



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE
Candida bombicola ATCC 22214 EM ALGINATO DE CÁLCIO**

Londrina
2017



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE



Programa de Pós Graduação em

Biotecnologia

MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE
Candida bombicola ATCC 22214 EM ALGINATO DE CÁLCIO**

Londrina
2017

MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE
Candida bombicola **ATCC 22214 EM ALGINATO DE CÁLCIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

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

Londrina
2017

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

Oliveira, Marcos Roberto de .

Produção de sofrorolípídeos por células imobilizadas de *Candida bombicola* ATCC 22214 em alginato de cálcio / Marcos Roberto de Oliveira. - Londrina, 2017.
185 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Coorientador: Doumit Camilios Neto.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2017.

Inclui bibliografia.

1. Sofrorolípídeo - Tese. 2. Imobilização - Tese. 3. *Candida bombicola* - Tese. 4. Alginato - Tese. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone . II. Camilios Neto, Doumit . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . IV. Título.

MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Candida bombicola* ATCC 22214 EM ALGINATO DE CÁLCIO

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Antonia Pedrine
Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Mayka Reghiany Pedrão
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.^a Dr.^a Lucia Felicidades Dias
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.^a Dr.^a Josiane Alessandra Vignoli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Cristiani Baldo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de julho de 2017.

Dedico este trabalho a minha família e em
especial a minha esposa pela paciência,
carinho, incentivo e compreensão

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, pela dedicação, orientação, apoio e incentivo durante todos estes anos, desde minha graduação;

À meu coorientador, Prof. Dr. Doumit Camilios Neto, pelo suporte e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho;

Á Prof.^a Dr.^a Cristiani Baldo, pela convivência agradável durante estes anos no laboratório e apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Á Prof.^a Dr.^a Josiane Alessandra Vignoli, pela apoio durante o desenvolvimento deste trabalho;

Á Prof.^a Dr.^a Mayka Reghiany Pedrão e Prof. Dr. Fábio Augusto Coró, pelo apoio, incentivo e amizade incondicionais;

Á Prof.^a Dr.^a Lucia Felicidades Dias, pelo carinho, incentivo e apoio;

Ao Prof. Ms. Marcos Massaki Imamura, pelo apoio e incentivo;

Ao Nelson Janeiro Rodriguez pelo suporte, boa vontade e disponibilidade em todos os momentos

Ao Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer, pelo suporte e auxílio nas análises estruturais

Ao Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, pelo suporte e auxílio nas análises de microscopia eletrônica

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, pela atenção, apoio, colaboração e auxílios prestados.

A todos os meus colegas de laboratório, que de alguma forma auxiliaram na elaboração, execução e conclusão de mais uma etapa em minha vida profissional;

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

“Assim como todas as portas são diferentes
aparentemente todos os caminhos são diferentes
Mas vão dar todos no mesmo lugar

O caminho do fogo é a água
Assim como o caminho do barco é o porto

O caminho do sangue é o chicote
Assim como o caminho do reto é o torto

O caminho do risco é o sucesso
Assim como o caminho do acaso é a sorte

O caminho da dor é o amigo
O caminho da vida é a morte”

Água Viva
Paulo Coelho

OLIVEIRA, Marcos Roberto. **Produção de soforolipídeos por células imobilizadas de *Candida bombicola* ATCC 22214 em alginato de cálcio**. 2017. 185 f. Tese do Curso de Doutorado do Programa em Biotecnologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Os soforolipídeos são biossurfactantes produzidos por *Candida bombicola* ATCC 22214 e possuem um amplo campo de aplicação, porém o custo elevado de produção exige desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes, para torná-los competitivos. O objetivo desse trabalho foi produzir e verificar a composição estrutural dos soforolipídeos por *Candida bombicola*, imobilizada em alginato de cálcio. O processo de imobilização foi padronizado e a produção de soforolipídeos foi testada, por delineamento fatorial 4^{3-1} com os fatores glicose, óleo de girassol, K_2HPO_4 e $CaCl_2$. A imobilização celular foi confirmada por MEV e os soforolipídeos caracterizados por FTIR e MS. As condições ótimas de imobilização foram: 50 g/L células; 30 g/L de alginato de sódio; 0,1 mol/L de cloreto de cálcio; tempo de cura de 12 horas por 96 horas, atingindo 2,33 g/L de soforolipídeos com uma eficiência de imobilização de 74,487%. Um novo planejamento foi realizado para otimizar a produção o que atingiu 8,458 g/L com uma eficiência de imobilização de 90,922% nas condições em (g/L): 30 glicose, 30 de óleo de girassol, 0,1 de extrato de levedura, 4,5 de K_2HPO_4 e 4,5 de $CaCl_2$. As células imobilizadas foram estáveis por 3 ciclos, mantendo a eficiência em torno de 70,7497 %. Os soforolipídeos apresentaram a composição estrutural de 70,95% de formas acídicas (7,92% C_{16} ; 12,54% C_{18} ; 37,29% de $C_{18:1}$ e 13,20% de $C_{18:2}$) e 29,05% de formas lactônicas (5,8% C_{16} , 3,63% C_{18} , 17,82% $C_{18:1}$ e 2,31 $C_{18:2}$).

Palavras-chave: Soforolipídeos. *Candida bombicola*. Imobilização. Alginato. Caracterização estrutural.

OLIVEIRA, Marcos Roberto. **Production of sophorolipids by the immobilized cells of *Candida bombicola* ATCC 22214 in Ca-alginate beads.** 2017. 185 p. PhD Thesis of Doctoral Program in Biotechnology – State University of Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Sophorolipids are biosurfactants produced by *Candida bombicola* ATCC 22214 and have a wide field of application, but the high cost of production requires the development of bioprocesses more efficient to turn them competitive. The objective of this research was to produce and verify the structural composition of the sophorolipids produced by *Candida bombicola*, immobilized in calcium alginate. The immobilization process was standardized and the production of sophorolipids was tested by factorial design 4^{3-1} been the factors: glucose, sunflower oil, K_2HPO_4 and $CaCl_2$. Cellular immobilization was confirmed by MEV and sophorolipids characterized by FTIR and MS. The optimal condition of immobilization were: 50 g/L cells; 30 g/L sodium alginate; 0.1 mol/L calcium chloride; cure time of 12 hours for 96 hours, reaching 2.33 g / L of sophorolipids with an immobilization efficiency of 74.487%. A new planning was carried out to optimize the production, which reached 8.458 g/L and presented an immobilization efficiency of 90.922% under the conditions in (g/L): 30 glucose, 30 sunflower oil, 0.1 yeast extract, 4.5 of K_2HPO_4 and 4.5 of $CaCl_2$. The immobilized cells were stable for 3 cycles, maintaining efficiency around 70.7497%. The sophorolipids presented the structural composition of 70.95% of acidic forms (7.92% C_{16} , 12.54% C_{18} , 37.29% $C_{18:1}$ and 13.20% $C_{18:2}$) and 29.05% of lactonic forms (5.8% C_{16} , 3.63% C_{18} , 17.82% $C_{18:1}$ and 2.31 $C_{18:2}$).

Keywords: Sophorolipids. *Candida bombicola*. Immobilization. Alginate. Structural characterization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura anfifílica dos surfactantes, partição entre as fases imiscíveis com formação micelas.....	7
Figura 2 – Ação dos surfactantes sobre a tensão superficial e interfacial.....	9
Figura 3 – Relação entre a concentração de surfactante, formação de micela e concentração micelar crítica	10
Figura 4 – Propriedades dos surfactantes.....	12
Figura 5 – Estrutura geral dos soforolipídeos	15
Figura 6 – Microfotografia da <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214 obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura	17
Figura 7 – Variação estrutural dos soforolipídeos.....	20
Figura 8 – Formas diméricas e triméricas dos soforolipídeos	21
Figura 9 - Biossíntese de soforolipídeos.....	24
Figura 10 – Métodos de imobilização celular.....	43
Figura 11 – Estrutura química dos alginatos	45
Figura 12 – Processo de imobilização celular.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Classificação geral dos biossurfactantes	13
Tabela 2	– Áreas de aplicações dos biossurfactantes e suas principais funções	14
Tabela 3	– Microrganismos produtores de soforolipídeos	17
Tabela 4	– Características gerais da levedura <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	18
Tabela 5	– Empresas fabricantes de produtos à base de soforolipídeos.....	28
Tabela 6	– Aplicações dos soforolipídeos.....	28
Tabela 7	– Fontes de carbono utilizadas para a produção de soforolipídeos.....	32
Tabela 8	– Tipos de suporte para imobilização celular	44
Tabela 9	– Parâmetros para o ensaio de definição do meio de fermentação inicial para a produção de soforolipídeos por células imobilizadas	52
Tabela 10	– Parâmetros para o ensaio de padronização da concentração de células imobilizadas para a produção de soforolipídeos por células imobilizadas	52
Tabela 11	– Parâmetros para o ensaio de padronização da concentração de alginato de sódio para a produção de soforolipídeos por células imobilizadas	53
Tabela 12	– Parâmetros para o ensaio de padronização da concentração de cloreto de cálcio para a produção de soforolipídeos por células imobilizadas.....	54
Tabela 13	– Parâmetros para o ensaio do tempo de cura do alginato de cálcio para a produção de soforolipídeos por células imobilizadas	54
Tabela 14	– Planejamento fatorial do tipo 3^{4-1} utilizado para a otimização da produção de soforolipídeos por células imobilizadas.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	SURFACTANTES	7
2.2	PROPRIEDADES TENSOATIVAS	8
2.2.1	Tensão Superficial e Interfacial.....	9
2.2.2	Micelização e Concentração Micelar Crítica.....	10
2.2.3	Detergentes.....	11
2.2.4	Emulsificantes	11
2.2.5	Dispersantes.....	11
2.2.6	Molhantes ou umectantes	12
2.2.7	Espumantes.....	12
2.3	BIOSURFACTANTES	13
2.4	SOFOROLIPÍDEOS.....	15
2.5	MICROORGANISMOS PRODUTORES.....	16
2.6	ESTRUTURA DOS SOFOROLIPÍDEOS	19
2.7	BIOSSÍNTESE DOS SOFOROLIPÍDEOS.....	21
2.8	FUNÇÃO FISIOLÓGICA DOS SOFOROLIPÍDEOS.....	25
2.9	PROPRIEDADES SUPERFICIAIS DOS SOFOROLIPÍDEOS	26
2.10	APLICAÇÕES DOS SOFOROLIPÍDEOS	27
2.11	PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS	31
2.11.1	Fontes de Carbono	31
2.11.1.1	Fontes hidrofílicas	31
2.11.1.2	Fontes hidrofóbicas.....	32
2.11.2	Fontes de Nitrogênio	34
2.11.3	Sais Minerais	36
2.11.4	Parâmetros fermentativos – Temperatura.....	37
2.11.5	Parâmetros fermentativos – pH.....	37
2.11.6	Parâmetros fermentativos - Aeração e Oxigenação.....	38
2.11.7	Parâmetros fermentativos - Processo Fermentativo.....	39

2.12	IMOBILIZAÇÃO CELULAR.....	40
2.12.1	Tipos de Imobilização Celular	40
2.12.1.1	Imobilização em superfície de suporte.....	41
2.12.1.2	Aprisionamento em matriz porosa	41
2.12.1.3	Floculação celular.....	42
2.12.1.4	Contenção mecânica por barreiras.....	42
2.12.2	Suporte para imobilização - Alginato de sódio	44
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	47
3.1	JUSTIFICATIVA	47
3.2	OBJETIVOS.....	48
3.2.1	Objetivo Geral	48
3.2.2	Objetivos Específicos.....	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	MICROORGANISMO E MANUTENÇÃO	49
4.2	ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS E MATERIAIS	49
4.3	MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	49
4.3.1	Meio de Manutenção.....	49
4.3.2	Meio de Obtenção de Inóculo	49
4.3.3	Parâmetros do Processo Fermentativo	49
4.3.4	Reativação das Células e Obtenção do Inóculo	50
4.3.5	Biomassa para Imobilização.....	50
4.3.6	Preparo das Esferas de Alginato de Cálcio.....	50
4.4	FERMENTAÇÕES	51
4.4.1	Produção de Soforolipídeos por Células Livres.....	51
4.4.2	Produção de Soforolipídeos por Células em repouso.....	51
4.4.3	Produção de sofrorolipídeos por Células Imobilizadas	51
4.4.3.1	Definição do meio de fermentação inicial	51
4.4.3.2	Padronização da concentração de células imobilizadas.....	52
4.4.3.3	Padronização da concentração de alginato de sódio	53

4.4.3.4	Padronização da concentração da cloreto de cálcio	53
4.4.3.5	Padronização do tempo de cura do alginato de cálcio.....	54
4.4.3.6	Cinética da produção de soforolipídeos	55
4.4.3.7	Otimização da produção de soforolipídeos	55
4.4.3.8	Avaliação dos ciclos de reutilização de células imobilizadas.....	56
4.4.3.9	Produção de soforolipídeos nas condições otimizadas	57
4.5	INTERRUPÇÃO DOS CULTIVOS.....	57
4.6	EXTRAÇÃO DOS SOFOROLIPÍDEOS E ÓLEOS RESIDUAIS.....	57
4.7	ACOMPANHAMENTO DAS FERMENTAÇÕES	58
4.7.1	pH.....	58
4.7.2	Consumo de Açúcares (S_a)	58
4.7.3	Consumo de Óleo de Girassol (S_o)	58
4.7.4	Consumo de Carbono Total (S_T).....	58
4.7.5	Quantificação dos Soforolipídeos(P).....	59
4.7.6	Quantificação da Biomassa	59
4.7.6.1	Biomassa livre (X_f)	59
4.7.6.2	Biomassa imobilizada (X_i).....	59
4.7.6.3	Biomassa total (X_t)	59
4.7.7	Retenção de Células no Suporte (R)	60
4.7.8	Fuga de Células (X_s).....	60
4.7.9	Eficiência de Imobilização (Y_i)	60
4.7.10	Rendimento da Produção $Y_{P/S}$	61
4.7.11	Produtividade Volumétrica (Q).....	61
4.8	CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	61
4.9	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS SOFOROLIPÍDEOS	62
4.9.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	62
4.9.2	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	63
4.9.3	Espectrometria de Massa (MS).....	63
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64

5.1	ARTIGO PUBLICADO - BIOSYNTHESIS AND PRODUCTION OF SOPHOROLIPIDS.....	65
5.2	ARTIGO PUBLICADO – SOPHOROLIPIDS A PROMISING BIOSURFACTANT AND IT’S APPLICATIONS.	77
5.3	ARTIGO SUBMISSÃO - PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE <i>Candida bombicola</i> ATCC® 22214™ EM ALGINATO DE CÁLCIO	92
5.4	DEPÓSITO DE PATENTE - MICROENCAPSULAÇÃO CELULAR POR ALGINATO DE SÓDIO DE LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA PARA A PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS PRODUÇÃO DE SOPHOROLIPÍDEOS POR CÉLULAS IMOBILIZADAS	119
5.5	ELABORAÇÃO DE ARTIGO - COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DOS SOFOROLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR BATELADA CÉLULAS LIVRES, CÉLULAS EM REPOUSO E CÉLULAS IMOBILIZADAS.....	142
6	CONCLUSÃO	143
	REFERÊNCIAS	144
	APÊNDICE A – RESULTADOS COMPLEMENTARES	166

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos anfipáticos ou anfifílicos que apresentam em sua estrutura uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, possibilitando que suas moléculas se particionem na interface ar/água ou óleo/água, promovendo a redução da tensão superficial ou interfacial. Estas propriedades de superfície ativa permitem que os surfactantes sejam utilizados como agentes dispersantes, umectantes, espumantes, emulsionantes e lubrificantes, nos mais diversos setores como: agrícola, de alimentos, químico, têxtil, papel e celulose, cosméticos, farmacêutico, produtos de limpeza, higiene pessoal e petróleo.

