIER, CM; BACCILE, N; HUMBLLOT, V. 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, INA; SAERENS, K; DE MUYNCK, C; DEVELTER, D; SOETAERT, W; VANDAMME, EJ. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23–34, 2007.

VAN BOGAERT, INA; GROENEBOER, S; SAERENS, K; SOETAERT, W. The role of cytochrome P450 monooxygenases in microbial fatty acid metabolism. **FEBS Journal**, v. 278, n. 2, p. 206–221, 2011.

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

WADEKAR, S; KALE, S; LALI, A; BHOWMICK, D; PRATAP, 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**, v. 89, n. 6, p. 1029–1039, 2012.

WHO. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases**. 2015. Disponivel em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/>.

YE, M.; SUN, M.; WAN, J.; FENG, Y.; ZHAO, Y.; TIAN, D.; HU, F.; JIANG, X. Feasibility of lettuce cultivation in sophorolipid-enhanced washed soil originally polluted with Cd, antibiotics, and antibiotic-resistant genes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 344–350, 2016.

YOO, DS; LEE, BS; KIM, EK. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 1164–1169, 2005.

ZHANG, X; ASHBY, R; SOLAIMAN, DKY; UKNALIS, J; FAN, X. Inactivation of *Salmonella spp.* and *Listeria spp.* by palmitic, stearic, and oleic acid sophorolipids and thiamine dilauryl sulfate. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–11, 2016a.

ZHANG, X; FAN, X; SOLAIMAN, DKY; ASHBY, RD; LIU, Z; MUKHOPADHYAY, S; YAN, R. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on the surface of spinach leaves by biobased antimicrobial surfactants. **Food Control**, v. 60, p. 158–165, 2016b.

ZHANG, X; ASHBY, RD; SOLAIMAN, DKY; LIU, Y; FAN, X. Antimicrobial activity and inactivation mechanism of lactic and free acid sophorolipids against *Escherichia coli* O157:H7. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 176–182, 2017.

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

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 5, p. 477–482, 1993.

ZHOU, Q; KOSARIC, N. Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal of the American Oil Chemists'**

Society , v. 72, n.1, p. 67–71, 1995.

ZIEMBA, AM; GOTTIPATI, MK; TOTSINGAN, F; HANES, CM; GROSS, RA; LENNARTZ, MR; GILBERT, RJ. Sophorolipid Butyl Ester Diacetate Does Not Affect Macrophage Polarization but Enhances Astrocytic Glial Fibrillary Acidic Protein Expression at Micromolar Concentrations in Vitro. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 752–758, 2017.

ANEXOS

ANEXO A

Application of sophorolipids produced by *Candida bombicola* against pathogens of poultry industry

Victória Akemi Itakura Silveira¹, Erick Kenji Nishio², Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas¹, Ismael R. Amador¹, Renata Katsuko Takayama Kobayashi², Nicole Caldas Pan³, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}

¹ Department of Biochemistry and Biotechnology, Center of Exact Sciences. ² Department of Microbiology, Center of Biological Sciences. ³ Department of Statistics, Center of Exact Sciences. State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

***Corresponding author:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Department of Biochemistry and Biotechnology, Center of Exact Sciences, State University of Londrina, CEP 86.057-970, Londrina, PR, Brazil, Phone: +55 (43) 3371-4270, Fax: +55 (43) 3371-4054, e-mail: macelligoi@uel.br

Abstract

The increasing environmental awareness associated with the growing cases of multi-drug resistant bacteria led to a search for antimicrobial alternatives. Sophorolipids are glycolipids with desirable properties to a broad range of industrial applications, highlighting its potential antimicrobial activity. The objective of this research was to produce sophorolipid from *Candida bombicola* and evaluate its antimicrobial activity individually and combined with lactic acid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni*. Results showed that the highest production and productivity of sophorolipid were 71.98 g/L with 0.25 g/L.h⁻¹, predominantly 95 % of lactonic form. Sophorolipid and lactic acid were capable of eradicating *C. perfringens* and *C. jejuni* and the interaction of these compounds reduced in 50% the required concentration to this inhibition. The antibacterial efficacy was tested for 48 h of incubation with sophorolipids, lactic acid and interaction of these compounds on *C. perfringens*, resulting in total eradication after 24 h for all treatments. Our study achieved good lactonic sophorolipid production, which was capable of eradicating *C. perfringens* and *C. jejuni* after 24 h.

Keywords: Biosurfactant, chicken pathogens, antibacterial, fermentation, foodborne disease, lactic acid

Introduction

The increasing environmental awareness in the last decades led to a search for alternatives to the synthetic surfactants obtained from chemical and petrochemical sources. Biosurfactants are biologically synthesized surface-active agents produced as metabolic by-products and have gained great attention and interest by the green market because of the many advantages over the chemical derivatives, such as biodegradability and ecological nature, low toxicity, high selectivity due the presence of specific functional groups and good efficiency under extreme environmental conditions of temperature, pH and salinity, which makes them suitable for a wide range of industrial applications [1,2]. It has been observed a substantial growth in the production of biosurfactants worldwide. In 2013, production reached 344,068 tons and it is expected to increase to 476,512 tons still in year [3].

One of the most promising class of biosurfactants is the sophorolipids (SL), the non-toxic microbial glycolipids with desirable biological and physical-chemical characteristics to a broad range of industrial and biotechnological applications. SL is produced by a variety of microorganisms, highlighting the use of *Candida bombicola*, due its high yields and Generally Recognized as Safe (GRAS) status. It is composed of a sophorose disaccharide (O β -D-glycopyranosyl-2 \rightarrow 1- β -D-glycopyranose) bound to a terminal or sub-terminal fatty acid length typically with 16-18 carbons [4]. During the production process, many different congeners are formed, but two common structures described are the lactonic (ester) and acidic (carboxyl) groups. In the first form, the fatty acid is joined by an ester bound to the second glucose monomer, giving a close ring structure (Figure 1a), while in the acidic form, the fatty acid is only linked to one glucose monomer, presenting an open structure (Figure 1b). SL may also vary in terms of acetylation degree of the sophorose head and unsaturation of the fatty acid moiety [5,6].

SL applications are widely documented in the most diverse areas, such as detergents and low foaming agents in cleaning products, cosmetic components in anti-dermatitis and fibroblasts regeneration, bioremediation, anti-spermicidal and anti-cancer activity and also a growing attention has been directed to its antimicrobial properties [7–11], because of the need to find alternative compounds to deal with the increasing cases of resistant bacteria to the conventional drugs. SL antimicrobial and anti-biofilm activity has been described to a variety species of Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi [12–15]. Although, its action against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* has never been reported.

Clostridium perfringens is an anaerobic Gram-positive bacteria highly associated with foodborne diseases. It causes necrotic enteritis in chicken and other animals and severe gastroenteritis in humans, which is often linked to the consume of cooked meat and poultry products. Contaminated chicken products are recognized as the main source of this type of infection, highlighting a potential public health threat and significant economic losses to the chicken producers [16,17].

Campylobacter spp. is a microaerophilic Gram-negative bacteria considered the most common cause of human gastrointestinal worldwide [18]. Its typically found in intestinal tract of food producing animals and human exposure normally occurs through the consumption of meat products, in particular raw or undercooked poultry meat [19]. In chicken, *Campylobacter* may colonize its gastrointestinal tracts in an asymptomatic form, which increase concerns about the spread of this microorganism during production and processing, resulting in contamination of both live animals and processed carcasses [20]. *Campylobacter* resistant strains to commonly used antimicrobials in the poultry industry have also been described [19].

Therefore, considering the properties of the sophorolipids that ensures great industrial application, this work aimed to produce SL of *Candida bombicola* and test their

antibacterial activity against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni*, for potential use as an alternative antimicrobial agent in the poultry industry.

Experimental

Sophorolipids Production

Strain and preservation

The strain *Candida bombicola* ATCC 22214 (synonym: *Starmerella bombicola*) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA. The yeast was maintained cryopreserved in stock solutions containing 25 % (v/v) glycerol at – 80 °C. *C. bombicola* was subcultured every 4 weeks in Yeast Malt (YM) agar Petri plates (in g/L: yeast extract, 3; malt extract, 3; peptone, 5; glucose, 10 and agar, 20) and kept under refrigeration [21].

Inoculum conditions and sophorolipid fermentation

First, a loopful of *C. bombicola* cells were activated in a medium containing g/L: glucose, 100; yeast extract, 10 and urea, 1 for 24 h, 150 rpm and 30 °C. After, 10 % (v/v) was collected from the previous medium and added to a new flask containing g/L: glucose, 77.5; yeast extract, 2.5 and oleic acid, 75 48 h, 150 rpm and 30 °C [9]. Three fermentations were conducted in this study. Fermentation 1 and 2 were run in 500 mL shake-flasks containing different operational volumes of 50 and 100 mL, respectively. The conditions were 10 % seed medium, 150 rpm, 30 °C, no pH control, for 288 h. Fermentation 3 was performed in a 5 L bioreactor (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda), 3.5 L operational volume, 10 % (v/v) seed medium, 30 °C, 450 rpm, 1 vvm, pH control in 3.5 for 288 h. All fermentations started with

the same initial medium composition: g/L: glucose, 77.5; yeast extract, 2.5 and oleic acid, 75, followed by sequential additions of 20 g/L of oleic acid each 48 h until 192 h and two glucose pulses (45 g/L) at 144 h and 192 h [22]. Samples were taken during fermentation to evaluate the SL production, biomass growth and consumption of substrates.

Sophorolipid extraction and determination

At the end of fermentations, the broth was centrifugated and submitted to a liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The solvent was removed by rota-evaporation and the obtained phase washed with hexane and methanol to remove the remaining hydrophobic substances. After drying the methanol, sophorolipid was subjected to another extraction with water and ethyl acetate (3: 1) for 40 minutes at 4 ° C, repeated three times, to eliminate the residual sugars. The crude sophorolipids were rotaevaporated, lyophilized and determined by gravimetric method [9] and by HPLC (Shimadzu) with UV detector (207 nm) and C18 column (Shimadzu, 4,6 x 250 mm; 4,6 µm particle size; 12 nm pore size) using gradient elution. Initially, acetonitrile:water (30:70) was used for 5 min, increased to acetonitrile: water (80:20) for 50 min. The flow rate was 0.5 mL/min and injection volume was 20 µL [6,23]. 1',4"-Sophorolactone 6',6"-diacetate (Sigma Aldrich) was used as sophorolipid standard for comparison. This SL was used for determining the antibacterial activity.