Atualmente, grande parte dos surfactantes disponíveis é produzida a partir de recursos não renováveis como os derivados de petróleo e sua ampla utilização provoca diversos problemas ambientais devido a sua alta toxicidade, alta bio-acumulação e baixa biodegradabilidade. Contudo, devido a crescente preocupação ambiental existe a tendência de se substituir os surfactantes por biossurfactantes motivada pelas vantagens que os biossurfactantes apresentam como: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, alta seletividade e atividade específica em condições extremas de temperatura, pH e salinidade e produção a partir de recursos renováveis.

Dentre os biossurfactantes os soforolipídeos são um dos mais promissores com aplicações em diversas áreas como: biorremediação; alimentos; cosmetologia; farmacêutica, nanotecnologia e petróleo. Além da vasta gama de aplicações, apresentam diversas vantagens como: alta seletividade e atividade específica em condições extremas de temperatura, pH e salinidade ;alta aceitabilidade ecológica com baixa toxicidade e alta biodegradabilidade , serem produzidos a partir de recursos renováveis ou resíduos industriais processo de recuperação simples, produzidos em grandes quantidades, baixa capacidade de formação de espuma e alta detergência.

Apesar das inúmeras vantagens e aplicações que os soforolipídeos possuem, o processo de produção em larga escala e o custo relativamente elevado ainda são um grande obstáculo para a sua exploração comercial e competitividade econômica perante os surfactantes. A exploração comercial dos biossurfactantes atingiu um ponto crítico e tornou-se prioridade de muitas empresas, como resultado da iniciativa de sustentabilidade e agendas verdes.

O sucesso dos biossurfactantes perante os surfactantes depende de diversos fatores, especialmente o fator custo. Para superar as barreiras dos altos custos na produção de biossurfactantes, três estratégias básicas podem ser adotadas: (a) o uso de matéria prima / substratos de baixo custo, (b) desenvolvimento de processo fermentativos eficientes; (c) otimização do meio e condições de fermentação para que se obtenha níveis ótimos de produção, produtividade e redução de custos. Sendo assim, a escolha adequada da forma de condução do processo fermentativo é um passo importante, uma vez que pode aumentar a produtividade do produto desejado com conseqüente diminuição de custos .

O processo fermentativo utilizando células imobilizadas em suportes inertes é uma técnica de baixo custo, simples e de grande biocompatibilidade que oferece diversas vantagens sobre a fermentação com células livres como: maior produtividade; processo de recuperação mais simples; reutilização das células imobilizadas;; redução dos riscos de contaminação microbiana e diminuição de custos na manutenção de bioreatores. A imobilização celular em matriz de alginato de cálcio é uma técnica amplamente utilizada, de baixo custo, com alta disponibilidade de matéria prima e o processo de gelatinização não causa alterações drásticas na viabilidade e atividade dos microrganismos imobilizados .

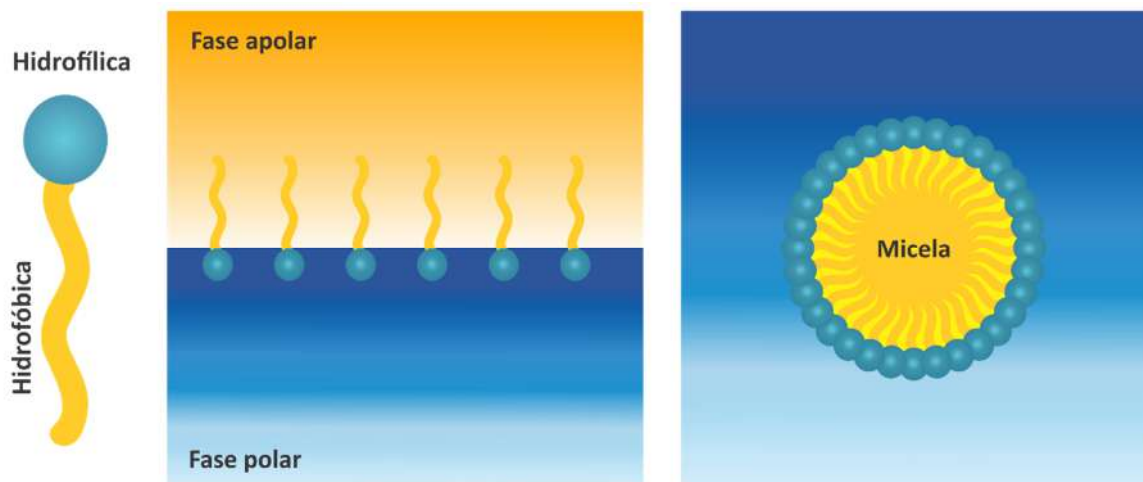
Considerando-se: o amplo campo de aplicação dos sofrólídeos; as inúmeras vantagens que esses apresentam sobre os surfactantes; os custos de produção em larga escala e o processo de imobilização celular como estratégia para redução de custos, a presente tese teve o propósito de avaliar e otimizar a produção de sofrólídeos por células de *Candida bombicola* ATCC 22214 imobilizadas em alginato de cálcio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos anfipáticos ou anfifílicos constituídos de uma porção hidrofóbica/apolar e uma porção hidrofílica/polar. Estas porções particionam-se na interface entre duas fases (óleo/água ou ar/água), levando a redução da tensão superficial (água/ar) ou interfacial (água/óleo) e consequente formação de micelas onde a fase apolar pode ser solubilizada na fase polar ou vice-versa (Figura 1). Estas propriedades de superfície ativa conferem aos surfactantes diversas propriedades como detergentes, dispersantes, umectantes, espumantes, estabilizantes, emulsificantes, solubilizantes e lubrificantes (DESAI; BANAT, Ibrahim M, 1997; GAUTAM; TYAGI, 2006; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Figura 1 - Estrutura anfifílica dos surfactantes, partição entre as fases imiscíveis com formação micelas



Fonte: O próprio autor (2017)

O mercado global de surfactantes em termos de volume de produção, é um dos maiores e mais importante dentro da classe dos compostos químicos industriais (ABOULHASSAN et al., 2006; REZNIK et al., 2010). Este mercado foi avaliado em US\$30,65 bilhões em 2015, com um crescimento constante de 4,4% nos próximos anos chegando a US\$39,69 bilhões em 2021 e próximo a US\$45,16 bilhões em 2024 (ACMITE MARKET INTELLIGENCE, 2016). A maioria dos surfactantes disponíveis atualmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo, com uma produção estimada em 15,93 milhões de toneladas em 2014, chegando a 24,19 milhões de toneladas em 2022 com um crescimento de 5,4 % ao ano.

Grande parte desta produção é utilizada como detergente doméstico (44,6%) e o restante em diversos setores como químico, têxtil, papel e celulose, cosméticos, farmacêutico, higiene pessoal, agrícola e alimentos (GRAND VIEW RESEARCH, 2016).

Devido a grande utilização, uma considerável quantidade de surfactantes é liberada no meio ambiente e estes compostos frequentemente são tóxicos para o meio ambiente e produzem grandes problemas de poluição. Apesar das medidas regulatórias tomadas para evitar o impacto nos sistemas aquáticos, a ecotoxicidade, a bio-acumulação e biodegradabilidade de surfactantes tradicionais continuam a ser questões de grande preocupação, como demonstrado por alguns autores que relatam uma baixa taxa de biodegradação e uma alta toxicidade aquática dos surfactantes tradicionais (MANN; BIDWELL, 2001).

Embora, nos últimos anos surfactantes com melhores características e menor impacto ambiental como os alquil poliglucosídeos, alquil poliglucamidas e ésteres metílicos de ácidos graxos, estejam sendo produzidos, sua produção nem é sempre baseada em recursos renováveis e implicam em etapas de síntese química (BOGAERT, I. N. A. VAN; ZHANG, Jinxin; SOETAERT, 2011). Contudo, existe uma tendência nos países industrializados de se substituir os surfactantes de origem petroquímica por surfactantes naturais ou biosurfactantes. Esta tendência deve-se principalmente a: superioridade dos biosurfactantes em diversos aspectos, crescente preocupação ambiental, leis ambientais mais severas e utilização da recursos renováveis para a produção (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2007; DESAI; BANAT, Ibrahim M, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2003).

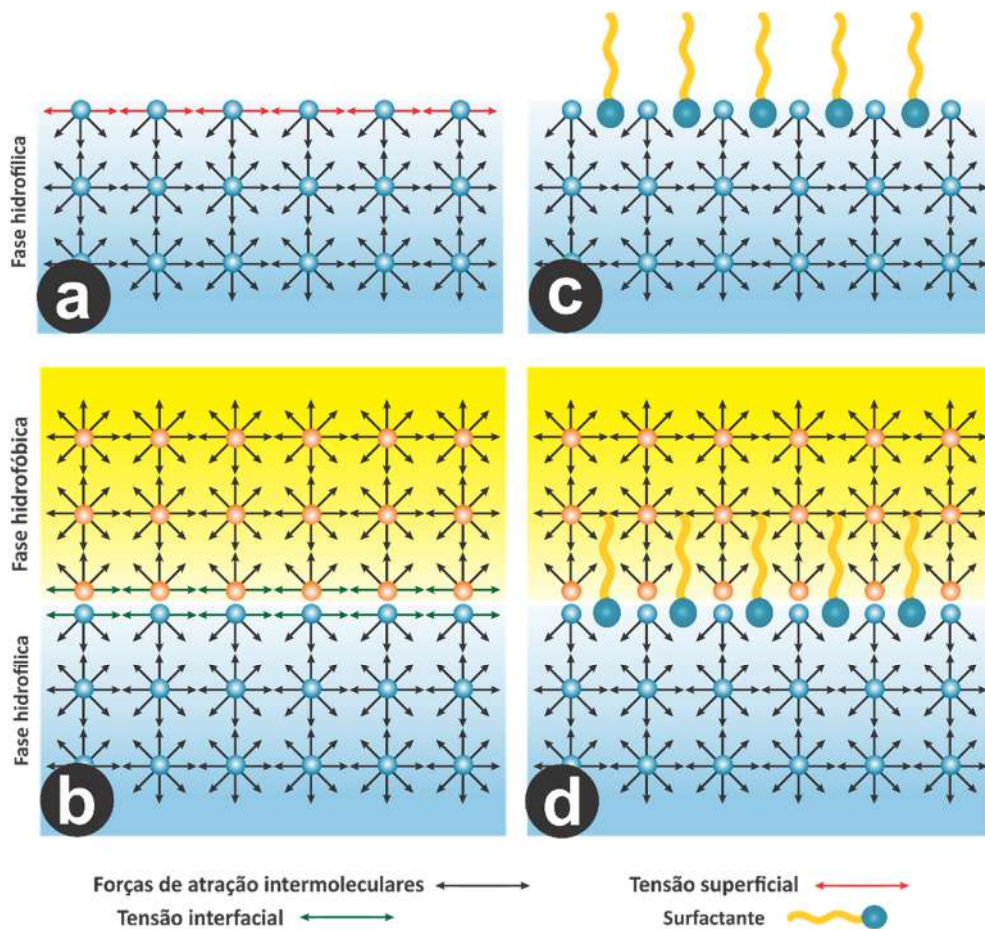
2.2 PROPRIEDADES TENSOATIVAS

As propriedades de redução da tensão superficial e interfacial apresentadas pelos surfactantes estão relacionadas diretamente com a estrutura química e da forma com que estas moléculas se ordenam entre a interface de duas fases líquidas imiscíveis (propriedades interfaciais – tensão interfacial), ou entre a interface de uma fase líquida e outra gasosa (propriedades superficiais – tensão superficial). Dependendo do tipo de interação e da forma do ordenamento das moléculas, os surfactantes apresentam diversas propriedades como: emulsificação, lubrificação, micelização, detergência, emulsificação, dispersão, molhabilidade e espumabilidade.

2.2.1 Tensão Superficial e Interfacial

A tensão superficial (entre fases líquidas e gasosas) (Figura 2a) ou interfacial (entre fases líquidas) (Figura 2b) pode ser definida como a força de atração entre as moléculas que impede o rompimento da superfície de contato entre duas fases. A adição de surfactantes nestas fases diminui as forças de atração intermolecular diminuindo a tensão superficial (Figura 2c) e tensão interfacial (Figura 2d). A tensão superficial, tensão interfacial e a concentração micelar crítica (CMC) são utilizadas para medir a eficiência de um surfactante. Um agente tensoativo eficiente é aquele que na concentração de 0,1% reduz a tensão superficial da água pura de 72 dinas/cm para menos que 35 dinas/cm a 25° C (PACWA-PLÓCINICZAK et al., 2011).

Figura 2 – Ação dos surfactantes sobre a tensão superficial e interfacial

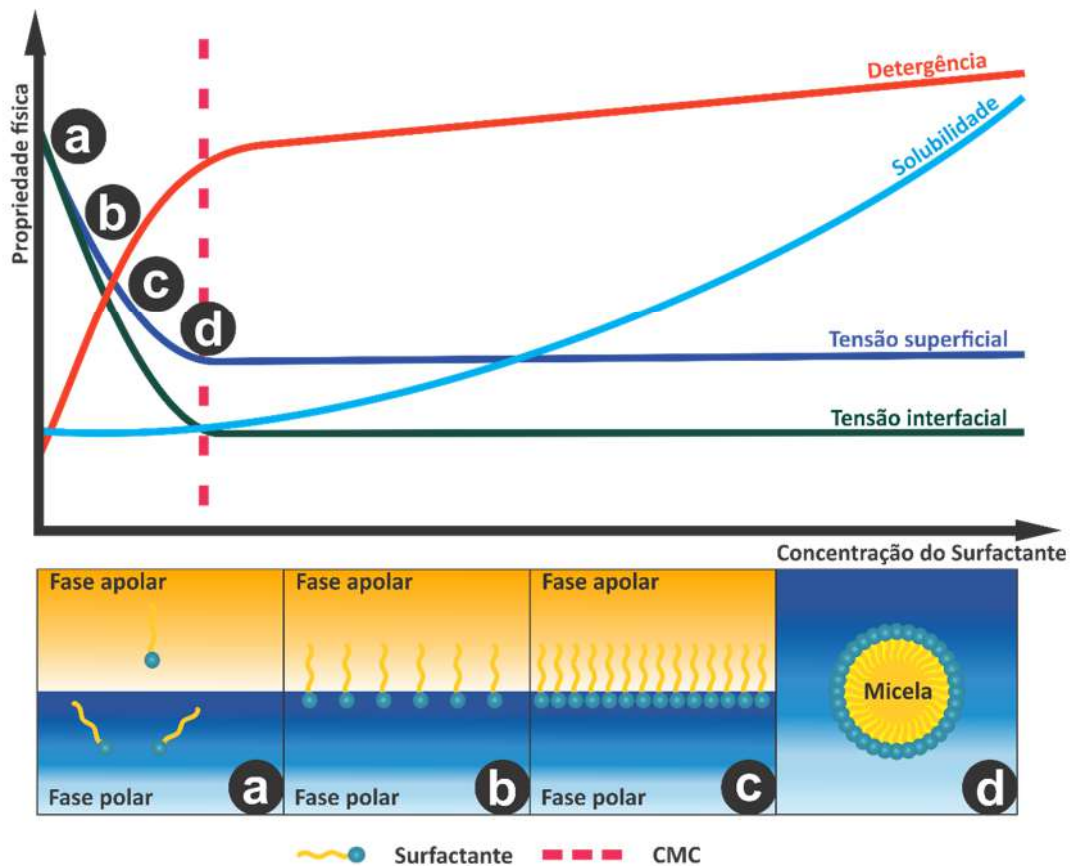


Fonte: O próprio autor (2017)

2.2.2 Micelização e Concentração Micelar Crítica

Em baixas concentrações de surfactante, o grau de ordenação de suas moléculas na interface é baixo (Figura 3a). Com o aumento da concentração do surfactante o seu grau de ordenação com relação a interface também aumenta, suas moléculas orientam-se paralelamente a interface (Figura 3b). Progressivamente com o aumento da concentração e da ordenação, a área disponível na interface diminui até completa saturação (Figura 3c). A partir deste momento, as moléculas de surfactante se rearranjam em uma única camada unidirecional formando as micelas (Figura 3d). Este ponto onde inicia-se a formação de micelas é denominado de concentração micelar crítica (CMC) e provoca alterações bruscas em diversas propriedades físicas do sistema, como tensão superficial, tensão interfacial, solubilidade e detergência (SINGH, A.; HAMME, VAN; WARD, 2007).

Figura 3 – Relação entre a concentração de surfactante, formação de micela e concentração micelar crítica



Fonte: O próprio autor (2017)

Essas alterações nas propriedades físicas podem ser utilizadas para medir a CMC de cada surfactante. A tensão superficial e tensão interfacial acima da CMC, atingem seu valor mínimo e permanecem praticamente constante. A detergência e a solubilidade atingem seu valor máximo acima da CMC. Os valores da CMC variam entre 1 a 2.000 mg/L, quanto menor o valor da CMC, menor a concentração de surfactante necessária para saturar a interface líquido/líquido ou líquido/gas e maior a eficiência do surfactante. Abaixo da CMC, as moléculas de surfactantes existem unicamente como monômeros individuais, acima da CMC existe um equilíbrio entre os monômeros e as micelas (MULLIGAN, 2005; NITSCHKE; PASTORE, 2002; ROUSE *et al.*, 1994).

2.2.3 Detergentes

A detergência é a capacidade dos surfactantes de formar micelas onde as moléculas de surfactante envolvem biofilmes ou sujidades aderidas a uma superfície sólida. As sujidades são removidas pela solubilização e emulsificação provocadas pelo surfactante, a detergência pode ser potencializado por ações mecânicas como jatos de água e ar (Figura 4a) (HIRATA; RYU; IGARASHI; et al., 2009).

2.2.4 Emulsificantes

A emulsificação é a capacidade de promover a suspensão de dois líquidos imiscíveis entre si pela redução da tensão interfacial entre eles, o que leva a formação de uma emulsão, que são classificadas em dois tipos óleo/água ou água/óleo. Alguns surfactantes emulsificantes podem apresentar propriedades espalhantes, adesivantes e umectantes (Figura 4b) (BOGNOLO, 1999).

2.2.5 Dispersantes

A dispersão não permite que ocorra a aglomeração ou precipitação de partículas em solução (mantém um sólido em suspensão em um meio líquido). Os surfactantes reduzem as forças de coesão entre as partículas, aumentando a estabilidade de uma emulsão ou suspensão (Figura 4c) (BOGNOLO, 1999).

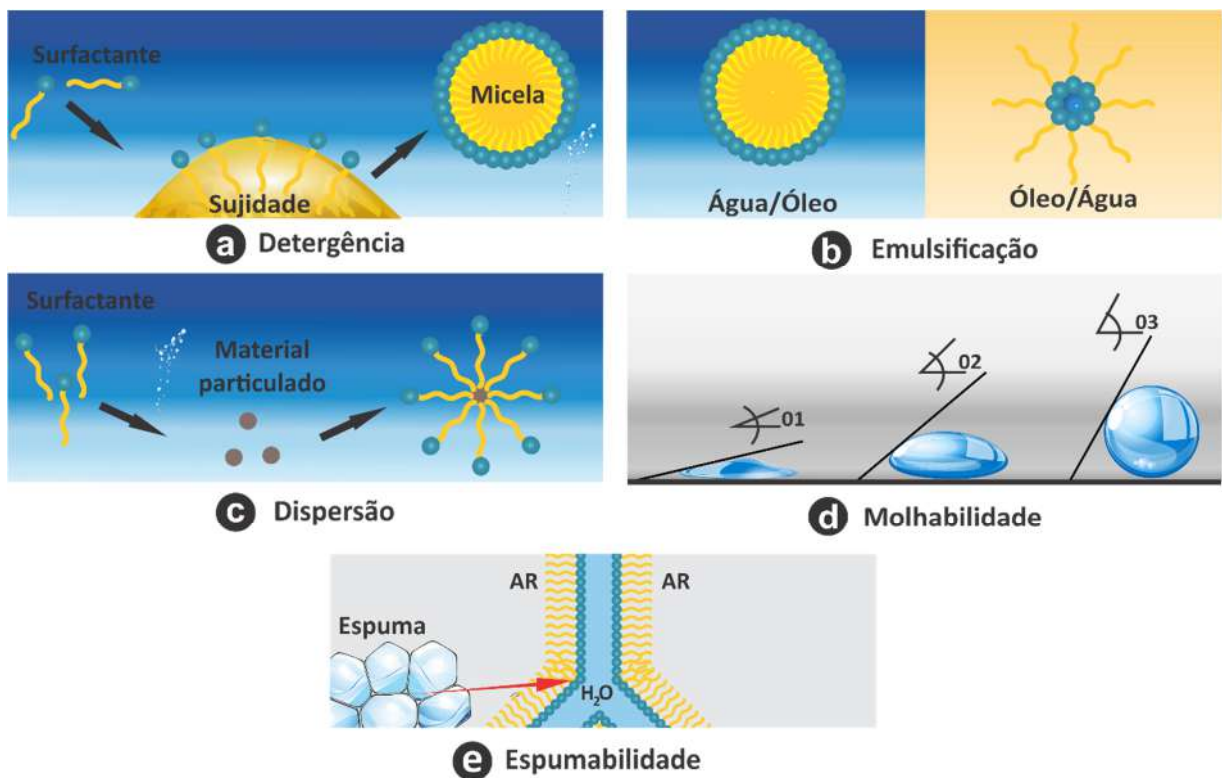
2.2.6 Molhantes ou umectantes

A molhabilidade é a capacidade de um líquido molhar uma superfície. Os surfactantes diminuem a tensão superficial de um líquido sobre uma superfície reduzindo o ângulo de contato entre a gota do líquido e a superfície. Além disso, ocorre um retardo na evaporação de água, aumentando o tempo de contato do líquido com a superfície. Quanto menor o ângulo de contato entre a gota e a superfície, maior a molhabilidade ou umectabilidade do surfactante (Figura 4d) (CHTIOUI et al., 2010).

2.2.7 Espumantes

A espumabilidade ou capacidade espumante de um surfactante é produzida através da dispersão de um gás em um líquido levando a formação de bolhas. Os surfactantes promovem uma maior estabilidade da espuma, agindo na interface líquido/gás ou ar/água, reduzindo a tensão superficial (Figura 4e) (HIRATA; RYU; ODA; et al., 2009).

Figura 4 – Propriedades dos surfactantes



Fonte: O próprio autor (2017)

2.3 BIOSSURFACTANTES

Biossurfactantes são surfactantes naturais produzidos por bactérias, fungos e leveduras. A porção hidrofóbica é uma longa cadeia de ácido graxo, hidroxi-ácido graxo ou α -alquil β -hidroxi-ácido graxo e a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool. São classificados principalmente pela sua composição bioquímica e origem microbiana em dois grandes grupos, biossurfactantes de baixo peso molecular (glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros) e de alto peso molecular (biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados) (Tabela 1) (DESAI; BANAT, Ibrahim M, 1997; KAUR SEKHON; KHANNA; CAMEOTRA, 2012).

Tabela 1 - Classificação geral dos biossurfactantes

Classe do biossurfactante		Microrganismo produtor	
Baixo peso molecular	<i>Glicolipídeos</i>	Ramnolipídeos Trealolipídeos Soforolipídeos Manosileritritol lipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus erithropolis</i> <i>Candida bombicola</i> <i>Candida antartica</i>
	<i>Lipopeptídeos e Lipoproteínas</i>	Surfactina Viscosina Lichenisina Serrawetina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Serratia marcescens</i>
	<i>Fosfolipídeos</i>	Fosfolipídeos	<i>Acinetobacter sp.</i>
	<i>Ácidos graxos/lipídeos neutros</i>	Ácido corinomicólico	<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>
Alto peso molecular	<i>Poliméricos</i>	Emulsan Alasan Liposan Lipomanana	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter radioresistens</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida tropicalis</i>
	<i>Particulados</i>	Vescicular Celular	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Cyanobacteria</i>

Fonte: Adaptado de DESAI; BANAT, 1997

Os biossurfactantes desempenham diversas funções para os microrganismos produtores, promovendo vantagens fisiológicas e ambientais. Dentre estas funções podemos relatar: patogenicidade; adesão celular; motilidade; sinalização e diferenciação celular; proteção (formação de biofilmes); absorção e biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos; amensalismo (antibiose); sequestrante de compostos tóxicos; armazenamento de fonte de carbono; captação gênica via transinfecção; maturação celular e *quórum sensing* (HAMME, VAN; SINGH, A.; WARD, 2006; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes possuem propriedades muito semelhantes aos surfactantes de origem petroquímica e são superiores devido a: natureza ecológica e sustentável (CHEN, Minglei *et al.*, 2011; NGUYEN *et al.*, 2010); baixa toxicidade (MULLIGAN, 2005); alta biodegradabilidade (LAWNICZAK; MARECIK; CHRZANOWSKI, 2013); baixa CMC (BHADORIYA; MADORIYA, 2013); alta tensão superficial (LIU, Y. *et al.*, 2013); alta atividade emulsificante (IBRAHIM *et al.*, 2013); alta estabilidade em condições extremas de salinidade, pH e temperatura (CHANDANKERE *et al.*, 2013); ampla diversidade estrutural e funcional (SATPUTE *et al.*, 2010); produção utilizando recursos renováveis (HENKEL *et al.*, 2012) e possibilidade da utilização de técnicas de biologia molecular na produção (ROELANTS, S. L. K. W. *et al.*, 2013).

As principais aplicações dos biossurfactantes em diferentes setores estão representados na Tabela 2 (SINGH, A.; HAMME, VAN; WARD, 2007). Com a maior preocupação dos consumidores para produtos ambientalmente corretos e sustentáveis, diversos fabricantes de surfactantes no mundo, estão entrando no mercado de biossurfactantes (KAUR SEKHON; KHANNA; CAMEOTRA, 2012; MARCHANT, Roger; BANAT, Ibrahim M, 2012). A demanda mundial de biossurfactantes deverá chegar a 462.000 toneladas até 2020, com um crescimento de 4,3% ao ano de 2014 a 2020, um mercado avaliado em US\$ 2.308,8 milhões.