Determination of biomass, lipid and sugar consumption

Biomass was monitored by estimation of cell dry weight [24]. Glucose and lipid residual substrates were quantified to determine the consumption by the microorganism during and at the end of fermentation. Residual glucose was quantified by the Somogyi-Nelson method [25,26] from the supernatant. Residual oleic acid was quantified by gravimetry from the hexane extraction.

Antibacterial test

Bacteria

The antibacterial activity was tested against *Clostridium perfringens* ATCC 3623 and *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Strains were preserved in Brain Heart Infusion (BHI – Oxoid®) broth containing 25 % (v/v) glycerol at - 80 °C.

Broth microdilution assay

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of SL and Lactic acid (LA) (Labsynth®) were determined in triplicate by the microdilution assay in 96-well plates [27]. Stock solutions 25% (w/v) of SL were solubilized in ethanol 100% and diluted with broth to reach the ranging concentrations from 0.007 % to 1% for *C. jejuni* and from 0.003 % to 0.2 % for *C. perfringens*. LA concentrations ranged from 5% to 0.04 % for both bacteria. *C. perfringens* and *C. jejuni* were first grown in BHI and Thioglycolate (TC) agar (Oxoid®), respectively, and incubated at 42 °C for 48 h in anaerobiosis for *C. perfringens* and in microaerophilic conditions for *C. jejuni*. Bacterial suspensions were adjusted to 1.5×10^8 CFU/mL (0.9% NaCl) using a 0.5 McFarland scale and diluted in broth to be plated at a density of 5.0×10^5 CFU/well. After 48 h incubation at 42 °C, the optical density values were determined visually. MIC was considered as the lowest concentration of SL and LA that inhibits microbial growth visually in comparison with the positive control and minimum bactericidal concentration (MBC) as the lowest concentration that inhibits microbial growth after subculturing in agar plates.

Checkerboard assay

To evaluate the antibacterial effects of SL combined with LA against *C. perfringens* and *C. jejuni*, triplicate assays of microdilution in double-antimicrobial gradient were used. The fractional inhibitory concentration index (FICI) was determined using a 96-well plate and calculated by the MIC of the compounds individually to eight serial twofold dilutions of SL and LA combined. The classification was made by the followed parameters: FICI \leq 0.5: synergistic; $0.5 < \text{FICI} \leq 1$: additive, $1 < \text{FICI} < 4$: indifferent and FICI ≥ 4 : antagonistic. The FICI (ΣFICI) was determined using the following equation [28]:

$$\Sigma\text{FICI} = \text{FIC}_{\text{SL}} + \text{FIC}_{\text{LA}}$$

$$\Sigma\text{FICI} = (\text{MIC of SL in combination}) / (\text{MIC of SL}) + (\text{MIC of LA in combination}) / (\text{MIC of LA})$$

Survival curve

The effect of SL and LA separately and in combination on the growth of *C. perfringens* was evaluated through a time-kill test [29]. The MIC of each compound and the FIC value of both antimicrobials were utilized in this growth study test. The bacteria was first incubated in BHI agar for 48 h at 37 °C and adjusted to 0.5 on the McFarland scale for inoculation at a cell density of 10^6 CFU/mL. Aliquots of 20 mL were collected at different time points (0, 12, 24, 36 and 48 h), serially diluted in saline solution, plated on nutrient agar media and grown for 48 h at 37 °C to determine the total CFU/mL.

Statistical analysis

All data presented are based on the mean values of the experiments in triplicate. The SL production data were analyzed by ANOVA and the assumptions of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity (Bartlett) of the model were evaluated. The difference among means was determined by Tukey's test ($p < 0.05$). All tests were performed with the statistical software R version 3.4.1.

Results and Discussion

Sophorolipids production

SL obtained from *C. bombicola* were analyzed through 3 different fermentations: Fermentation 1 and 2 were performed in shake flasks Erlenmeyers with operational volumes of 50 and 100 mL, respectively and Fermentation 3 was run in a bioreactor of 5 L with 3.5 L operational volume. The Kinect profiles of each fermentation are presented in Figures 2- 4. The composition medium used was the same for all production processes, combining glucose as hydrophilic carbon source and oleic acid, as lipid precursor. The highest SL production was obtained in Fermentation 1 reaching up 71.98 g/L with a productivity of 0.25 g/L.h. Fermentation 2 and 3 obtained 50.63 g/L and 69.83 g/L (Table 1), respectively. In comparison with Fermentation 1, Fermentation 3 only presented a 2.9 % variation in production and because of that was chosen to the antibacterial tests due to its superior volume. The same profile was shown in biomass growth, reaching a maximum of 21.41 g/L, 11.98 g/L and 23.49 g/L for fermentations 1, 2 and 3 at 288 h.

Basically, the difference between the fermentations were the culture volume and probably the amount of dissolved oxygen in the medium. Thus, cultures with higher medium

volumes presented lower oxygenation. Oxygen supply is one of the most important parameters during the fermentation process. The yeast cells are very sensitive to oxygen limitation and good aeration conditions are important for sophorolipid production, as the cytochrome P450 monooxygenase uses molecular oxygen [4,30]. This could explain the differences in SL production, since Fermentation 1 received higher levels of oxygenation than Fermentation 2, which resulted in an increasing in SL formation. Besides the substantial volume used in Fermentation 3, a stirring rate of 450 rpm and an aeration system of 1 vvm were provided, ensuring a good level of oxygenation and therefore, a good SL production.

The consumption of glucose and oleic acid increased progressively according to the fermentation time (Figure 2-4) and yield values were based on the conversion of the consumption substrates into product formation (sophorolipid + biomass) (Table 1).

It is known that SL production begins in late stages of microbial cell growth, which typically occurs when nitrogen in the media is almost depleted. At this moment, SL production rate increases significantly, along with the consumption of the substrates [31]. As stated previously, oxygen mass transfer is a very important kinetic and starts to decay in the last hours of fermentation because of the high viscosity of SL produced [32]. The production medium and the conditions established have influence in the SL structure formed, affecting directly the proportions of acidic and lactonic [33,34]. In our work, HPLC analysis showed that the produced SL, in comparison with the standard SL 1',4''-Sophorolactone 6',6''-diacetate (Sigma Aldrich), was composed of greater than 95% of lactonic form, which has been documented for having better lowering surface properties and antimicrobial activities than acidic structures [4,13].

Antibacterial test of SL

In vitro antibacterial tests with SL were performed for the first time against *C. perfringens* and *C. jejuni*, achieving MIC values of 0.003 % and 1 %, respectively. SL mechanism of action involves destabilization or rupture in the cellular membrane, inducing the outpouring of their cytoplasmic contents [13,35]. It is also reported that SL have better bactericidal effect for Gram-positive strains than Gram-negative, due to the differences in cell-wall structure [36]. Gram-negative bacteria have two cell membranes structures, which makes this envelope more complex to SL interact than Gram-positive strains that only possess one membrane layer.

Tests with LA investigated the bacteria sensibility to this compound individually and in combination with SL. MIC_{LA} was 0.07 % for both bacteria and the combined treatment (MIC_{SL+LA}) used $\frac{1}{2}$ MIC concentration of each, representing an additive interaction (FICI 0.93). The use of organic acids, such as lactic acid, in the poultry industry is very common. They are effective, cheap and Generally Recognized as Safe (GRAS), with approved regulation to be used in animal carcasses at concentrations upon 5 % [37]. Although, the use of organic acids may change some sensory aspects of the product (color and flavor) [37]. Therefore, the SL association with LA could be advantageous, because of the lower concentration achieved in combination, thus resulting in less impacting in sensory characteristics and toxicity for the product and consumer, with the same antimicrobial efficacy.

A time-kill curve test was also performed to evaluate the effects of SL, LA and the combination of both antimicrobials in the growth of *C. perfringens*. The results are shown in Figure 5. Hence, it is possible to observe that after 24 h, all treatments were capable of eradicating *C. perfringens* populations.

Conclusions

Our study achieved good SL production results in all fermentations, reaching a maximum SL of 71.98 g/L in Erlenmeyers flasks and in bioreactor with 69.83 g/L. The substrates employed synthesized a majority 95 % lactonic form sophorolipid, which was capable in eradicating *C. perfringens* and *C. jejuni* populations in concentrations of 0.003 % and 1 % after 24 h incubation. The combined treatment of sophorolipid with lactic acid presented an additive interaction, reducing by half the compounds concentrations, demonstrating that SL produced from *C. bombicola* could be an alternative for industrial applications as an innovative antimicrobial agent.

Acknowledgements

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

References

- [1] Makkar, R.S.; Cameotra, S.S.; Banat, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*. **2011**;1(1):5. DOI: 10.1186/2191-0855-1-5
- [2] Nitschke, M.; Pastore, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Quim Nova*. **2002**;25(5):772–6. DOI: 10.1590/S0100-40422002000500013.
- [3] Transparency Market Research. Microbial biosurfactants market (rhamnolipids, sophorolipids, mannosylerythritol lipids for household detergents, industrial & institutional cleaners, personal care, oilfield chemicals, agricultural chemicals, food processing, textile and other application. **2014**. Available from: <https://www.transparencymarketresearch.com/microbial-biosurfactants-market.html>
- [4] Van Bogaert, I.N.A.; Saerens, K.; De Muynck, C.; Develter, D.; Soetaert, W.; Vandamme, E.J. Microbial production and application of sophorolipids. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2007**;76(1):23–34. DOI: 10.1007/s00253-007-0988-7
- [5] Asmer, H.J.; Lang, S.; Wagner, F.; Wray, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J Am Oil Chem Soc*. **1988**;65(9):1460–6. DOI: 10.1007/BF02898308
- [6] Hu, Y.; Ju, L.K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enzyme Microb Technol*. **2001**;29(10):593–601. DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00439-2
- [7] Gupta, R. Biosynthesis of novel sophorolipids using *Candida bombicola* ATCC 22214: characterization and applications. **2012**. Available from: http://ncl.csircentral.net/1032/1/Thesis_Reetika_Gupta_June_2012.pdf