Tabela 2 – Áreas de aplicações dos biossurfactantes e suas principais funções

Área	Aplicação	Papel do biossurfactante
Agricultura	Controle biológico	Facilitação de mecanismos de controle biológico como parasitismo, antibioses, competição, indução de resistência e hipovirulência
Alimentos	Emulsificação e demulsificação	Emulsificação, solubilização; demulsificação; suspensão; molhamento; espumante; lubrificante
	Ingrediente funcional	Interação com lipídeos, proteínas e carboidratos; agente protetor
Ambiental	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos; abaixamento da tensão interfacial; sequestro de metais
	Remediação e enxague de solos	Emulsificação através da aderência aos hidrocarbonetos; dispersão; agente espumante; detergente; enxague de solos
Biológica	Microbiológica	Comportamento fisiológico como mobilidade celular, comunicação celular, disponibilidade de nutriente, competição célula-célula, patogênese animal e vegetal
	Farmacêutica e terapêutica	Agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais; agentes adesivos; moléculas imunomodulatórias; vacinas; terapia gênica; estimulantes de fibroblastos dérmicos
Bioprocessos	Processos de recuperação	Biocatálise em sistemas aquosos de duas fases e microemulsões; biotransformação; recuperação de produtos intracelulares; aumento da produção de enzimas extracelulares e produtos da fermentação
Cosméticos	Produtos de beleza de saúde	Emulsificantes, agentes espumantes, solubilizantes, agentes molhantes, limpantes, agentes antimicrobianos, mediadores de ação enzimática
Petróleo	Recuperação melhorada de petróleo	Melhora drenagem nos poços de petróleo, estimula a liberação de óleo aprisionado por capilaridade; umedecimento de superfícies; redução da viscosidade e ponto de fluidez; diminuição da tensão superficial; dissolução de petróleo
	Demulsificação	Demulsificação de emulsões de óleo; solubilização de óleos; redução de viscosidade; agente molhante

Fonte: (SINGH, A.; HAMME, VAN; WARD, 2007)

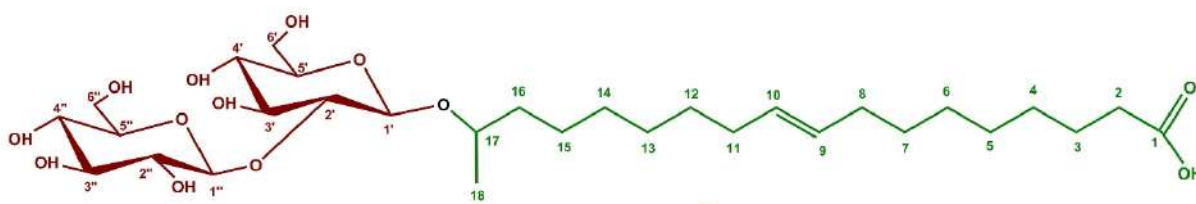
O interesse pelos biossurfactantes tem aumentado consideravelmente nas duas últimas décadas, como candidato para potenciais aplicações na indústria petroquímica, farmacêutica, biomédica e alimentícia (JAMAL; NAWAWI; ALAM, 2012). Em um levantamento realizado por Shete e colaboradores (2006) sobre patentes relacionadas aos biossurfactantes, os autores salientam que no ano de 2006 existiam 255 patentes relacionadas à utilização de biossurfactantes em diversas áreas como: indústria de petróleo (33%), cosméticos (15%), área biomédica (12%) e biorremediação (11%). Já as patentes baseadas no tipo de biossurfactantes 24% eram relacionadas aos sofrorolipídeos, 16% ao emulsan, 13% a surfactina e 12% aos ramnolipídeos (SHETE *et al.*, 2006).

As cinco maiores empresas do setor de biossurfactantes que detem 90% do mercado são BASF Cognis, Ecover, Urumqui Unite, Saraya e MG Intobio (RADIANT INSIGHTS, 2014). Alguns biossurfactantes são comercializados com sucesso, mas a maioria destes não conseguiram uma boa penetração de mercado devido aos seus altos custos de produção, baixa produtividade e linhas de produção insatisfatórias (GEYS; SOETAERT; BOGAERT, I. N. A. VAN, 2014). Para que ocorra um aumento na demanda por biossurfactantes, os custos de produção devem melhorar significativamente e novos biossurfactantes e cepas produtoras devem ser pesquisadas (KONISHI *et al.*, 2016).

2.4 SOFOROLIPÍDEOS

Os sofrorolipídeos são metabólitos secundários produzidos principalmente pela levedura *Candida bombicola*, a partir de açúcares e lipídeos, como uma mistura de compostos de estruturas químicas relacionadas, (COOPER; PADDOCK, 1984). Estruturalmente são compostos de um dissacarídeo sefarose (fração polar) ligados por ligação β -glicosídica a uma longa cadeia de ácido graxo (fração apolar) (Figura 5) (ASMER *et al.*, 1988; GORIN; SPENCER; TULLOCH, 1961).

Figura 5 - Estrutura geral dos sofrorolipídeos



Fonte: (GORIN; SPENCER; TULLOCH, 1961)

Dentre os biossurfactantes os soforolipídeos são um dos mais conhecidos, promissores e atrativos biossurfactantes que combinam química verde com baixa pegada de carbono (sem os indesejáveis subprodutos ou desvantagens ambientais associadas com surfactantes sintéticos) (DESAI; BANAT, Ibrahim M, 1997; DEVELTER, D. W. G.; LAURYSEN, 2010). Os soforolipídeos podem ser utilizados em diversas áreas como agricultura (YOO, D.-S.; LEE, B.-S.; KIM, EUN-Ki, 2005), biorremediação (KANG et al., 2010), farmacêutica (CHEN, J. et al., 2006), cosmetologia (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009), alimentícia (YUAN; YANG, S.; CHEN, J., 2012) e nanotecnológica (KASTURE et al., 2007).

São considerados superiores aos surfactantes sintéticos devido a: alta seletividade e atividade específica em uma ampla faixa de pHs, temperaturas e salinidade (CHANDRAN; DAS, 2012); baixa formação de espuma, excelentes propriedades detergentes (HIRATA; RYU; ODA; et al., 2009); dureza da água não afeta suas propriedades superficiais e interfaciais; sinergismo entre as formas acídicas e lactônicas aumenta a atividade surfactante (HIRATA; RYU; IGARASHI; et al., 2009); baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (BAEK et al., 2003; MA, X.-J.; LI, Hui; SONG, 2012); podem ser produzidos em grandes quantidades (PEKIN, Gülseren; VARDAR-SUKAN; KOSARIC, Naim, 2005) baseado em recursos renováveis (ZHOU, Q.-H.; KOSARIC, Naim, 1995), subprodutos e resíduos agroindustriais (ASHBY et al., 2005) e são compostos geralmente reconhecido como seguro – GRAS (BOURDICHON et al., 2012; JOSHI-NAVARE, Kasturi; PRABHUNE, A. A., 2013).

2.5 MICRORGANISMOS PRODUTORES

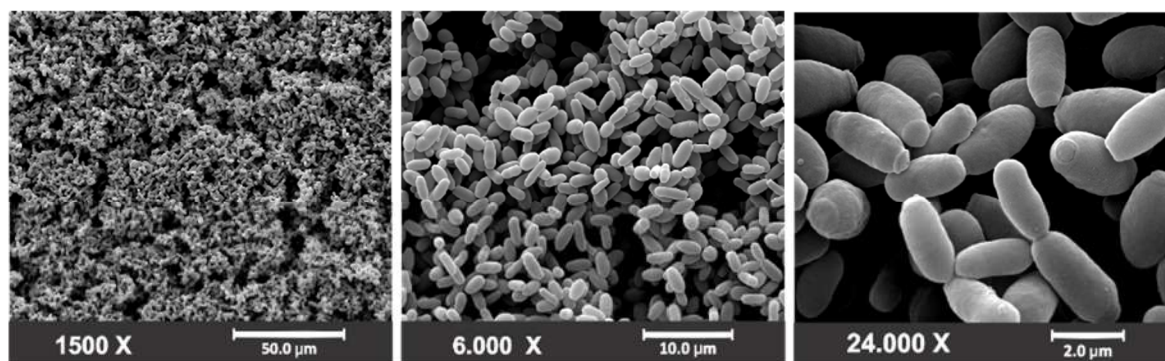
Atualmente na literatura são relatados vinte três microrganismos produtores de soforolipídeos (Tabela 3), dentre estes a levedura *Candida bombicola* ATCC 22214 é o microrganismo produtor de soforolipídeos mais utilizado e estudado.

A levedura *Candida bombicola* (Figura 6) foi isolada pela primeira vez em 1970 por Spencer, Gorin e Tulloch a partir de néctar de flores silvestres e mel de *Bombus sp.* (Mamangaba) (SPENCER; GORIN; TULLOCH, 1970). Pelo fato de ter sido isolado a partir de mel de abelhas do gênero *Bombus sp.* o nome *Torulopsis bombicola* foi dado a espécie. Inicialmente identificada e classificada como pertencetes ao Gênero *Torulopsis* devido a dificuldades na identificação por testes bioquímicos, somente em 1998 foi proposta a criação do Gênero *Starmerella* baseada em análises filogenéticas.

Tabela 3 - Microrganismos produtores de soforolipídeos

Microrganismo produtor	Referência
<i>Candida apicola</i>	GORIN; SPENCER; TULLOCH, 1961
<i>Torulopsis gropengiesseri</i>	JONES, 1967
<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	TULLOCH; SPENCER; DEINEMA, 1968
<i>Candida bombicola</i>	SPENCER; GORIN; TULLOCH, 1970
<i>Torulopsis petrophilum</i> ,	COOPER; PADDOCK, 1983
<i>Wickerhamiella domercqiae</i> Y2A	CHEN et al., 2006
<i>Candida batistae</i> CBS 8550	KONISHI et al., 2008
<i>Pichia anomala</i> PY1	THANIYAVARN et al., 2008
<i>Candida floricola</i> TM1502	IMURA et al., 2010
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27208	KURTZMAN et al., 2010
<i>Candida stellate</i>	KURTZMAN et al., 2010
<i>Candida riodecensis</i>	KURTZMAN et al., 2010
<i>Trichosporon asahii</i>	CHANDRAN; DAS, 2010
<i>Candida rugosa</i>	CHANDRAN; DAS, 2011
<i>Rhodotorula muciliginosa</i>	CHANDRAN; DAS, 2011
<i>Candida kuoi</i>	KURTZMAN, 2012
<i>Candida tropicalis</i>	CHANDRAN; DAS, 2012
<i>Candida albicans</i> O-13-1	YANG et al., 2012
<i>Cryptococcus</i> sp. VITGBN2	BASAK; DAS; DAS, 2013
<i>Cyberlindnera samutprakarnensis</i> JP52	POOMTIEN et al., 2013
<i>Lachancea thermotolerans</i>	MOUSAVI; MAAL; MASSAH, 2014
<i>Starmerella orientalis</i>	WANG et al., 2016
<i>Rhodotorula babjevae</i> YS3	SEN et al., 2017

Fonte: o próprio autor (2017)

Figura 6 - Microfotografia da *Candida bombicola* ATCC 22214 obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura

Fonte: O próprio autor (2017)

Muitas vezes, a espécie *Candida bombicola* é referida como *Starmerella bombicola* que é a forma teleomórfica (fase sexual) da forma anamórfica (fase assexual) da *Candida bombicola*. O nome do Gênero *Starmerella* foi dado em homenagem a Willian T. Starmer, em reconhecimento a sua contribuição para a ecologia e evolução de leveduras associadas a plantas e insetos (ROSA; LACHANCE, 1998).

Atualmente o Gênero *Starmerella* contem aproximadamente 30 espécies de leveduras. As espécies como *Candida magnoliae*, *Candida bombicola* e *Candida batistae* parecem estar envolvidas em relações mutualísticas com abelhas (INGLIS; SIGLER; GOETTE, 1993; ROSA et al., 2003) e estão presentes no néctar de plantas rico em sacarose que são polinizadas por nectarívoros (colibris, mamangabas e abelhas) (MITTELBAACH et al., 2015). Fisiologicamente similares, a maioria das leveduras do Gênero *Starmerella* são microrganismos fermentativos que utilizam poucas fontes de carbono, todas sendo osmotolerantes, indicando especialização relativa ao nicho comum (LACHANCE, M.-A., 2011).

As características gerais da *Candida bombicola* são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Características gerais da levedura *Candida bombicola* ATCC 22214

Classificação filogenética		
Reino:	Fungi	
Sub-reino:	Dikarya	
Filo:	Ascomycota	
Sub filo:	Saccharomycotina	
Classe:	Saccharomycetes	
Sub classe:	Saccharomycetidae	
Ordem:	Saccharomycetales	
Família:	Saccharomycetaceae	
Genêro:	<i>Starmerella</i>	
Espécie:	<i>Candida bombicola</i>	Forma anomórfica
	<i>Starmerella bombicola</i>	Forma teleomórfica
Sinônimos		
<i>Candida bombicola</i> , <i>Starmerella bombicola</i> , <i>Torulopsis bombicola</i>		
Designações para coleções		
ATCC 22214, PRL 319-67, CCRC 21323, CBS 6009, CCRC 22302, IFO 1449, NRIC 1806, IFO 10243 e NRRL Y-17069		
Características bioquímicas		
Leveduras fermentativas	Heterotálicas	Osmotolerantes
Testes de fermentação de carboidratos *		
Glicose (+)	Galactose (-)	Sacarose (+)
Maltose (-)	Lactose (-)	Rafnose (v)
Trealose (-)		
Testes de crescimento em meio ágar *		
Glicose (+)	Salicina (-)	Manitol (+)
Inulina (-)	L-Sorbose (v)	Glucitol (v)
Sacarose (v)	L-Ramnose (-)	Mio-Inositol (-)
Rafinose (v)	D-Xilose (-)	DL-Lactato (-)
Melibiose (-)	L-Arabinose (-)	Succinato (s/-)
Galactose (w/-)	D-Arabinose (-)	Citrato (v)
Lactose (-)	D-Ribose (-)	D-Gluconato (v)
Trealose (-)	Metanol (-)	D-Glucosamina (-)
Maltose (-)	Etanol (+)	N-Acetil-D-Glucosamina (-)
Melezitose (-)	Glicerol (+)	Hexadecano (-)
Metil-A-D-Glicosídio (-)	Eritrol (-)	Nitrato (-)
Amido Solúvel (-)	Ribitol (-)	Vitamina Livre (-)
Celobiose (-)	Galactitol (-)	

* (+) Positivo, (-) Negativo, (v) Variável, (s) Positivo mais lento, (w) fraco

Fonte: Adaptado de (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; LACHANCE, M.-A., 2011; ROSA et al., 2003).

Apesar da levedura carregar consigo o nome do Gênero *Candida* que engloba muitas leveduras patogênicas como a *Candida albicans*, ambas encontram-se filogeneticamente distantes. *Candida bombicola* é uma levedura não patogênica que não utiliza o códon alternativo de tradução CUG (serina ao invés de leucina) como ocorre em diversas outras espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. cylindracea*, *C. parapsilosis*, *C. melibiosica*, *C. zeylanoides*, *C. rugosa*, *C. maltosa*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, e *C. viswanathii* (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2007; SUGITA; NAKASE, 1999).

2.6 ESTRUTURA DOS SOFOROLIPÍDEOS

Os soforolipídeos são moléculas anfipáticas ou anfifílicas formadas por uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. A fração hidrofílica é composta de um dissacarídeo sefarose (2'-O- β -D-glicopiranosil- β -glicopiranosose) ligados a uma fração hidrofóbica composta de uma longa cadeia de ácido graxo através de uma ligação β -glicosídica (Figura 7a) (ASMER *et al.*, 1988; TULLOCH; SPENCER, 1968). São produzidos como uma mistura das formas acídicas e lactônicas, com diferentes graus de acetilação, comprimentos da cadeia do ácido graxo, saturações e posição de hidroxilação. A composição da mistura influencia em suas propriedades físicas, químicas e biológicas (ASHBY; SOLAIMAN; FOGLIA, T. A., 2008; GLENNIS; COOPER, 2006; MORYA, V K *et al.*, 2013).

A ampla variação estrutural dos soforolipídeos deve-se a muitas combinações estruturais possíveis:

(a) a ligação β -glicosídica ocorre entre o carbono anomérico da sefarose (C1') e o carbono ω (terminal) ou ω -1 hidroxilado (sub-terminal) do ácido graxo (Figura 7b). (ASMER *et al.*, 1988; TULLOCH; HILL; SPENCER, 1968);

(b) os grupamentos hidroxila da sefarose nos carbonos C6' e C6'' podem estar desacetilados, monoacetilados ou diacetilados (Figura 7c) (ASMER *et al.*, 1988; OTTO *et al.*, 1999);

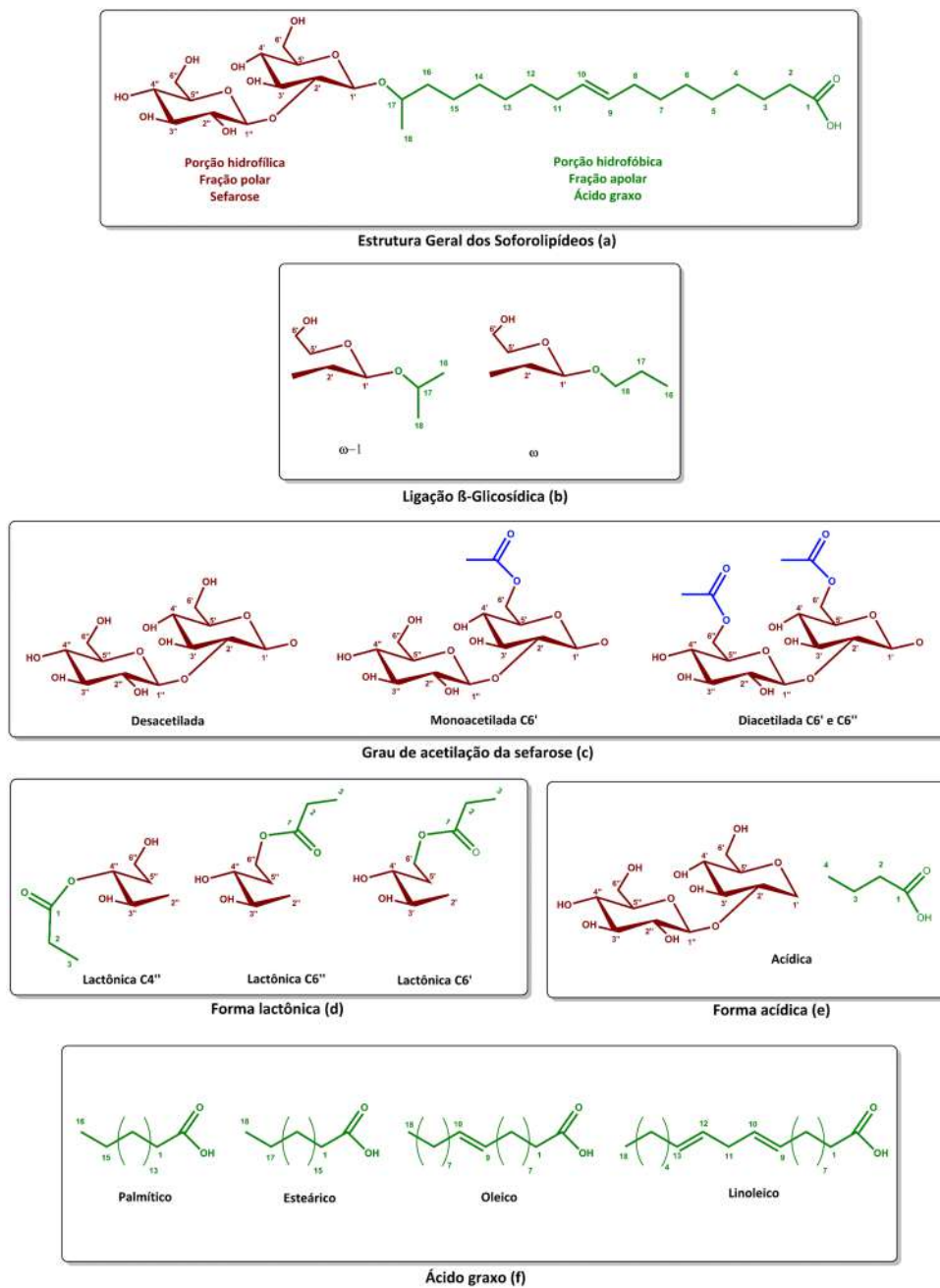
(c) presença de formas acídicas e lactônicas; na forma lactônicas o grupamento carboxila do ácido graxo pode estar esterificado a sefarose nos carbonos C4'', C6' ou C6'' (esterificação no C4'' é mais frequente) (Figura 7d), na forma acídica o grupamento carboxila do ácido graxo encontra-se livre (Figura 7e) (ASMER *et al.*, 1988);

(d) a cadeia do ácido graxo pode variar em tamanho (mais comum C16 e

C18), com presença ou não de insaturações (saturada, monoinsaturada ou poli-insaturada) (Figura 7f) (HU, Y.; JU, 2001a); presença de estereoisômeros (NUÑEZ et al., 2001);

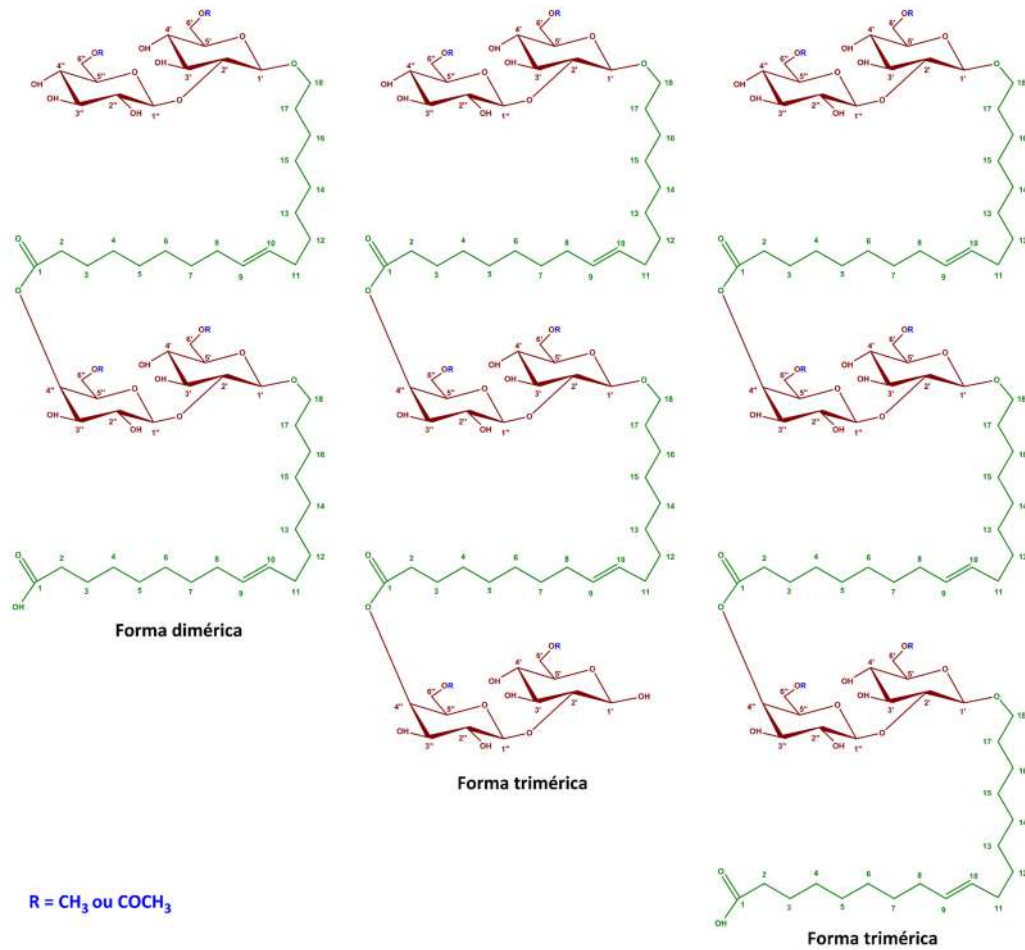
(e) os sofrorolípídeos podem sofrer reações de polimerização e formar estruturas diméricas ou triméricas (Figura 8) (PRICE et al., 2012).

Figura 7 - Variação estrutural dos sofrorolípídeos



Fonte: O próprio autor (2017)

Figura 8 – Formas diméricas e triméricas dos sofrorolípídeos



Fonte: O próprio autor (2017)

2.7 BIOSÍNTESE DOS SOFOROLÍPÍDEOS

Os sofrorolípídeos são metabólitos secundários produzidos por leveduras não patogênicas principalmente *Candida bombicola*, a partir de fontes de carbono hidrofílicas como glicose e hidrofóbicas como alcanos e ácidos graxos. São excretados para o meio extracelular como uma mistura de compostos de estruturas químicas relacionadas (COOPER; PADDOCK, 1984). A biossíntese de sofrorolípídeos (Figura 9) ocorre de forma dissociada ao crescimento celular (KIM, Youg-Bum; YUN; KIM, Eun-Ki, 2009) e condições limitantes de nitrogênio (CASAS, J.A.; GARCÍA DE LARA; GARCÍA-OCHOA, 1997; RAU *et al.*, 2001).

A limitação de nitrogênio leva a um aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de soforolipídeos, as quais estarão totalmente ativas até o final da fase exponencial (ZHOU, Q.-H.; KOSARIC, Naim, 1995).

O ácido graxo (fonte de carbono hidrofóbica) necessário para a síntese dos soforolipídeos suplementado no meio pode ser de diversos tipos como: ácido graxo; n-alcenos, álcoois, aldeídos, triglicerídeos ou ésteres de ácidos graxos, que serão metabolizados até seu ácido graxo correspondente. Caso o meio não contenha fonte de carbono hidrofóbica, esta será formado via síntese de Novo, a partir de acetil-CoA originado da via glicolítica (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2007).

A glicose incorporada na estrutura dos soforolipídeos origina-se da gliconeogênese. A glicose presente no meio é metabolizada pela via glicolítica (HOMMEL, R K *et al.*, 1994). Em baixas concentrações de glicose, as fontes de carbono hidrofóbicas são metabolizadas através da β -oxidação e utilizadas para a manutenção celular ao invés da síntese de soforolipídeos (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2011). A biossíntese é um processo intracelular que se inicia com o transporte de ácidos graxos, que envolve proteínas transportadoras e processos de difusão. Quando a síntese de soforolipídeos utiliza ácidos graxos exógenos de cadeia longa, estes são transportados para o meio intracelular pela Proteína Transportadora de Ácidos Graxos de Cadeia Longa (PTAG) ligada a membrana (LI, Jiashan; XIA, C.; *et al.*, 2016). O processo de biossíntese de soforolipídeos, inicia-se com a hidroxilação do ácido graxo presente no meio (processo de ativação).