- [8] Morya, V.K.; Park, J.H.; Kim, T.J.; Jeon, S.; Kim, E.K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. *Bioresource Technology*, **2013**, 143, 282–288. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.094.
- [9] Minucelli, T.; Ribeiro-Viana, R.M.; Borsato, D.; Andrade, G.; Cely, M.V.T.; De 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*. **2017**;8(3):743–53. DOI: 10.1007/s12649-016-9592-3
- [10] Shah, V.; Doncel, G.F.; Seyoum, T.; Eaton, K.M.; Zalenskaya, I.; Hagver, R.; Azim, A.; Gross, R. Sophorolipids , Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**;49(10):4093–100. DOI: 10.1128/AAC.49.10.4093-4100.2005
- [11] Shao, L.; Song, X.; Ma, X.; Li, H.; Qu, Y. Bioactivities of sophorolipid with different structures against human esophageal cancer cells. *J Surg Res*. **2012**;173(2):286–91. DOI: 10.1016/j.jss.2010.09.013
- [12] Pontes, C., Alves, M., Santos, C., Ribeiro, M. H., Gonçalves, L., Bettencourt, A. F.; Ribeiro, I. A.C. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? *Int J Pharm*. **2016**;513(1–2):697–708. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.074.
- [13] Zhang, X.; Ashby, R.D.; Solaiman, D.K.Y.; Liu, Y.; Fan, X. Antimicrobial activity and inactivation mechanism of lactonic and free acid sophorolipids against *Escherichia coli* O157:H7. *Biocatal Agric Biotechnol*. **2017**;11:176–82. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.07.002
- [14] Solaiman, D.K.Y.; Ashby R.D.; Uknalis, J. Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. *J Microbiol Methods*. **2017**;136:21–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.02.012

- [15] Sen, S.; Borah, S.N.; Bora, A.; Deka, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microb Cell Fact.* **2017**;16(1):95. DOI: 10.1186/s12934-017-0711-z
- [16] Zhang, T.; Zhang, W.; Ai, D.; Zhang, R.; Lu, Q.; Luo, Q.; Shao, H. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and retail chicken meat in central China. *Anaerobe.* **2018**; DOI:10.1016/j.anaerobe.2018.08.007
- [17] Huang, L.; Li, C.; Hwang, C. International Journal of Food Microbiology Growth / no growth boundary of *Clostridium perfringens* from spores in cooked meat : A logistic analysis. *Int J Food Microbiol.* **2018**;266:257–66. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.010
- [18] WHO. The global view of campylobacteriosis. **2013**. Available from: <https://www.who.int/foodsafety/publications/campylobacteriosis/en/>
- [19] Landgraf, M.; Teresa, M. Occurrence of *Campylobacter* in raw chicken and beef from retail outlets in São Paulo. *Journal of Food Safety.* **2018**:1–6. DOI: 10.1111/jfs.12442
- [20] Skarp, C.P.A.; Hänninen, M.; Rautelin, H.I.K. *Campylobacteriosis* : the role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect.* **2016**;22(2):103–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.11.019
- [21] Gao, R.; Falkeborg, M.; Xu, X.; Guo, Z. Production of sophorolipids with enhanced volumetric productivity by means of high cell density fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2013**;97(3):1103–11. DOI: 10.1007/s00253-012-4399-z.
- [22] Felse, P.A.; Shah, V.; Chan, J.; Rao, K.J.; Gross, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme Microb Technol.* **2007**;40(2):316–23. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.04.013

- [23] Wadekar, S.; Kale, S.; Lali, A.; Bhowmick, D.; Pratap, 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. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc.* **2012**;89(6):1029–39. DOI: 10.1007/s11746-011-1986-6
- [24] Zhou, Q.; Kosaric, N. Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida bombicola*. **1995**;72(1):67–71. DOI: 10.1007/BF02635781
- [25] Nelson, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *JBiolChem.* **1944**;153:375–80.
- [26] Somogyi, M. A New Reagent for Determination of Sugars. *A new Sugar Reag.* **1945**;61–8.
- [27] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; **2012**, Approved Standard — Ninth Edition. 32.
- [28] Chin, N.; Weitzman, I. In Vitro Activity of Fluvastatin , a Cholesterol-Lowering Agent , and Synergy with Fluconazole and Itraconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. **1997**, Apr; 41(4): 850–852. PMID: PMC163809
- [29] NCCLS. M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; **1999**, Approved Guideline.
- [30] Guilmanov, V.; Ballistreri, A.; Impallomeni, G.; Gross, R.A. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Biotechnol Bioeng.* **2002**;77(5):489–94. DOI: 10.1002/bit.10177
- [31] Davila, A.M.; Rémy, M.; Vandecasteele, J.P. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola* *Applied Microbiology and Biotechnology.* **1992**;38:6–11. DOI: 10.1007/BF00169410

- [32] Dolman, B.M.; Kaisermann, C.; Martin, P.J.; Winterburn, J.B. Integrated sophorolipid production and gravity separation. *Process Biochem.* **2017**;54:162–71. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.12.021
- [33] Van Bogaert, I.N.A.; Zhang, J.; Soetaert, W. Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochem.* **2011**;46(4):821–33. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.01.010
- [34] Ribeiro, I.A.C.; Faustino, C.M.C.; Guerreiro, P.S.; Frade, R.F.M.; Bronze, M.R.; Castro, M.F.; Ribeiro, M.H.L. Development of novel sophorolipids with improved cytotoxic activity toward MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Mol Recognit* **2015**;28(3):155–65. DOI: 10.1002/jmr.2403
- [35] Valotteau, C.; Banat, I.M.; Mitchell, C.A.; Lydon, H.; Marchant, R.; Babonneau, F.; Pradier, C.M.; Baccile, N.; Humblot, V. Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* **2017**;157:325–34. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.072
- [36] Dengle-Pulate, V.; Chandorkar, P.; Bhagwat, S.; Prabhune, A.A. Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol. *J Surfactants Deterg.* **2014**;17(3):543–52. DOI: 10.1007/s11743-013-1495-8.
- [37] Mani-López, E.; García, H.S.; López-Malo, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Res Int.* **2012**;45(2):713–21. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.04.043.

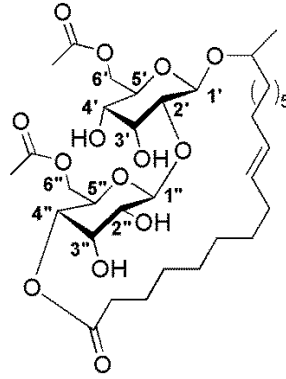


Figure 1a. Lactonic sophorolipid structures

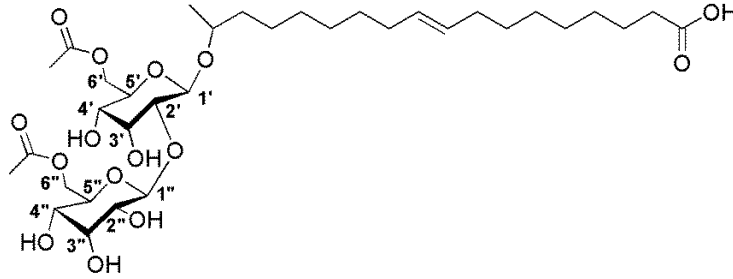


Figure 1b. Acidic sophorolipid structures

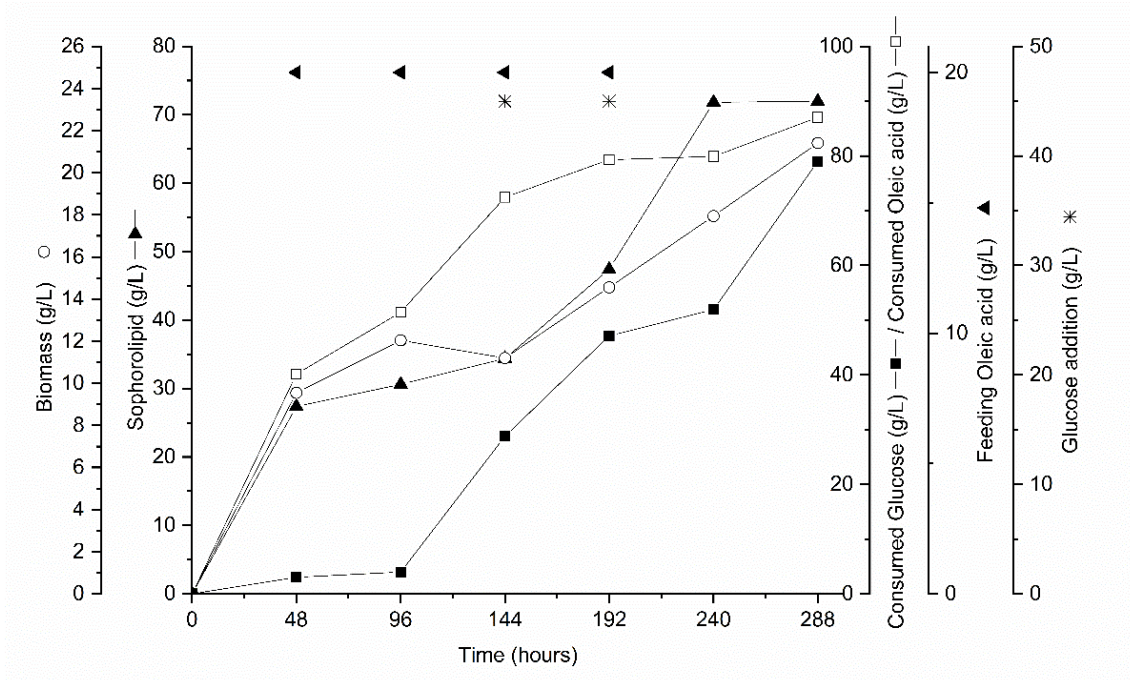


Figure 2. Consume of glucose and oleic acid, biomass and sophorolipid production by *C. bombicola* in Fermentation 1 (50 mL), 30 °C, 150 rpm for 288 h.

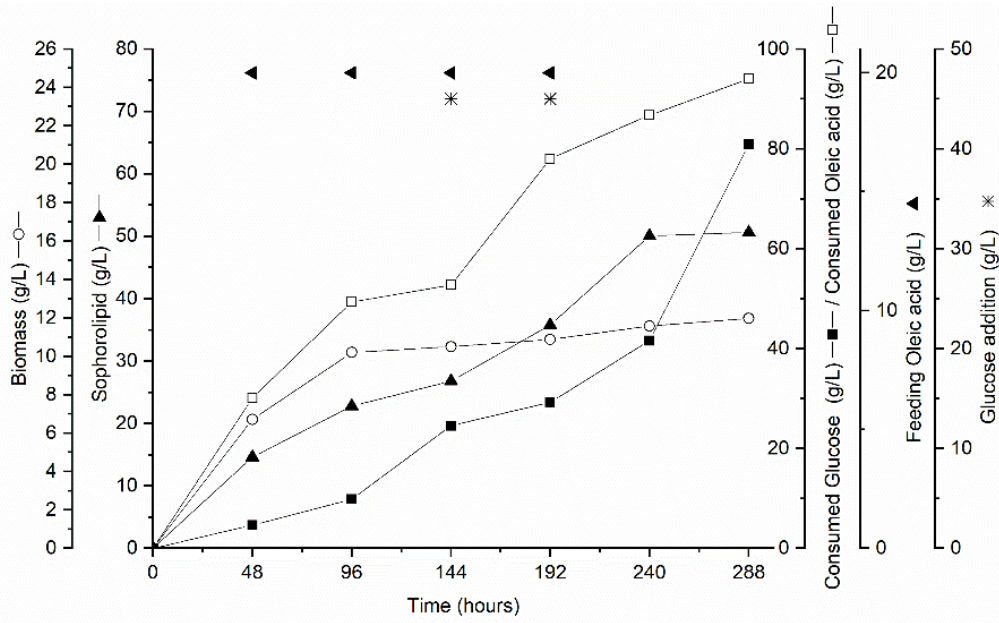


Figure 3. Consume of glucose and oleic acid, biomass and sophorolipid production by *C. bombicola* in Fermentation 2 (100 mL), 30 °C, 150 rpm for 288 h.

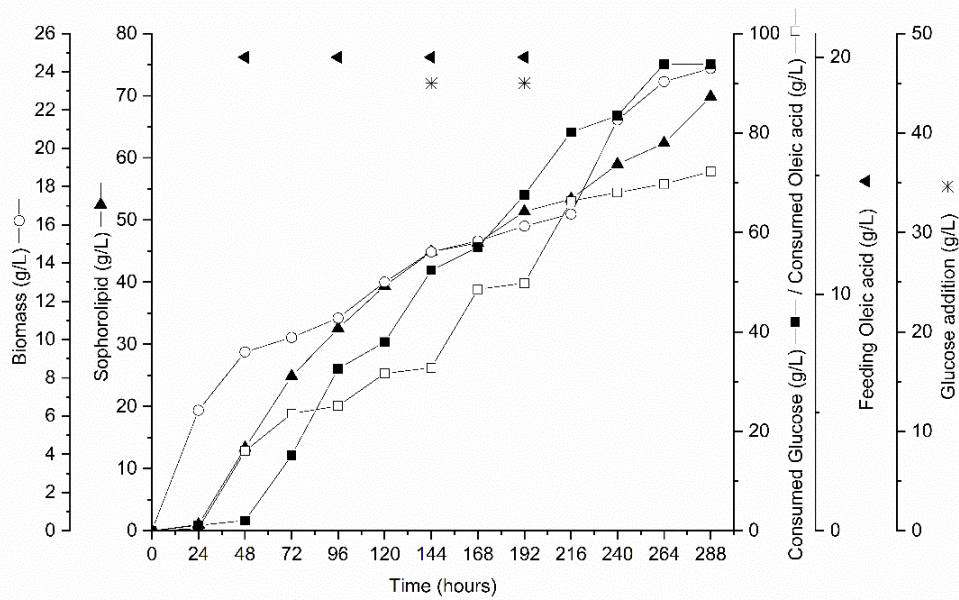


Figure 4. Consume of glucose and oleic acid, biomass and sophorolipid production by *C. bombicola* in Fermentation 3 (bioreactor), 30 °C, 450 rpm, 1 vvm, for 288 h.

Table 1. Production, productivity and yield of sophorolipids by *Candida bombicola* in Fermentations 1 (50 mL), 2 (100 mL) and 3 (bioreactor) for 288 h

Fermentation	Production (g/L)	Productivity (g/L.h)	SL _{p/s} Yield* (g/g)
1	71.98 (\pm 0.352) ^a	0.25 (\pm 0.01) ^a	0.62 (\pm 0.02) ^a
2	50.63 (\pm 1.365) ^c	0.18 (\pm 0.04) ^c	0.36 (\pm 0.07) ^c
3	69.83 (\pm 0.418) ^b	0.24 (\pm 0.01) ^b	0.56 (\pm 0.02) ^b

Mean in triplicate \pm standard deviation. Means followed by equal letters in columns did not differ by Tukey's test, ($p \leq 0.05$).

*Yields (g/g) were calculated based on the total amount of consumed substrate and product was considered as SL production and biomass.

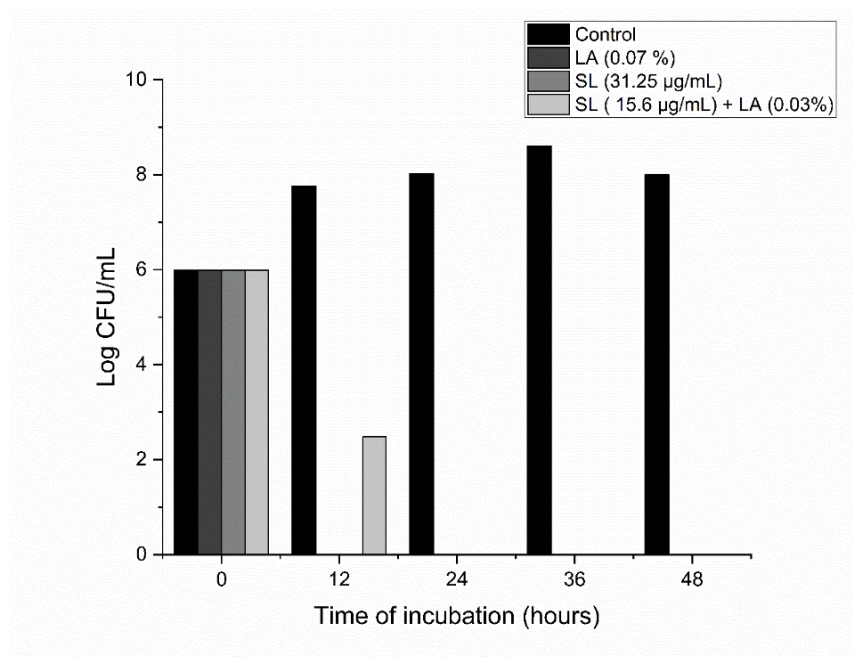


Figure 5. Time-kill assay of *Clostridium perfringens* in treatment absence (Control), lactic acid (LA), sophorolipid (SL) and combination of both (SL + LA).

ANEXO B

Antibacterial properties of sophorolipids and lactic acid against pathogens

Victória Akemi Itakura Silveira¹, Erick Kenji Nishio², Christiane Aparecida Urzedo Queiroz Freitas¹, Ismael R. Amador¹, Renata Katsuko Takayama Kobayashi², Mário Sérgio Mantovani³, Admilton Gonçalves de Oliveira Junior², Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}

¹ Department of Biochemistry and Biotechnology, Center of Exact Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, CP 6001

² Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, CP 6001

³ Department of General Biology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, CP 6001

***Corresponding author:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Department of Biochemistry and Biotechnology, Center of Exact Sciences, State University of Londrina, CEP 86.057-970, Londrina, PR, Brazil, Phone: +55 (43) 3371-4270, Fax: +55 (43) 3371-4054, e-mail: macelligoi@uel.br

Abstract

Food from animal source, especially poultry products, are the main responsible for the spread of microorganisms that cause food poisoning. Considering the importance of finding alternatives for the control of these pathogens in the food industry, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial potential of the produced sophorolipids and/ or lactic acid against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* Sophorolipids were capable of eradicating *S. aureus* and *L. monocytogenes* at MIC values of 31.25 µg/mL and 62.5 µg/mL, respectively. Lactic acid inhibited completely the growth of all bacteria at concentrations from 0.15 % to 0.6 %. A combined affect with lactic acid presented an additive interaction for *L. monocytogenes* and *S. aureus*, reducing the MIC of each compound by half, at least. The time-kill test presented the progressive log-reduction over 24 h and showed complete inhibition of *S. aureus* populations at 10 h, 12 h and 24 h with sophorolipid, lactic acid and combination, respectively. For *L. monocytogenes*, eradication was achieved at 12h with sophorolipid, 10 h with lactic acid and 12 h with combination. The cytotoxicity assay showed that concentrations \geq 62.5 µg/mL were cytotoxicity for the HepG2 cells, therefore the combinatory treatment between sophorolipids and lactic acid represented a potential use of the compounds as a sanitizer in the poultry industry with antimicrobial efficacy and no cytotoxicity effects at the concentrations used.

Keywords: Biosurfactant, Antimicrobial agent, cytotoxicity, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*

Declarations of interest: none

1. Introduction

Chicken meat is an important food commodity and production is forecast to reach up to 134.5 million tons until 2026, ensuring leadership among all types of meat production (Ahmed; Hiremath; Jacob, 2016a). The sector is controlled by the top producers United States, Brazil and China (FAO, 2016), in which besides the huge number of profit, they have to deal with significant economic losses due to contamination. Food from animal source, especially poultry products, are the main responsible for the spread of microorganisms that cause food poisoning (Endersen et al., 2014; Mahami et al., 2019; Rouger; Tresse; Zagorec, 2017). Chicken meat is mainly infected by pathogens like *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, *Campylobacter* and *Salmonella* species (Ahmed; Hiremath; Jacob, 2016a; James; Prucha; Brewer, 1993; Silva, 1988). Spoilage microorganisms may also be present, thus lowering the shelf-life and impacting negatively on the profits.

Outbreaks of foodborne diseases are a public health issue, offering real hazard to the consumers health. The cases have increased over the recent decades, generating 600 million diseases and 420,000 deaths worldwide in 2010 (WHO, 2015). *Salmonella enterica.*, *Campylobacter spp.*, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* are the major pathogens involved in the history of foodborne outbreaks (Zhang et al., 2017). The principal factors associated are the management and consumption of raw or undercooked chicken or other meats, raw milk and contaminated water (Ahmed et al., 2018). Therefore, it is important to find alternatives for the control of these pathogens in the food industry.

Numerous approaches on reducing or inactivating these microorganisms have been attempted, but usually involves chemical treatments. However, consumers concern about the use of synthetic compounds led to an increasing demand for novel environmentally friendly antimicrobials (Zhang et al., 2016b). Hence, the use of natural and bio-based active molecules such as biosurfactants, are becoming more attractive and of great interest. Biosurfactants are amphiphilic compounds and possess a lot of advantages over the chemical surfactants, such as specific action, good performance at extreme conditions, low toxicity and biodegradability (Diaz de Rienzo et al., 2015).