A ativação dos ácidos graxos ocorre através de hidroxilação do seu carbono terminal (ω) ou subterminal ($\omega-1$), (Figura 9a) que é realizada pela enzima CYP52M1 (Citocromo P450 Monooxigenase pertencente família CYP52M1) NADPH dependente, ligada a membrana celular, levando a formação do ácido graxo ativado hidroxilado correspondente. Este por sua vez pode ser metabolizado via β -oxidação ou atuar como precursor para a síntese de soforolipídeos (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2009; HOMMEL, R K *et al.*, 1994; HOMMEL, Rolf K. *et al.*, 1994). A enzima CYP52M1 é expressa exclusivamente na fase estacionária e possivelmente potencializada por uma proteína de resistência a dano (DAP1), que estabiliza e regula as proteínas CYP450 e participa do metabolismo de lipídeos e esteróis (CIESIELSKA *et al.*, 2013, 2014). Nas próximas duas etapas duas moléculas de glicose serão ligadas ao ácido graxo ativado. A primeira molécula de glicose é ligada (posição C1') ao grupamento hidroxila ω ou $\omega-1$ do ácido graxo por ação da Glicosiltransferase I (UgtA1) (Figura 9b).

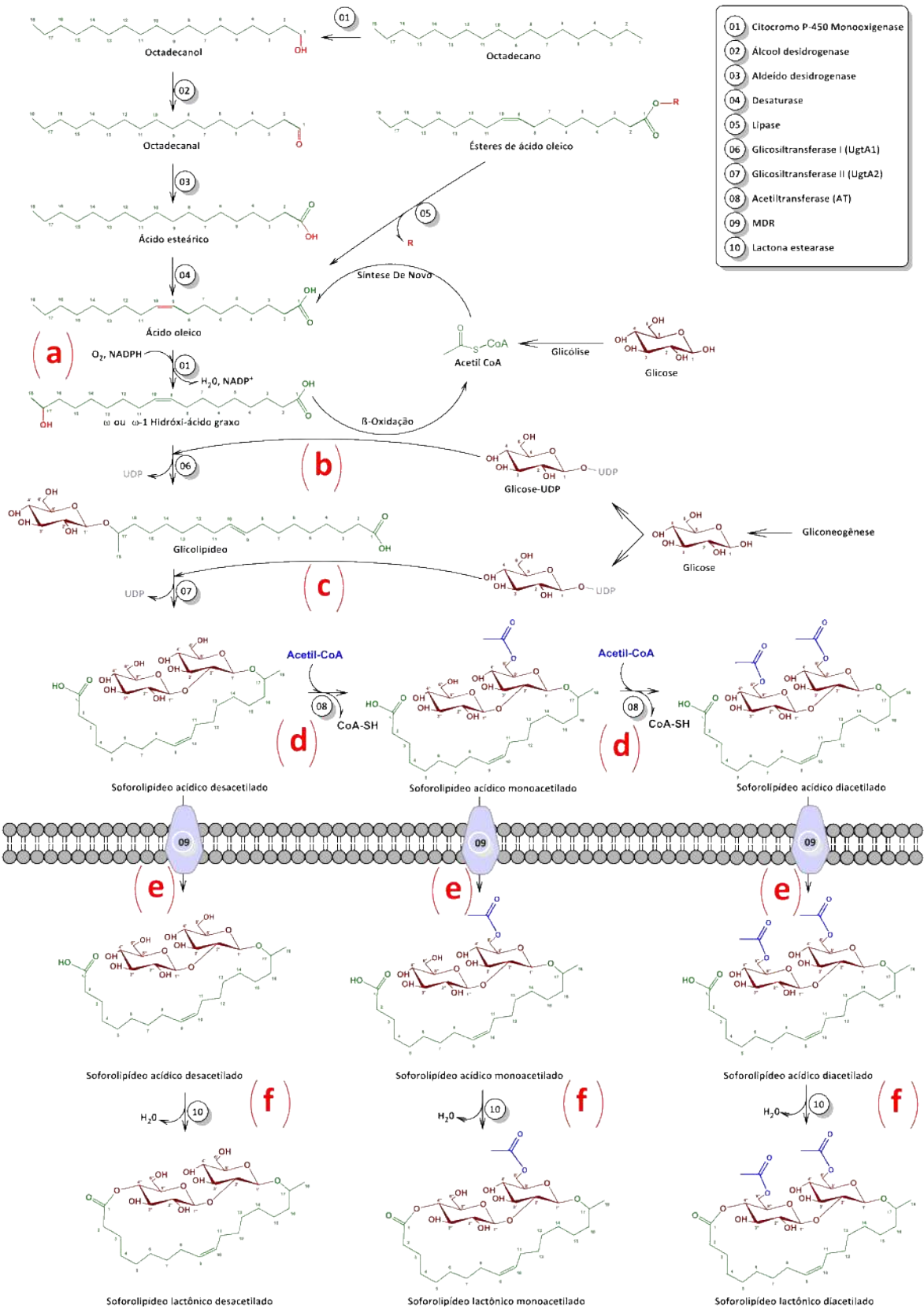
Posteriormente, uma segunda molécula de glicose é ligada ao C2' da primeira molécula de glicose ligado ao ácido graxo através da Glicosiltransferase II (UgtA2) (Figura 9c) (SAERENS, K. M. J. *et al.*, 2011). Ambas as reações requerem que a glicose (doadora de grupamentos glicosil) esteja ativada na forma de UDP-glicose (Glicose uridina difosfato) (BRAKEMEIER; WULLBRANDT, D; LANG, 1998; BRAKEMEIER; WULLBRANDT, Dieter; LANG, 1998). Ambas enzimas UgtA1 e UgtA2 são expressas em altas quantidades no início da fase estacionária (CIESIELSKA *et al.*, 2013).

O produto da segunda reação de glicosilação são os sofrorolípídeos em sua forma ácida não acetilados, reações posteriores de acetilação e lactonização, promovem a variações estruturais. A acetilação da sefarose nas posições C6' e C6'' são mediadas por ação da Acetil-transferase dependente de Acetil-conenzima A (Figura 9d).

Os sofrorolípídeos em sua forma ácida são excretados para o meio extracelular. O processo de excreção dos sofrorolípídeos ainda não foi totalmente elucidado, este processo pode ocorrer a partir da formação de vesículas, mediada possivelmente por transportadores passivos ou ativos, como a proteína transportadora ABC (MDR) (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2013). O controle do acúmulo intracelular de sofrorolípídeos pode ocorrer através do controle dos transportadores (MDR) (Figura 9e) ou enzimas de degradação como a enzima Flavina Monooxigenase MoA específica para o sofrorolípídeos ácidos diacetilados C18:2 e outras enzimas ainda não identificadas (LI, Jiashan; LI, Hui; *et al.*, 2016)

O processo de lactonização intramolecular dos sofrorolípídeos ácidos desacetilados ou acetilados, ocorre através de uma reação de esterificação entre o grupamento carboxila do ácido graxo e o grupamento hidroxila C4'', podendo ocorrer mais raramente no C6' ou C6'' (ASMER *et al.*, 1988), a reação de lactonização é catalisada pela enzima lactona estearase (Figura 9f) (CIESIELSKA *et al.*, 2014, 2016).

Figura 9 - Biossíntese de sofrorolídeos



Fonte: Adaptado de (BOGAERT, I. VAN *et al.*, 2015; CIESIELSKA *et al.*, 2016; ROELANTS, S. L. K. W. *et al.*, 2014)

2.8 FUNÇÃO FISIOLÓGICA DOS SOFOROLIPÍDEOS

Embora a função fisiológica dos biossurfactantes não seja completamente compreendida, estes desempenham diversas funções essenciais para o crescimento e manutenção celular. Uma generalização destas funções é extremamente difícil, pois, os biossurfactantes são produzidos por uma grande variedade de microrganismos, com diferentes estruturas químicas e com propriedades superficiais muito distintas. Portanto, cada biossurfactante pode desempenhar diferentes funções fisiológicas, proporcionando diferentes vantagens para os microrganismos produtores em seus nichos ecológicos (FRACCHIA et al., 2011).

As funções fisiológica dos soforolipídeos, não são totalmente compreendidas até o momento, mas algumas hipóteses foram levantadas. Os soforolipídeos são provavelmente formados e liberados para o meio extracelular como fonte de armazenagem extracelular de carbono (HOMMEL, R K; BAUM; KLEBER, H. P., 1994). O habitat dos microrganismos produtores de soforolipídeos como *Candida bombicola* e *Candida apicola* são no mel, néctar e pólen (INGLIS; SIGLER; GOETTE, 1993). Como estes habitats são de alta pressão osmótica, a produção de soforolipídeos pode ser uma forma de adaptação e proteção a essas altas concentrações de açúcar (HOMMEL, R K; BAUM; KLEBER, H. P., 1994), além de serem uma vantagem adaptativa, onde a levedura, converte e armazena os carboidratos e torna-os menos disponíveis para outros microrganismos (BOGAERT, I. N. A. VAN et al., 2007).

Muitos microrganismos são capazes de crescer em substratos lipofílicos, como, por exemplo, hidrocarbonetos como fonte única de carbono. Estes microrganismos são capazes de emulsionar fontes de carbono hidrofóbicas durante o crescimento. Esta capacidade emulsionante é dada pela produção de biossurfactantes extracelulares, principalmente de glicolipídeos, o que permite a captura do substrato para o espaço periplasmático (ITO; INOUE, 1982). No entanto, esta teoria, não é muito aceita para a formação de soforolipídeos, especialmente porque os soforolipídeos podem ser produzidos quando nenhum substrato hidrofóbico esteja presente e quando presentes são produzidos em quantidades que excedem em muito a concentração necessária para emulsificação destes substratos (BOGAERT, I. N. A. VAN et al., 2007).

Os soforolipídeos possuem atividade antimicrobiana contra algas (SUN, X.-X. et al., 2004), leveduras (ITO; KINTA; INOUE, 1980) e bactérias (SHAH, Vishal; BADIA; RATSEP,

2007) através da desestabilização e alteração da membrana lipídica (AZIM et al., 2006) conferindo-lhes atividade antimicrobiana, esta atividade antimicrobiana ou biocida pode servir como um mecanismo de competição interespecies como ocorre com outros biossurfactantes (DESAI; BANAT, Ibrahim M, 1997).

2.9 PROPRIEDADES SUPERFICIAIS DOS SOFOROLIPÍDEOS

Os soforolipídeos são compostos por uma mistura de moléculas aniônicas (acídicas) e não iônicas (lactônicas). Esta mistura gera um efeito sinérgico na ação do soforolipídeos como surfactante (HIRATA; RYU; ODA; *et al.*, 2009)(HIRATA; RYU; ODA; *et al.*, 2009). Qualquer mudança na estrutura dos soforolipídeos como grau de acetilação da sefarose, presença de insaturações do ácido graxo, lactonização, etc, influenciam em suas propriedades físicas, químicas e biológicas dos soforolipídeos. Para as propriedades de superfície ativa a mudança estrutural mais importante é o comprimento da cadeia de ácido graxo (AHN; MORYA, Vivek Kumar; KIM, Eun-Ki, 2016).

A CMC e a tensão superficial diminui com o aumento no comprimento da cadeia do ácido graxo, sendo mais acentuada a mudança para soforolipídeos com ácidos graxos menores (C10 e C12) (AHN; MORYA; KIM, 2016). Para alquil ésteres de soforolipídeos a relação também é inversa com o comprimento das cadeias dos alquil ésteres, onde o CMC diminui até 50% por CH₂ adicionado a cadeia do alquil éster ,ou seja, o aumento da cadeia do alquil éster diminui o CMC (GLENNIS; COOPER, 2006; ZHANG, L. *et al.*, 2004).

Soforolipídeos na forma lactônicas são surfactantes mais efetivos que as formas acídicas, o grau de acetilação também interfere nas propriedades superficiais. As formas diacetiladas são mais efetivas na redução da tensão superficial do que as lactônicas monoacetiladas (GLENNIS; COOPER, 2006) ou seja com o aumento do grau de acetilação dos soforolipídeos ocorre uma diminuição do CMC (OTTO et al., 1999). Os soforolipídeos apresentam baixa capacidade emulsificante (CAVALERO; COOPER, 2003; COOPER; PADDOCK, 1984) que aumenta com a diminuição da cadeia do ácido graxo (AHN; MORYA, Vivek Kumar; KIM, Eun-Ki, 2016).

Os soforolipídeos mantém suas propriedades surfactantes ativas em altas concentrações salinas e em uma ampla faixa de temperaturas (COOPER; PADDOCK, 1984; ELSHAFIE, A. E. *et al.*, 2015; HIRATA; RYU; IGARASHI; *et al.*, 2009), mas em pHs acima de 8,0

perdem suas atividades pois pode ocorrer a hidrólise dos grupamentos acetila e ligações éster (ITO; KINTA; INOUE, 1980). A solubilidade dos sofrorolipídeos aumenta com o pH, devido a dissociação do grupamento ácido livre da forma acídica, ou seja, a forma acídica é mais hidrofílica que a forma lactônica, especialmente em pH mais elevados (HU, Y.; JU, 2001a, 2001b).

Os sofrorolipídeos apresentam baixa espumabilidade e estabilidade espumante, em uma ampla faixa de concentrações. Quando comparada a outros surfactantes com características de supressoras de espumas, a espumabilidade dos sofrorolipídeos pode ser até dez vezes menores (HIRATA; RYU; IGARASHI; et al., 2009). A espumabilidade dos sofrorolipídeos diminui com o aumento da cadeia de ácidos graxo (AHN; MORYA; KIM, 2016). Esta baixa capacidade espumante pode ser devido à baixa adsorção, rápida difusão e ou grande área ocupada pela molécula na interface líquido/gás (HIRATA; RYU; IGARASHI; et al., 2009).

O poder detergente dos sofrorolipídeos é comparável e algumas vezes superior aos surfactantes comerciais. As propriedades detergentes e supressoras de espuma dos sofrorolipídeos praticamente não são alteradas em altas concentrações de Ca^{+2} e Mg^{+2} (água dura). As atividades superficiais dos surfactantes contendo grupos carboxílicos geralmente diminuem em água dura, pois estes grupamentos se ligam aos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} . Já os sofrorolipídeos não são afetados devido a formação de estruturas do tipo bola pelas formas acídicas e na porção hidrofílica os sofrorolipídeos não possuem grupamentos carboxílicos mas sim separam-se na porção hidrofílica (HIRATA; RYU; ODA; et al., 2009).

2.10 APLICAÇÕES DOS SOFOROLIPÍDEOS

Inúmeras propriedades favorecem e promovem a aplicação dos sofrorolipídeos em diversas áreas. Dentre estas propriedades podemos destacar: (a) alta biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica; (b) a combinação de baixa formação de espuma, alta detergência e alta eficiência surfactante em baixas concentração e (c) baixa citotoxicidade em suas concentrações efetivas (BAEK *et al.*, 2003; SOLAIMAN *et al.*, 2004). A toxicidade dos sofrorolipídeos é menor que a citotoxicidade da surfactina, que é um biossurfactante do tipo lipopeptídeo comercializado em formulações de cosméticos com baixíssima taxa de irritação da pele (KRIVOBOK et al., 1994; OTTO et al., 1999).

As formas lactônicas são mais hidrofóbicas (JOSHI-NAVARE, K; KHANVILKAR; PRABHUNE, A, 2013) e possuem melhores atividades biocidas (ITO; KINTA; INOUE, 1980), antitumoral (SHAO, L. *et al.*, 2012), espermicida, citotóxica e anti-inflamatória (SHAH, Vishal *et al.*, 2005). Por outro lado, as formas acídicas são mais hidrofílicas, possuem uma maior capacidade espumante e solubilidade (HIRATA; RYU; IGARASHI; *et al.*, 2009) sendo mais utilizadas em alimentos, biorremediação, cosméticos, produtos de limpeza e recuperação melhorada de petróleo (MA, X. *et al.*, 2011).

Atualmente os sofrorolipídeos são produzidos e comercializados por diversas empresas nas mais variadas áreas (Tabela 5), sendo compostos ativos em diversos produtos de beleza e higiene pessoal (shampoos, sabonetes, cremes antiacne, produtos anti-caspa, lápis labial, rouge, creme labial, batons, e pasta de dentes), limpeza residencial (detergente, sabão em pó) e biopesticidas (DÍAZ DE RIENZO *et al.*, 2016; PENG; TOTSINGAN; *et al.*, 2014; ROELANTS, S. L. K. W. *et al.*, 2014, 2016). Além destes produtos já em comercialização os sofrorolipídeos possuem potencial para aplicação em diversas outras áreas como agricultura, alimentos, biomédica, biorremediação, cosméticos, nanotecnologia e petrolífera. A Tabela 6 apresenta as aplicações dos sofrorolipídeos nestas diversas áreas.

Tabela 5 - Empresas fabricantes de produtos à base de sofrorolipídeos

Empresa	País	Área de atuação
Allied Carbon Solutions Ltd.	Japão	Agroquímicos
Croda	Reino Unido	Cosméticos e higiene pessoal
DSM Nutritional Products	Holanda	Cosméticos e higiene pessoal
Ecover Belgium	Bélgica	Produtos de limpeza e lavanderia
Envgreen	China	Produtor de sofrorolipídeos
Evonik	Alemanha	Produtos de limpeza
Groupe Soliance	França	Cosméticos
Henkel	Alemanha	Produtos de limpeza e cosméticos
Kaneka Co.	Japão	Cosméticos e higiene pessoal
MG Intobio Co. Ltd.	Coréia l	Cosméticos e higiene pessoal
Saraya Co. Ltd.	Japão	Produtos de limpeza e lavanderia
Synthezyme LLC	EUA	Produtos de limpeza, cosméticos, fungicidas e emulsificantes

Fonte: Adaptado (DÍAZ DE RIENZO *et al.*, 2016; PENG; MUNOZ-PINTO; *et al.*, 2014; ROELANTS, S. L. K. W. *et al.*, 2014, 2016).

Tabela 6 - Aplicações dos sofrorolipídeos

Aplicação	Função dos sofrorolipídeos	Referência
Agricultura		
Antimicrobiano	Atividade antifúngica contra <i>Phytophthora</i> sp e <i>Pythium</i> sp que causam podridão de raízes como tomates e morango	(YOO, D.-S.; LEE, B.-S.; KIM, EUN-Ki, 2005)
Solubilizante	Agente solubilizante para fungicidas, herbicidas e inseticidas	(ERNENWEIN <i>et al.</i> , 2015)
Fungicida	Sofrorolipídeos exibem atividades antimicrobianas contra 25 espécies de fitopatógenos	(SCHOFIELD; THAVASI; GROSS, Richard A, 2013)
Herbicidas	Adjuvante na formulação de herbicidas pós emergentes melhorando a adesão e absorção dos herbicidas nas plantas	(VAUGHN <i>et al.</i> , 2014)

Alimentos		
Antibiofilme	Rompe e inibe a formação de biofilmes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01, <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144 <i>Escherichia coli</i> NCTC1254	(DIAZ DE RIENZO et al., 2016)
Antibiofilme	Rompe e inibe a formação de biofilmes de <i>Ralstonia eutropha</i> ATCC 17699 e <i>Bacillus subtilis</i> BBK006	(RIENZO et al., 2014)
Anticongelante	Previnem a formação de cristais de gelo em produtos armazenados em câmaras frigoríficas	(MASARU et al., 2001)
Conservantes	Conservante de frutas in natura, inibindo o crescimento de fungos que causam a podridão de frutos	(YUAN; YANG, S.; CHEN, J., 2012)
Embalagens	Conjugação de soforolipídeos com biopolímeros permite o desenvolvimento de biofilmes para embalagem de alimentos com propriedades antimicrobianas e sistema de liberação controlada	(SOLAIMAN et al., 2015)
Sanitizante	Agente sanitizante para lavagem e limpeza de frutas e vegetais que possam estar contaminadas com <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> .	(PIERCE; HEILMAN, 2001)
Sanitizante	Agente sanitizante para lavagem de verduras frescas inativando patógenos como <i>Escherichia coli</i> O157:H7	(ZHANG, Xuejie et al., 2016)
Biomédica		
Antibiofilme	Previne a formação de biofilmes em cateteres de silicone diminuindo a hidrofobicidade do material e a formação de biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(PONTES et al., 2016)
Antibiofilme	Reduzem a formação e a viabilidade de biofilmes de <i>Candida albicans</i>	(HAQUE et al., 2016)
Antibiofilme	Na associação com anfotericina B e fluconazol, os soforolipídeos atuam sinergicamente contra a formação de biofilmes	(HAQUE, 2015)
Antitumoral	Atuam de forma dose dependente em linhagens celulares de câncer colo retal e pulmonar. Embora não discriminem células normais de células transformadas	(CALLAGHAN et al., 2016)
Antitumoral	Apresentam efeitos citotóxicos sobre linhagens de células de câncer hepático	(CHEN, J. et al., 2006)
Antitumoral	Apresentam efeitos citotóxicos sobre linhagens de células de câncer esôfago	(SHAO, L. et al., 2012)
Antitumoral	Apresentam efeitos citotóxicos sobre linhagens de células de câncer pancreático	(FU et al., 2008)
Antitumoral	Apresentam atividade citotóxica contra células K562 – leucemia mielóide crônica	(JING et al., 2015)
Antitumoral	Apresentam atividade citotóxica contra células de câncer cervical	(LI, Hui et al., 2016)
Antitumoral	Apresentam atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas de mama e colo de útero	(DUBEY et al., 2016)
Antimicrobiano	Apresentam atividade antimicrobiana contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Propionibacterium acne</i>	(KIM, K. et al., 2002)
Antiviral e espermicida	Compostos análogos derivados dos soforolipídeos apresentam atividades espermicidas e antivirais (anti-HIV).	(SHAH, Vishal et al., 2005)
Diagnóstico por imagem	Nano partículas com soforolipídeos, magnéticas, esféricas e fluorescentes, podem ser utilizadas em diagnóstico por imagem e aplicações terapêuticas.	(PRABHUNE, A. A. et al., 2015)
Engenharia de tecidos	Promovem o crescimento celular, que pode ser aplicado em suportes na cultura de tecidos (scaffolds), permitindo regeneração de tecidos e tratamento, cicatrização de feridas.	(DUBEY et al., 2016)
Engenharia de tecidos	Suportes de fibroína da seda e soforolipídeos promovem o crescimento de fibroblastos in vitro, onde os soforolipídeos aceleram o processo de gelatinização. Permitindo a produção de hidrogéis funcionais	(DUBEY et al., 2016)
Engenharia de tecidos	Atuam como agente gelatinizante da fibroína, podendo ser utilizada em liberação controlada de fármacos, como suporte em engenharia de tecidos para reparação e regeneração de tecidos e auxiliando na proliferação de fibroblastos	(DUBEY et al., 2015)
Imunomoduladores	Atuam como agentes anti-inflamatórios na terapêutica de doenças relacionadas a alterações na regulação da produção de IgE.	(BLUTH, M H et al., 2006)
Imunomoduladores	Modulam a atividade anti-inflamatória através da diminuição da produção de óxido nítrico e citocinas, reduzindo a mortalidade de cobaias com peritonite séptica	(HARDIN et al., 2007)
Nanopartículas conjugadas	Nanopartículas de ouro conjugadas com gelatina e soforolipídeos, aumentam os efeitos citotóxicos do hidrocloreto de doxorubicina (droga anticancerígena) e a absorção celular	(DHAR et al., 2011)
Sistema de liberação controlada	Posuem capacidade de automontagem formando nanoestruturas com potencial para serem utilizadas como sistema de liberação controlada de fármacos	(JOSHI-NAVARE, Kasturi; PRABHUNE, A. A., 2013)
Sistema de liberação controlada	Juntamente com lecitina e ramnolipídeos formam micro emulsões biocompatíveis, altamente estáveis as mudanças de temperatura e concentrações de eletrólitos	(NGUYEN et al., 2010)

Biorremediação		
Biodegração	Combinação de tratamento bacteriano e soforolipídeos promove uma diminuição nos níveis de pireno e na abundância dos genes de resistência a antibióticos	(SUN, M. <i>et al.</i> , 2015).
Biodegração	Aumenta a biodegradação de óleos lubrificantes em solos contaminados	(MINUCELLI <i>et al.</i> , 2017).
Biodegradação	Aumentam a biodegradação do fenantreno, através do aumento da solubilidade e biodisponibilidade	(SCHIPPERS <i>et al.</i> , 2000)
Detoxificação	Promovem a emulsificação de hidrocarbonetos e detoxificação de metais pesados como cromo, chumbo, zinco, cobre e cádmio	(AHUEKWE <i>et al.</i> , 2016)
Dispersão	Agente dispersante de óleo oriundos de vazamentos no controle da poluição em ambientes marinhos	(FREITAS <i>et al.</i> , 2016).
Lavagem de solos	São eficientes no processo de lavagem de solos contaminados com óleo cru, além de agente potencializador da biodegradação "in situ"	(KANG <i>et al.</i> , 2010)
Lavagem de solos	Promovem a redução de cádmio, antibióticos e genes de resistência a antibióticos além de melhorar a qualidade do solo para novos plantios. Limitando os poluentes residuais em vegetais para o consumo humano	(YE <i>et al.</i> , 2016)
Lavagem de solos	São eficientes na remoção de metais pesados (cobre e zinco), carbonatos e óxidos de zinco de sedimentos através do processo de lavagem	(MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001)
Cosméticos		
Antimicrobiano	Propriedades bactericidas e bacteriostáticas são importantes para o controle de caspa, acne, sudorese e mau odor.	(MAGER; RÖTHLISBERGER; WAGNER, 1986)
Biosolubilizante	Solubilizante para formulações de cosméticos e produtos de higiene pessoal	(ERNENWEIN <i>et al.</i> , 2015)
Cosmecêutico	Atuam como ativador de macrófagos, agente fibrinolítico, descamante e despigmentante	(MAINGAULT, 1999)
Cosmecêutico	Estimula a síntese de leptina nos adipócitos promovendo a redução de gorduras subcutâneas, importante no tratamento da celulite	(PELLECIER; ANDRÉ, 2004)
Cosmecêutico	Promove o metabolismo de fibroblasto e a neossíntese de colágeno, reparando e restaurando o tônus da pele	(BORZEIX, 2000)
Cosmecêutico	Estimula a absorção transdérmica de lactoferrina que leva ao aumento do metabolismo fibroblástico e expressão gênica do gene da tropoelastina (aumentando proliferação celular, síntese de colágeno e síntese de ácido hialurônico)	(ISHII <i>et al.</i> , 2012).
Nanotecnologia		
Formação de nano partículas	Soforolipídeos formam uma ampla variedade de estruturas supramoleculares de automontagem como vesículas, micelas, fibras, bicamadas, lamelas com aplicações nas mais variadas áreas como catálise, biosensores, ótica, farmacêutica, cosmética, etc	(BACCILE <i>et al.</i> , 2016; CUIVIER, A.-S. <i>et al.</i> , 2015; MANET <i>et al.</i> , 2015)
Formação de nano partículas	Atuam como agentes redutores e complexantes na síntese de nano partículas revestidas de metais. Estas nano partículas possuem aplicações em diversas áreas como catálise, biosensores, ótica e biomédica	(KASTURE <i>et al.</i> , 2008)
Petrolífera		
Anticorrosivo	Apresentam efeito inibitório no processo de corrosão do aço carbono XL65 empregado na fabricação de oleodutos e gasodutos, formando filme protetivo na superfície do aço	(ZHANG, Jing <i>et al.</i> , 2015)
Conservação	Auxilia no processo de limpeza de poços de petróleo, gás e água. Torna os processos de manutenção mais seguros, menos tóxicos e ambientalmente corretos	(GUNAWAN; VORDERBRUGGEN; ARMSTRONG, 2015).
Recuperação de petróleo	Podem ser utilizados na recuperação melhorada de petróleo, estimulando a liberação do óleo aprisionado por capilaridade, umedecimento de superfícies e dissolução do petróleo	(ELSHAFIE, A. <i>et al.</i> , 2013; ELSHAFIE, A. E. <i>et al.</i> , 2015)
Recuperação melhorada de petróleo	Remoção e recuperação de óleo das brocas de perfuração utilizadas durante o processo de perfuração e extração	(BAVIERE; DEGOUY; LECOURTIER, 1994)
Recuperação melhorada de petróleo	Recuperação de hidrocarbonetos do sedimento e lama que se formam ao redor dos poços de exploração de petróleo	(PESCE, 2002)
Refino	Utilizados para diminuir a viscosidade de fluidos de hidrocarbonetos durante o refino na indústria petroquímica.	(CAMPBELL, K. B.; WEERS, 2016)

Fonte: o próprio auto (2017)

2.11 PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS

Os sofrorolipídeos podem ser produzidos a partir de uma única fonte de carbono hidrofílica (carboidratos), contudo a produção irá aumentar consideravelmente se uma segunda fonte hidrofóbica de carbono (lipídeos, hidrocarbonetos, óleos vegetais e gorduras animais) for adicionada (ASMER *et al.*, 1988; DAVILA, A.-M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, J.-P., 1997; DAVILA, A. M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, Jean-Paul, 1994). O teor, tipo e proporção das formas acídicas/lactônicas dos sofrorolipídeos produzidos dependem de diversos fatores como: cepa produtora, a composição do meio (fontes de carbono hidrofílicas e hidrofóbicas, fonte de nitrogênio e sais), condições ambientais (temperatura, pH, agitação, aeração e tempo) e o tipo de processo fermentativo empregado (batelada, batelada alimentada ou contínua).