Sophorolipids (SL) is one of the most promising biosurfactants and has gained attention due to its biodegradability, high productivity and a vast potential applications. SL are extracellular glycolipids mainly produced by the yeast *Candida bombicola* and it is composed of a sophorose hydrophilic moiety linked to a fatty acid chain. This biosurfactant is produced as a mixture of lactonic and acid forms (Figure 1) and also may differ on the unsaturation degree, chain length and hydroxylation position of the fatty acid, depending on the fermentation conditions and utilized substrates (Ribeiro et al., 2015). These structural differences in SL can result in changes in the physical-chemical and biological properties, which could impact their antimicrobial activity (Van Bogaert; Zhang; Soetart, 2011). Currently, because of the increasing environmental concern, SL have been extensively studied and documented about its potential replacement of conventional drugs, in special against Gram-positive bacteria (Dengle-Pulate, Chandorkar, Bhagwat, & Prabhune, 2014; Diaz De Rienzo et al., 2015; Solaiman, Ashby, & Uknalis, 2017; Zhang, Ashby, Solaiman, Uknalis, & Fan, 2016).

Application of organic acids on meat surfaces is a common procedure, as they are cheap and effective. Lactic acid (LA) is a monocarboxylic acid found naturally in various fruits and fermented products. It is “generally recognized as safe” (GRAS) and FDA approved as an antimicrobial for application to animal carcasses (< 5 % acid solution) (Mani-López; García; López-Malo, 2012). There are many reports on its antimicrobial activities against foodborne pathogens including *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* (De Oliveira et al., 2010; Dubal et al., 2004; Kang; Song, 2018; Stanojevic-Nikolic et al., 2016).

Although, the use of SL against foodborne pathogenic bacteria have been quantified, the application of SL directed to chicken meat pathogens have never been assessed. Similarly, limited data exist on the combined effects of SLs and lactic acid, which is one of the most common organic acids employed in the poultry industry. Therefore, the aim of this study was to investigate the antimicrobial potential of sophorolipids and lactic acid against the principal poultry pathogens isolated from chicken meat: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* and *E. coli* in vitro.

2. Material and methods

2.1 Bacteria and culture medium

Staphylococcus aureus, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* and *Escherichia coli* wild-types isolates from chicken meat of a local poultry industry. Stock cultures were stored in Brain Heart Infusion (BHI – Oxoid®) broth containing 25 % glycerol at - 80 °C.

2.2 Sophorolipids Production

SL were produced by the yeast *Candida bombicola* ATCC 22214 (*Starmerella bombicola*) in a 5 L bioreactor (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda) containing 3.5 L fermentation medium (g/L): 77.5 glucose, 2.5 yeast extract and 75 oleic acid, followed by pulses of 20 g/L oleic acid every 48h until 192h. Fermentation conditions were inoculum 10 % (v/v), 288 h, 30 °C, 450 rpm, 1 vvm and pH control in 3.5. At the end, the broth was centrifugated and the supernatant submitted to a liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The ethyl acetate was removed by rota-evaporation and the obtained phase washed with hexane and methanol to remove the remaining hydrophobic substances. The crude sophorolipids were collected from the methanol phase, followed by rota-evaporation and lyophilization (Minucelli et al., 2017). SL was determined by HPLC (Shimadzu) with UV detector (207 nm) and C18 column (Shimadzu, 4,6 x 250mm; 4,6 µm particle size; 12 nm pore size) using gradient elution. Initially, acetonitrile: water (30:70) was used for 5 min, increased to acetonitrile: water (80:20) for 50 min. The flow rate was 0.5 mL/min and injection volume was 20 µL (Hu; Ju, 2001; Wadekar et al., 2012). In comparison with the SL pattern 1,4"-sophorolactona 6', 6"-diacetate (Sigma Aldrich), HPLC analysis showed that approximately 95% of the product was lactonic. This produced SL was used for determining the antibacterial activity.

2.3 Antibacterial activity

2.3.1 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

SL produced and LA (Labsynth®) were tested against all four wild-type isolates in triplicate by the microdilution assay in 96-well plates (CLSI, 2012). Briefly, stock solutions 25% (w/v) of SL were prepared in ethanol 100% and diluted in media to final concentrations ranging from 15.6 to 2,000 µg/mL for Gram-positive and from 78.1 to 10,000 µg/mL for Gram-negative. LA concentrations ranged from 0.04% to 5% for all bacteria. Strains were first grown in Mueller-Hinton (MH) agar (Oxoid®) and incubated at 37 °C for 24 h. Isolated colonies for each bacterial strain was suspended in sterile saline and adjusted to 0.5 on the McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL). These suspensions were diluted in MH broth (Oxoid®) and plated in 96-well plates at a density of 5.0×10^5 CFU/well with different concentrations of SL or LA. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and 10 µL of each well were plated on nutrient agar to quantify the CFU/mL. The antibacterial effect was expressed as MIC, the lowest concentration of SL and LA that inhibited microbial growth in comparison with the positive control after plating.

2.3.2 Determination of combined effect of sophorolipid and lactic acid

The fractional inhibitory concentration (FIC) of SL and LA were also investigated using the checkerboard assay for all four bacteria (Chin; Weitzman, 1997). The FIC index (FICI) was calculated by the MIC of the antimicrobial compounds individual and combined. The classification of the antimicrobial interaction was based on these parameters: when the FICI is ≤ 0.5 the interaction is synergistic, when the FICI is >0.5 and ≤ 1 the interaction is additive, when the FICI is >1 and <4 the interaction is indifferent and $FICI \geq 4$ defines the antagonistic interaction. The checkerboard test was elaborated using a 96-well microtiter plate with antimicrobial concentrations ranged from the MIC value to eight serial twofold dilutions of the sophorolipid and lactic acid. The FICI ($\sum FICI$) was determined using the following equation:

$$\Sigma FICI = FIC_{SL} + FIC_{LA}$$

$$\Sigma FICI = (MIC \text{ of SL in combination}) / (MIC \text{ of SL}) + (MIC \text{ of LA in combination}) / (MIC \text{ of LA})$$

2.3.3 Time-kill assay

The effect of SL and LA individually and in combination on the growth of *S. aureus* and *L. monocytogenes* wild-type isolates was evaluated through a time-kill test (NCCLS, 1999). First, each strain was incubated in MH agar for 24 h at 37 °C. Then, each culture was adjusted to 0.5 on the McFarland scale and inoculated at a cell density of 10⁶ CFU/mL. The MIC of each compound was utilized when they were tested individually. In the case of combination, it was used ½ MIC of SL + ½ MIC LA. Aliquots of 10 µL were collected at different time points (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h), serially diluted in saline solution, plated on nutrient agar media and grown for 24 h at 37 °C to determine the total CFU/mL.

2.4 Cytotoxicity test

The cell viability was determined by resazurin (7-hydroxy-10-oxide-phenoxazin-10-ium-3-one) cytotoxicity test in a 96-well plate (Aquino et al., 2013; Coatti et al., 2015; Mcmillian et al., 2002). The human hepatoma cell line HepG2/C3A used in our study was obtained from the Cell Bank of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) and were cultivated in flasks containing DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), at 37°C, 5% CO₂, and 95% relative humidity. Each treatment was repeated three times and each well was seed with 2 x 10⁴ cells.

After 24 h incubation, medium was removed and replaced by fresh medium with different concentrations of SL (2,500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 µg/mL). DMSO was used as solubilizing solvent at a final concentration of 0.2 % and tested as vehicle control solution. After 24 h treatment, the supernatant was discarded, cells were washed with phosphate-buffered saline and resazurin was added at a final concentration of 60 µM per well. The cells were incubated at 37 °C for 3 h and the fluorescence was read with VICTOR 3 (Perkin Elmer) at 530-560 nm of excitation and a 580-600-nm emission range.

The 50 % inhibitory concentration (IC₅₀) value of SL was estimated using Software R (R CORE TEAM, 2016) and the R package nplr (n. parameter logistic regression) (Commo; Bot, 2016).

2.5 Scanning electron microscopy (SEM) of *S. aureus* and *L. monocytogenes*

SEM was used to observe the cell morphology after treatment with SL, LA and SL + LA. Colonies from *S. aureus* and *L. monocytogenes* were grown in MH agar (24h, 37 °C), transferred to MH broth and adjusted to a cell density of 10⁸ CFU/mL. Then, 500 µL aliquots of the bacteria inoculum were mixed with 500 µL of MH medium (Control), SL, LA and SL + LA. The treatment concentrations were chosen based on the previous results of MIC and FIC tests.

The mixtures were incubated at 37 °C for 5 h. After incubation, the cultures were centrifuged at 4500 rpm for 15 min with phosphate buffer saline. The pellet was resuspended and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer solution (pH 7.2). After, 20 µL of each culture was transferred to slide cover glasses previously coated with poly-L-lysine (Sigma -Aldrich).

Each slide was fixed with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer solution (pH 7.2) for 20 h, followed by post-fixation in 1 % OsO₄ for 30 minutes. The fixed samples were dehydrated in an ethanol gradient (30, 50, 70, 90 and 100 %) and then were critical point dried in CO₂ (BALTED CPD 030 Critical Point Dryer). The slides were coated with gold (BALTED SDC 050 Sputter Coater) and observed under a FEI Quanta 200 scanning electron microscope (Zhang et al., 2016b).

3. Results and discussion

3.1 Sophorolipid antimicrobial activity

SL was capable of eradicating *S. aureus* and *L. monocytogenes* (Table 1). Nevertheless, reduction on *E. coli* and *Salmonella* populations were not observed under the tested concentrations (MIC ≤ 10,000 µg/mL). The antimicrobial activity of SL has been described for a broad range of bacteria and although some results has been shown for Gram-negative, in most cases, SL has demonstrated better action for Gram-positive strains. Our results are in accordance with the literature (Pontes et al.,

2016; Hoa et al., 2017) and demonstrated that Gram-positive *L. monocytogenes* and *S. aureus* were more sensitive to SL than Gram-negative *Salmonella spp.* and *E. coli*.

The antimicrobial activity of biosurfactants is related to their amphiphilic nature, the also called “surfactant effect”, which involves synergistic interactions between the sugar and the lipid moieties. Biological activities of carbohydrate-based molecules are of great interest because of their mild cytotoxicity, biodegradability and high yields, making them very attractive for production (Valotteau et al., 2017). It is hypothesized that the mechanism of action of SL may be involved to membrane cells damage, which could explain the difference in antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, since they have differences in cell wall structure. In Gram-positive, the cell wall is made of one membrane layer (cytoplasmic membrane), surrounded by a thick peptidoglycan layer. While in the Gram-negative microorganisms it is composed of a thin peptidoglycan layer and two membranes, making the cell envelope of Gram-negative bacteria more complex to SL interact than the Gram-positive organisms (Dengle-Pulate et al., 2014; Zhang et al., 2016a).

Pontes et al. (2016) described the use of lactonic SL to disrupt biofilms in catheter tubes and MIC values for *S. aureus* were found to be 50 µg/mL to eradicate the cells in the planktonic form and 0.38 mg/mL to inhibit the biofilm formation. On the other hand, growth inhibition of *E. coli* was also not observed, as equal in our study. These authors revealed that *E. coli* showed less hydrophobicity behavior and higher negative charged surface than *S. aureus*. Therefore, because of these characteristics of Gram-negative bacteria, this microorganism might not be so affected by the surface change promoted by SL. Moreover, at neutral pH, some SL can be ionized presenting a negative charge and then repelling negatively charged bacteria, like Gram-negative.

Another main point in antimicrobial activity of SL is the predominance of acid and lactonic forms. It has been reported that lactonic forms have better surface tension lowering properties and antimicrobial activity as compared to the acidic form, thus an increasing in lactonic proportions may enhance the antibacterial action of SL (Van Bogaert et al., 2007). In our work, we tested a 95 % lactonic SL.

Earlier studies on inactivation of *S. aureus* by SL has been described with a very variable MIC. Data with higher concentrations than the found in our paper has been reported (Dengle-Pulate; Bhagwat; Prabhune, 2012; Diaz de Rienzo et al.,

2015; Hoa et al., 2017; Joshi-Navare; Prabhune, 2013; Sleiman et al., 2009). Zhang, Ashby, Solaiman, Uknalis, & Fan (2016) and Olanya et al. (2018) described the use of SL for inhibiting *Listeria spp.* and *L. monocytogenes* in treatments using 0.1 % and 0.12 % . In this paper, we achieved the inhibitory concentration of 62 µg/ml (0.006 %) for *L. monocytogenes*.

3.2 Combined effect of sophorolipids and lactic acid

The antibacterial activity of LA individual and in combination with SL was evaluated. MIC values for the individual LA were 0.3 % for *S. aureus*, 0.6 % for *L. monocytogenes* and *Salmonella* and 0.15 % for *E. coli*. Because of the non-inhibitory activity of SL against the Gram-negative strains, a combined affect with the biosurfactant was not possible to determine for *Salmonella* and *E. coli*. Although, the combination resulted in an additive interaction between SL and LA for *S. aureus* and *L. monocytogenes*. A growth curve study of 24 h was also performed to show the effect of SL, LA and their combination against Gram-positive bacteria (Figure 2 and 3).

For *S. aureus*, we observed a 0.26 log-reduction in the first 2h with SL concentration of 31.25 µg/mL. The inhibition increased progressively in next hours, reaching 1.84 log-reduction in 4 h and complete inhibition at 10 h with the same treatment. The *S. aureus* behavior in the presence of 0.31 % lactic acid was similar to the SL treatment in the first 2h, but a little less efficient in reducing populations on the other time points, achieving complete inhibition only at 12 h. In the combination assay we had the best inhibition in the first 2 h with 0.44 log-reduction, although a slower antibacterial activity was shown in the next hours, inactivating *S. aureus* only after 24 h of incubation. Thus, the treatment with SL individually showed to be the most efficient.

L. monocytogenes showed 1.39 log-reduction at 4 h and complete inhibition at 12 h with 62.5 µg/mL SL. In comparison, Olanya et al. (2018) reported 3.86 log-reduction of *L. monocytogenes* only after 24 h with 200 µg/mL SL, much higher concentration than the used in our work. LA showed to be efficient with 0.62 % at 10 h. Although, the best treatment found was the combination, because it only used ½

MIC values of each compound and kept the 100 % inhibitory growth at 12 h, the same time with SL individual.

The application of organic acid, such as acetic and lactic acid, as antimicrobial agent is very common and diverse studies have employed their use in meat products to inhibit *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* (De Oliveira et al., 2010; Dubal et al., 2004; Mani-López; García; López-Malo, 2012; Ricke, 2003). In our work, lactic acid individual was capable of inactivating all the strains tested and the combination with sophorolipids resulted in an additive interaction for *S. aureus* and *L. monocytogenes*. Only a study performed by Diaz De Rienzo et al., (2015) has evaluated the combinatory effects of SL with citric, lactic and caprylic acids, but no shown effects on growth of the selected microorganisms were observed when the organic acids (0.8 %) was applied individually. However, when caprylic acid (0.8% v/v) was combined with sophorolipids (1% v/v), growth inhibition of *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* NCTC 10418, *B. subtilis* NCTC 10400 and *S. aureus* ATCC 9144 were achieved, suggesting a synergistic interaction.

Earlier studies reported 2.0 log reduction of *E. coli* O157:H7 and a 1.5 log reduction of *S. Typhimurium* employing 2 % and 4 % lactic acid, respectively (Harris et al., 2006). Another paper compared organic acid treatments and pointed that lactic acid was the most effective on reducing *L. monocytogenes* population (Kang; Song, 2018). In comparison with acetic acid, LA also proved to be more effective against *S. aureus* (De Oliveira et al., 2010). It is explained by the fact that lactic acid possess a quite low molecular mass (90.08 Da) compared to other organic acids and thus, can penetrate cell membranes more easily (Stanojevic-Nikolic et al., 2016).

This paper reported total inhibition of all strains tested when lactic acid treatments were employed after one day storage and 0.8 log-reduction for *L. monocytogenes* and 2.19 log-reduction for *S. aureus* with concentrations of 0.3 % and 0.6 %, respectively, in 6 hours. The principle of action of organic acids involves cytoplasmic acidification with subsequent uncoupling of energy production and regulation, and by its dissociation in anions and protons, which causes stress for the bacteria to maintain a neutral pH, required for its functionality. Therefore, to export the excess protons, adenosine triphosphate (ATP) is consumed and may result in depletion of cellular energy (Ricke, 2003; Mani-López, García, & López-Malo, 2012).

Other synergistic interactions with SL have been described, such as conventional antibiotics tetracycline and cefaclor, ethanol and rhamnolipids (Joshi-Navare & Prabhune, 2013; Zhang, Ashby, Solaiman, Liu, & Fan, 2017; Zhang et al., 2016; Diaz De Rienzo, Stevenson, Marchant, & Banat, 2016). Testing SL interactions are of great relevance, since they have the ability of forming micelles or self-assemblies structures, which can enclose substances and deliver the drug into the cell interior, enhancing its antimicrobial effectiveness (Dubey; Selvaraj; Prabhune, 2013; Joshi-Navare; Prabhune, 2013).

3.3 Effect of sophorolipid and lactic acid in the morphology of S. aureus and L. monocytogenes cells.

SEM images showed that both control presented cells with intact surface structure and uniformed size. After 5 h of incubation with SL, LA and the combination of both, we observed a large reduction of the bacterial population in comparison with control (Figure 4).

All treatments presented cell with lumps and protuberances on their surface, being an indicative of SL or LA attachments on the bacterial surface or results of bacterial response to the antimicrobials. The present study demonstrated changes (attachments or extrusions) on the surface of *S. aureus* and *L. monocytogenes* cells due to the contact of the antimicrobials, causing membrane damage to the cells.

It is hypothesized that SL caused morphologic alterations, but mainly we observed residual attachments on the cells surface. In LA treatments, we observed more structure cell deformation, while in the combined treatment of SL and LA, it was possible to see both antimicrobial actions.

3.4 Cytotoxicity test

Based on the results of duplicate resazurin tests, it was possible to observe a dose-dependent reduction of cell survival. After 24 h of treatment, the tested concentrations above 62.5 $\mu\text{g/mL}$ were cytotoxic for HepG2 cells and the calculated IC_{50} was 58.97 $\mu\text{g/mL}$. The inhibitory SL concentrations individually achieved in our paper were 31.25 and 62.5 $\mu\text{g/mL}$ for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively.

Therefore, the use of SL in combination with LA were crucial to obtain a non-cytotoxic concentration, since it was possible to reduce the MIC values by half, at least. For both bacteria, the combined concentration of SL was 15.6 $\mu\text{g/mL}$, which proved to be by this assay, to have a mild cytotoxicity, making the application of SL viable.

4. Conclusions

The increased concern about the risk of resistant bacteria combined with the demand for natural and safety additives stimulates the search for the new bio-preservatives to control food pathogens. The antimicrobial activity here shown, associated with biodegradability and low toxicity of sophorolipids, demonstrated its great bactericidal activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes* with potential application in poultry industry. The combinatory effect between SL and LA presented an additive interaction with very satisfactory results for the Gram-positive strains. Also, the combination decreased the concentrations used by half, which has a significant impact in practical applications due to the cytotoxicity value here found. Therefore, this paper addresses the possibility to develop a green new and nontoxic sanitizer with huge applicability in the poultry industry.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

References

- Ahmed, J., Hiremath, N., & Jacob, H. (2016). Antimicrobial, Rheological, and Thermal Properties of Plasticized Polylactide Films Incorporated with Essential Oils to Inhibit *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Food Science*, 81(2), 419–429.
- Aquino, I., Tsuboy, M. S. F., Marcarini, J. C., Mantovani, M. S., & Perazzo, F. F. (2013). Genotoxic evaluation of the antimalarial drugs artemisinin and artesunate in human HepG2 cells and effects on CASP3 and SOD1 gene expressions. *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 2517–2527.
- Asmer, H. J., Lang, S., Wagner, F., & Wray, V. (1988). Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(9), 1460–1466.
- Ahmed, J.; Mulla, M.; Arfat, Y. A.; Bher, A.; Jacob, H.; Auras, R. (2018). Compression molded LLDPE films loaded with bimetallic (Ag-Cu) nanoparticles and cinnamon essential oil for chicken meat packaging applications. *LWT – Food Science and Technology*. doi: 10.1016/j.lwt.2018.03.051, 2018.
- Coatti, G. C., Marcarini, J. C., Sartori, D., Fidelis, Q. C., Ferreira, D. T., & Mantovani, M. S. (2015). Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action (via gene expression analysis) of the indole alkaloid aspidospermine (antiparasitic) extracted from *Aspidosperma polyneuron* in HepG2 cells. *Cytotechnology*, 68(4), 1161–1170.
- Chin, N., & Weitzman, I. (1997). In Vitro Activity of Fluvastatin , a Cholesterol Lowering Agent and Synergy with Fluconazole and Itraconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 850-852.

- CLSI. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.91790>
- Commo, F.; Bot, B. M. (2016). R package nplr n-parameter logistic regressions, 1–11.
- De Oliveira, C. E. V., Stamford, T. L. M., Neto, N. J. G., & de Souza, E. L. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2–3), 312–316.
- Dengle-Pulate, V., Chandorkar, P., Bhagwat, S., & Prabhune, A. A. (2014). Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(3), 543–552.
- Dengle Pulate, V., Bhagwat, S., & Prabhune, A. (2012). Microbial Oxidation of Medium Chain Fatty Alcohol in the Synthesis of Sophorolipids by *Candida bombicola* and its Physicochemical Characterization. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1–9.
- Diaz De Rienzo, M. A., Stevenson, P. S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2015). Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram positive and negative bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 44, 1–22.
- Diaz De Rienzo, M. A., Stevenson, P. S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(13), 5773–5779.
- Dubal, Z. B., Paturkar, A. M., Waskar, V. S., Zende, R. J., Latha, C., Rawool, D. B., & Kadam, M. M. (2004). Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. *Meat Science*, 66(4), 817–821.

- Dubey, P., Selvaraj, K., & Prabhune, A. (2013). Sophorolipids : in self assembly and nanomaterial synthesis. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2 (3), 1107-1133.
- Endersen, I.; Mahony, J. O.; HILLI, C.; ROSS, R. P.; MCAULIFE, O.; COFFEY, A. (2014). Phage Therapy in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 327–49.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). Livestock Primary. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>
- Harris, K., Miller, M. F., Loneragan, G. H., & Brashears, M. M. (2006). Validation of the use of organic acids and acidified sodium chlorite to reduce *Escherichia coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in beef trim and ground beef in a simulated processing environment. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1802–1807.
- Hoa, N. L. H., Loan, L. Q., Eun-Ki, K., Ha, T. T., Duy, N. D., Khanh, H. Q., ... Quoc, H. (2017). Production and characterization of sophorolipids produced by *Candida bombicola* using sugarcane molasses and coconut oil. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 22(2), 66–75.
- Hu, Y., & Ju, L. K. (2001). Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(10), 593–601.
- James, W.O., Prucha, J. C., & Brewer, R. L. (1993). Cost-Effective techniques to control human enteropathogens on fresh poultry. *Poultry Science*, 72(1174–1176).
- Joshi-Navare, K., & Prabhune, A. (2013). A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. *BioMed Research International*, 1-8.

- Kang, J. H., & Song, K. Bin. (2018). Combined effect of a positively charged cinnamon leaf oil emulsion and organic acid on the inactivation of *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh-cut Treviso leaves. *Food Microbiology*, 76, 146–153.
- Mahami, T.; Togby-Tetteh, W.; Kottoh, D. I.; Amoakoah-Twum, L.; Gasu, E.; Nana, S.; Annan, Y.; Larbi, D.; Adjei, I.; Adu-Gyamfi, A. (2019). Microbial Food Safety Risk to Humans Associated with Poultry Feed : The Role of Irradiation. *International Journal of Food Science*. doi: 10.1155/2019/6915736, 2019.
- Mani-López, E., García, H. S., & López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713–721.
- McMillian, M. K., Li, L., Parker, J. B., Patel, L., Zhong, Z., Gunnett, J. W., ... Johnson, M. D. (2002). *Cell Biology and Toxicology*, 18(3), 157–173.
- Minucelli, T., Ribeiro-Viana, R. M., Borsato, D., Andrade, G., Cely, M. V. T., de Oliveira, M. R., ... Celligoi, M. A. P. C. (2017). Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. *Waste and Biomass Valorization*, 8(3), 743–753.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1999). M26-A: Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline. M26-1, v. 19, n. 18, Wayne, PA, USA: CLSI.
- Olanya, O. M., Ukuku, D. O., Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Niemira, B. A., & Mukhopadhyay, S. (2018). Reduction in *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on tomato by sophorolipid and sanitiser as affected by temperature and storage time. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(5), 1303–1315.

- Pontes, C., Alves, M., Santos, C., Ribeiro, M. H., Gonçalves, L., Bettencourt, A. F., & Ribeiro, I. A. C. (2016). Can sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1–2), 697–708.
- Ribeiro, I. A. C., Faustino, C. M. C., Guerreiro, P. S., Frade, R. F. M., Bronze, M. R., Castro, M. F., & Ribeiro, M. H. L. (2015). Development of novel sophorolipids with improved cytotoxic activity toward MDA-MB-231 breast cancer cells. *Journal of Molecular Recognition*, 28(3), 155–165.
- Ricke, S. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82(4), 632–639.
- Rouger, A.; Tresse, O.; Zagorec, M. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species and Dynamics. (2017). *Microorganisms*, 5, 50.
- Silva, J. A. (1988). Microrganismos patogênicos em carne de frangos. *Higiene Alimentar*, 12(58), 9–14.
- Sleiman, J. N., Kohlhoff, S. A., Roblin, P. M., Wallner, S., Gross, R., Hammerschlag, M. R., Zenilman ME, Bluth, M. H. (2009). Sophorolipids as antibacterial agents. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 39(1), 60–63.
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., & Uknalis, J. (2017). Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. *Journal of Microbiological Methods*, 136, 21–29.
- Stanojević-Nikolić, S., Dimić, G., Mojović, L., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., & KocićTanackov, S. (2016). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(5), 990–998.
- Valotteau, C., Banat, I. M., Mitchell, C. A., Lydon, H., Marchant, R., Babonneau, F., ... Humblot, V. (2017). Antibacterial properties of sophorolipid-modified gold

- surfaces against Gram positive and Gram negative pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, 325–334.
- Van Bogaert, I. N. A., Saerens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 23–34.
- Van Bogaert, I. N. A., Zhang, J., & Soetaert, W. (2011). Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochemistry*, 46(4), 821–833.
- Wadekar, S., Kale, S., Lali, A., Bhowmick, D., & Pratap, A. (2012). Sophorolipid production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 1029–1039.
- WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Retrieved from http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/
- Zhang, X., Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y., Liu, Y., & Fan, X. (2017). Antimicrobial activity and inactivation mechanism of lactonic and free acid sophorolipids against *Escherichia coli* O157:H7. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 176–182.
- Zhang, X., Ashby, R., Solaiman, D. K. Y., Uknalis, J., & Fan, X. (2016). Inactivation of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. by palmitic, stearic, and oleic acid sophorolipids and thiamine dilauryl sulfate. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1– 11.
- Zhang, X., Fan, X., Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Liu, Z., Mukhopadhyay, S., & Yan, R. (2016). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on the surface of spinach leaves by biobased antimicrobial surfactants. *Food Control*, 60, 158–165.

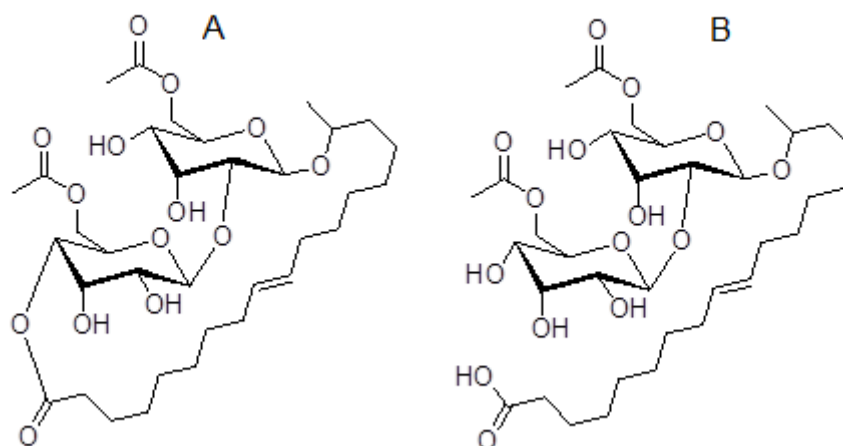


Figure 1. Chemical structure of lactonic (A) and acid (B) sophorolipids from *C. bombicola*

Table 1. Minimum inhibitory concentration and fractional inhibitory concentration of sophorolipid and lactic acid against wild-type isolates of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.

Bacteria	Sophorolipid ($\mu\text{g/mL}$)			Lactic acid (%)			FIC index	Interaction
	MIC	MIC _c	FIC	MIC	MIC _c	FIC		
<i>S. aureus</i>	31.25	15.6	0.49	0.31	0.15	0.48	0.97	Additism
<i>L. monocytogenes</i>	62.5	15.6	0.24	0.62	0.31	0.5	0.74	Additism

MIC - minimum inhibitory concentration

MIC_c – minimum inhibitory concentration in combination

FIC – Fractional inhibitory concentration: ≤ 0.5 : synergistic; > 0.5 FIC ≤ 1 : additive; > 1 FIC < 4 : indifferent and FIC ≥ 4 : antagonistic interaction.

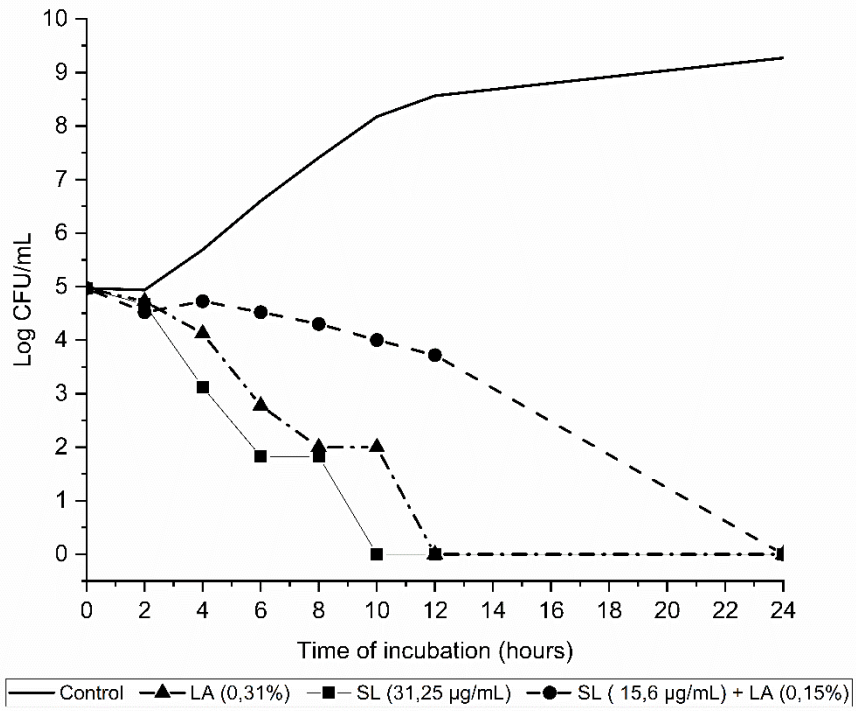


Figure 2. Growth curve of *Staphylococcus aureus* in treatment absence (Control), lactic acid (LA), sophorolipid (SL) and combination of both (SL + LA).

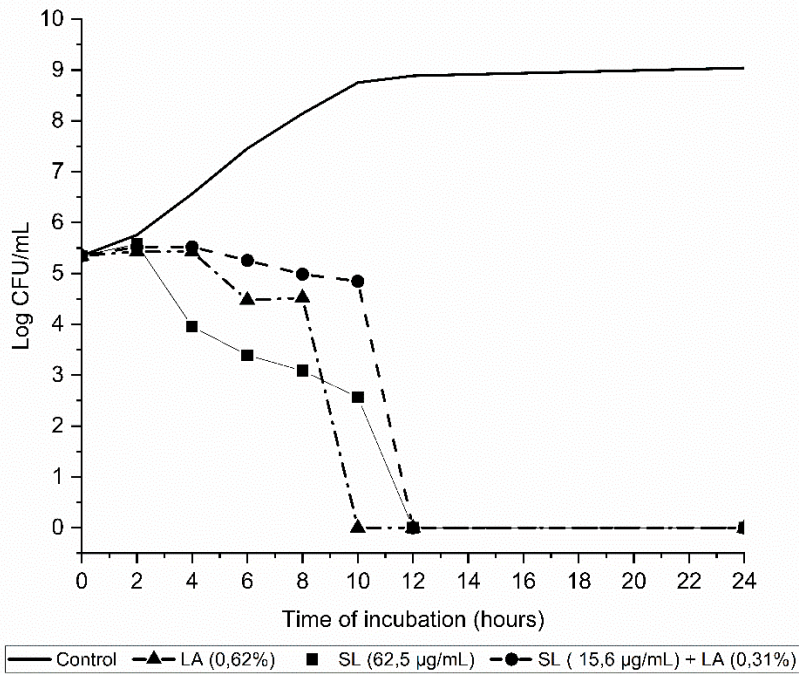


Figure 3. Growth curve of *Listeria monocytogenes* in treatment absence (Control), lactic acid (LA), sophorolipid (SL) and combination of both (SL + LA).

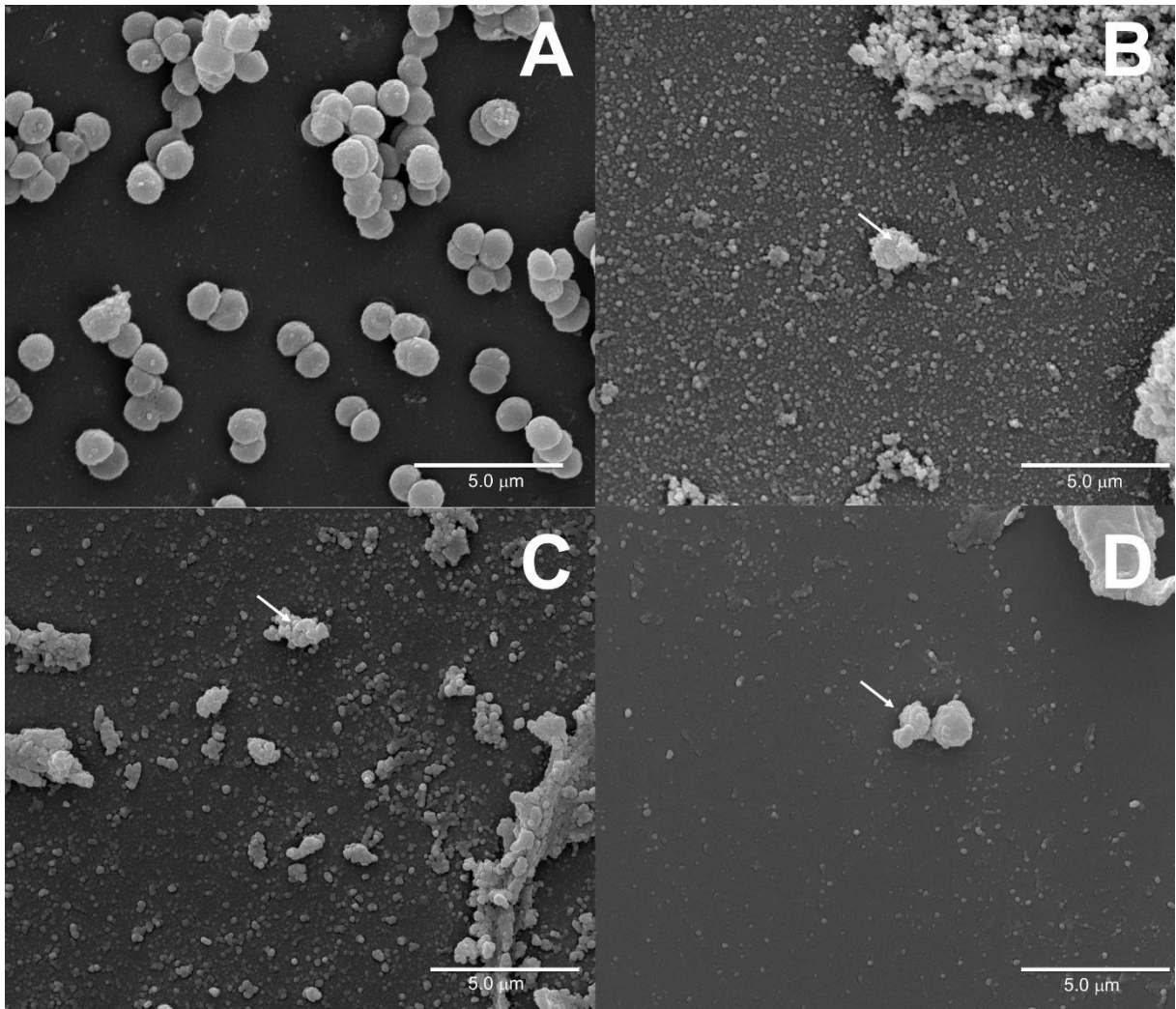


Figure 4. SEM Images of *S. aureus* cells: A - Control, B- 31.25 μg/mL of sophorolipid, C- 0.31 % of lactic acid and D- 15.6 μg/mL of sophorolipid + 0.15 % lactic acid for 5 h. Magnification: 15,000 x. Arrows indicate the protuberances and lumps on the surface of cells.

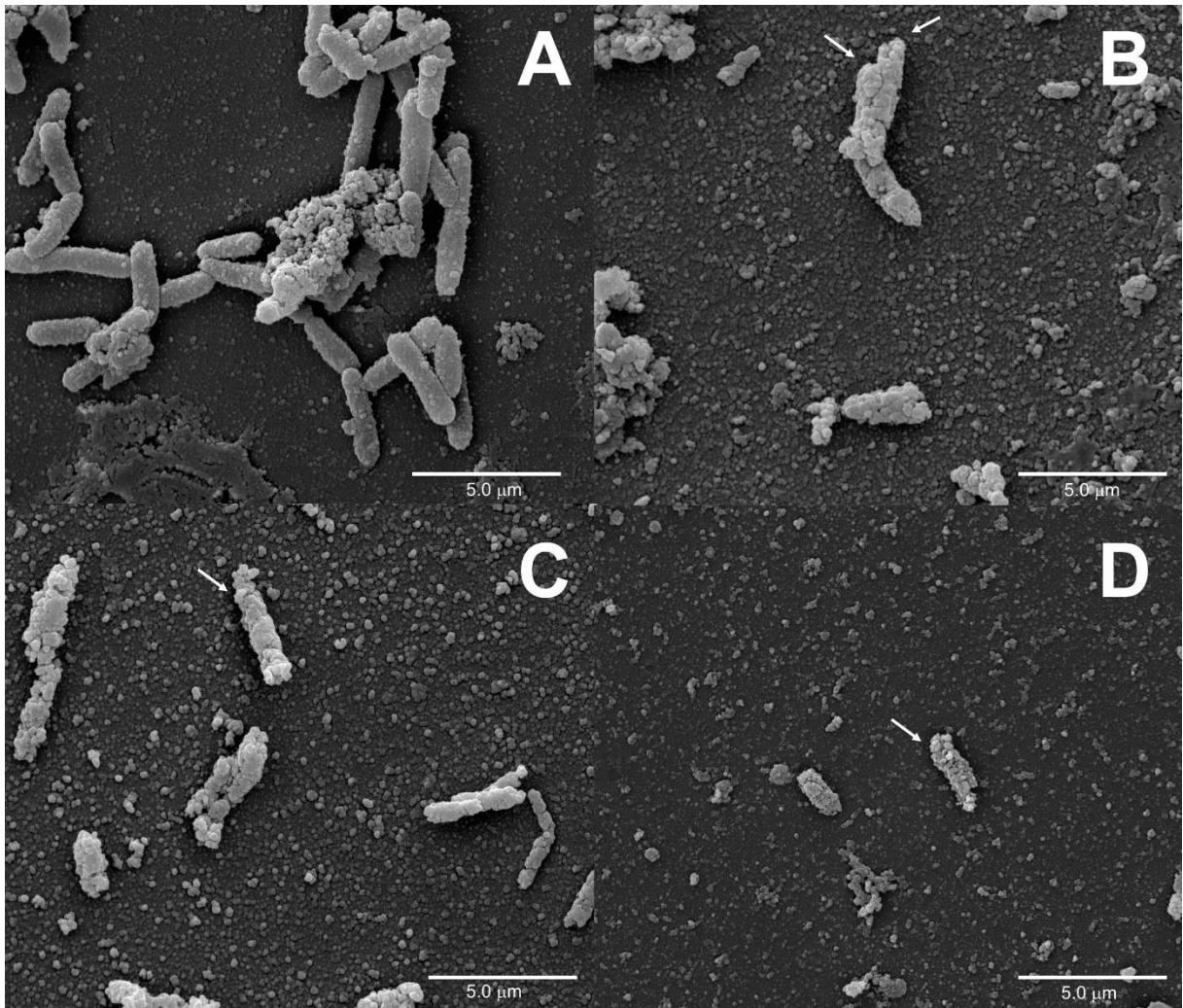


Figure 5. SEM Images of *L. monocytogenes* cells: A - Control, B- 62.5 µg/mL of sophorolipid, C- 0.62 % of lactic acid and D- 15.6 µg/mL of sophorolipid + 0.31 % lactic acid for 5 h. Magnification: 15,000 x. Arrows indicate the protuberances and lumps on the surface of cells.