2.11.1 Fontes de Carbono

2.11.1.1 Fontes hidrofílicas

A principal fonte de carbono hidrofílica utilizada na produção de sofrorolipídeos é a glicose (BAJAJ, V.; TILAY; ANNAPURE, U., 2012). A utilização de outras fontes de carbono hidrofílicas não altera a estrutura dos sofrorolipídeos (sefaroose), mas o nível de produção observado é sempre menor (KLEKNER; KOSARIC, N; ZHOU, Q. H., 1991; RIBEIRO, I. A.; BRONZE, Maria R; *et al.*, 2012a). Quando utilizados outros mono ou dissacarídeos estes são metabolizados a glicose e a sefaroose é sintetizada a partir da glicose oriunda da neoglicogenese (GÖBBERT; LANG; WAGNER, 1984). A lactose em particular não pode ser metabolizada pela *Candida bombicola*, impedindo o seu crescimento celular (ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N, 1993). A ausência de capacidade para metabolização da lactose deve-se a ausência de um sistema transportador de lactose e ou da enzima galactosidase (DANIEL, H.-J.; REUSS, Matthias; SYLDATK, Christoph, 1998).

A Tabela 7 mostra as diferentes fontes de carbono utilizadas na produção de sofrorolipídeos (fontes hidrofílicas simples e complexas, hidrofóbicas, subprodutos e resíduos). A utilização de fontes hidrofílicas complexas, quando comparadas a meios sintéticos promovem menores níveis de produção nas mesmas condições experimentais, contudo a

redução do custo do meio utilizando estas fontes complexas pode acabar por contrapor a menor produção obtida.

2.11.1.2 Fontes hidrofóbicas

Assim como as fontes hidrofílicas, diversas fontes hidrofóbicas e subprodutos / resíduos já foram utilizadas na produção de soforolipídeos (Tabela 7). A fonte de carbono hidrofóbica influencia na produção e na composição final da mistura de soforolipídeos, o perfil estrutural mais comum observado, são soforolipídeos com porção hidrofóbica constituída por ácidos graxos C16 e C18. Isto deve-se a a especificidade da enzima CYP52M1 (Citocromo P450 Monooxigenase pertencente família CYP52) que promove a hidroxilação terminal(ω) ou subterminal ($\omega-1$) e posterior ligação covalente a molécula de glicose pela glicosiltransferase.

Tabela 7 - Fontes de carbono utilizadas para a produção de soforolipídeos

Fontes hidrofílicas	
Sacarose, fructose e xilose	(BAJAJ, V.; TILAY; ANNAPURE, U., 2012)
Lactose e galactose	(ZHOU, Q.-H.; KOSARIC, Naim, 1995; ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N, 1993)
Manose, maltose e rafinose	(GÖBBERT; LANG; WAGNER, 1984).
Fontes hidrofílicas complexas	
Melaço de cana de açúcar	(DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009a)
Melaço de soja	(SOLAIMAN et al., 2007)
Soro de leite desproteínizado	(DANIEL, H.-J.; REUSS, Matthias; SYLDATK, Christoph, 1998)
Material lignocelulósico (palha de arroz)	(LIU, X. et al., 2016)
Água de manipueira	(JOHN, U. S.; JOHN, M. C., 2015)
Fontes Hidrofóbicas	
Alcanos (C12, C14, C15, C16, C17, C18 e C20)	(CAVALERO; COOPER, 2003)
Ácidos graxos saturados (C18:0)	(CAVALERO; COOPER, 2003)
Ácidos graxos insaturados (C16:1; C18:1 e C20:4)	(CAVALERO; COOPER, 2003)
Álcoois dodecanodiol, ácido etil-esterdodecanóico, ácido 12-hidroxidodecanoico, 1,12-dodecanodiol	(DAVILA, A. M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, Jean-Paul, 1994)
Triglicerídeos celulares (<i>Cryptococcus curvatus</i>)	(DANIEL, H. J. et al., 1999)
Óleos vegetais como óleo de coco, óleo de milho, óleo de semente de uva, óleo de oliva, óleo de girassol	(CASAS, José A; GARCÍA-OCHOA, 1999)
Óleo de colza, óleo de girassol, óleo de palma	(DAVILA, A. M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, Jean-Paul, 1994)
Óleo de milho turco	(PEKIN, Gülseren; VARDAR-SUKAN; KOSARIC, Naim, 2005)
Óleo de cártamo	(ZHOU, Q. H.; KLEKNER; KOSARIC, Naim, 1992)
Óleo de colza e óleo de soja	(OGAWA; OTA, 2000)
Óleo de ricino	(BAJAJ, V. K.; ANNAPURE, U. S., 2015)
Óleo de Jatrofa	(WADEKAR et al., 2012)
Óleo de coentro	(DELBEKE, E. I. P. et al., 2016)
Subprodutos / resíduos	
Óleo de fritura	(SHAH, Vishal; JURJEVIC; BADIA, 2007)
Óleo escuro de soja	(KIM, Youg-Bum; YUN; KIM, Eun-Ki, 2009)
Água residuária de laticínio	(DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2011)
Resíduo de refinaria de óleo	(BEDNARSKI et al., 2004)
Gorduras animais (sebo de porco)	(DESPANDE; DANIELS, 1995)
Óleo de peixe	(DAVILA, A. M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, Jean-Paul, 1994)
Gordura de frango	(MINUCELLI et al., 2017)
Efluentes lácteos	(VIDHYA, V. et al., 2015).

Fonte: o próprio autor (2017)

A afinidade enzimática por certos substratos depende do seu comprimento absoluto, ácidos graxos com comprimento entre 22,55–25,0 Å, como o ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1) são facilmente incorporados diretamente a estrutura dos soforolipídeos, enquanto que o ácido mirístico (C14:0) ou ácido láurico (C12:0) são ácidos graxos mais curtos que dificultam incorporação direta. A adição de substratos hidroxilados ou adição de substratos com estruturas similares aos ácidos esteárico e oleico facilitam a incorporação direta (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2011; BOGAERT, I. N. A. VAN; ZHANG, Jinxin; SOETAERT, 2011).

Substratos como os alcanos precisam ser convertidos para ácidos graxos através da ω -oxidação, portanto os substratos similares a ácidos graxos são preferidos sobre os substratos parecidos com alcanos como os alquil ésteres (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2008; SAERENS, K. *et al.*, 2009). A produção de soforolipídeos a partir de n-alcanos cresce com o aumento da cadeia na seguinte ordem C18>C16>C14>C12, C16 e C18 são diretamente incorporados, para os mais curtos ocorre um alongamento da cadeia do ácido graxo pela adição de 2, 4 ou 6 carbonos, sendo que também pode ocorrer incorporação direta, mas em uma menor proporção (DAVILA, A. M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, Jean-Paul, 1994). Comparando-se a produção de soforolipídeos a partir de diversos ácidos graxos como fonte de carbono hidrofóbica como o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolênico (C18:3) e eicasonóico (C20:0). O aumento no comprimento da cadeia de ácido até C18 resulta em um significativo aumento na produção de soforolipídeos, uma queda é observada com C20:0 (C18>C16>C20>C14).

O grau de insaturação do ácido graxo adicionado ao meio afeta a produção de soforolipídeos. Ácidos graxos saturados (C18:0), diminuem a produção quando comparados aos monoinsaturados (C18:1). Quando o número de insaturações cresce a produção de soforolipídeos diminui (C18:1 > C18:0 > C18:2 > C18:3) (FELSE *et al.*, 2007).

Substratos hidrofóbicos com cadeia curta (C10 a C14) como ácidos graxos e seus ésteres e álcoois primários não são incorporados diretamente na estrutura dos soforolipídeos mas sim degradados e utilizados pela via de novo para a síntese de ácidos graxos C16 e C18 e posterior incorporação a estrutura dos soforolipídeos. Já álcoois secundários (ω -1 hidroxilados) 2-dodecanol (12C), 2-tetradecanol (14C) e 2-hexadecanol (C16), permitem a incorporação direta e um aumento na produção de soforolipídeos

(BRAKEMEIER *et al.*, 1995; BRAKEMEIER; WULLBRANDT, D; LANG, 1998; BRAKEMEIER; WULLBRANDT, Dieter; LANG, 1998).

A adição de substratos ω -hidroxilados permitem a incorporação direta na estrutura dos sofrorolípídeos independente do comprimento de sua cadeia, já substratos não hidroxilados como ácido dodecanóico (C12) a incorporação direta não ocorre. Substratos com grupamento carboxílico terminal como dodecil glutarato e éster de malonato são substratos com maior grau de incorporação sobre substratos com grupamentos alquil terminal com pentenil dodecanato e dodecil pentanoato (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2011; BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2011).

A produção de sofrorolípídeos a partir de óleos vegetais como canola, girassol e palma é sempre menor se comparada a seus respectivos ésteres, uma vez que os ésteres podem ser facilmente hidrolisados, fornecendo os ácidos graxos precursores e uma fonte de energia, no caso dos óleos a hidrólise dos glicerídeos parece ser uma etapa limitante para a produção de sofrorolípídeos. A produção a partir de óleos vegetais sempre exibem um maior nível de formas lactônicas diacetiladas do que os produzidos a partir de seus ésteres, embora seus ésteres apresentem uma maior taxa de produção. Um maior teor de ácidos graxos poli-insaturados promove a produção de sofrorolípídeos na forma acídica (DAVILA, A. M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, Jean-Paul, 1994).

A adição de substratos hidrofóbicos com cadeias mais longas como metil éster de ácido erúico (C22:0) e óleo de canola enriquecido com metil éster de ácido erúico (54% de ácido docosenóico C22:0 e ácido docosadienóico C22:2) leva a consequente produção de sofrorolípídeos de cadeia mais longa, demonstrando a incorporação direta destes ácidos graxos na estrutura dos sofrorolípídeos. A metil esterificação destes substratos, promove a produção de sofrorolípídeos principalmente na forma acídica (SHIN, J.-D. *et al.*, 2010).

2.11.2 Fontes de Nitrogênio

Os microrganismos produtores de sofrorolípídeos podem metabolizar tanto fontes orgânicas como inorgânicas de nitrogênio. Diversos autores já avaliaram fontes inorgânicas como NH_4NO_3 (MCCAFFREY; COOPER, 1995), NaNO_3 (COOPER; PADDOCK, 1984; RIBEIRO, I. A. C. *et al.*, 2015), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (RAU *et al.*, 2001; RIBEIRO, I. A.; BRONZE, Maria R.; *et al.*, 2012), NH_4Cl (KURTZMAN *et al.*, 2010), fontes orgânicas como extrato de levedura (CASAS,

J.A.; GARCÍA DE LARA; GARCÍA-OCHOA, 1997), extrato de malte, extrato de peptona e peptona de soja (RISPOLI; BADIA; SHAH, Vishal, 2010) para a produção de soforolipídeos. Algumas fontes complexas que contêm nitrogênio além de carbono também foram utilizadas para a produção de soforolipídeos, como extrato de malte (SHAH, S.; PRABHUNE, A. A., 2007) e milhocina (DAVILA, A. M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, Jean-Paul, 1994).

De todas as fontes de nitrogênio avaliadas o extrato de levedura é a melhor fonte de nitrogênio utilizada para a produção de biomassa e produção de soforolipídeos (CASAS, J.A.; GARCÍA DE LARA; GARCÍA-OCHOA, 1997). O extrato de levedura é empregado como fonte de N, vitaminas, elementos traços como zinco, magnésio e ferro. O extrato de levedura possui um efeito linear negativo na produção de soforolipídeos, enquanto que a interação entre glicose e extrato de levedura tem um efeito positivo, pois uma alta concentração de extrato de levedura depleta a fonte de glicose para promover o crescimento do microrganismo. Em baixas concentrações (1 g/L) a produção de soforolipídeos é estimulada (CASAS, J.A.; GARCÍA DE LARA; GARCÍA-OCHOA, 1997; CASAS, José A; GARCÍA-OCHOA, 1999).

Os valores encontrados na literatura para o extrato de levedura são de 1 g/L (BAJAJ, V.; TILAY; ANNAPURE, U., 2012; GARCÍA-OCHOA; CASAS, José A, 1999); 2 g/L (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010); 3 g/L (ZHOU, Q. H.; KLEKNER; KOSARIC, Naim, 1992); 4 g/L (ZHOU, Q.-H.; KOSARIC, Naim, 1995) e 5 g/L (COOPER; PADDOCK, 1984). As variações observadas devem-se as diferentes condições experimentais, diferentes fontes de carbono, como por exemplo fontes de carbono complexas (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010) ou adição de outra fontes de N na forma inorgânica (MCCAFFREY; COOPER, 1995).

A utilização de uréia como única fonte de nitrogênio limita o crescimento celular, pois outros elementos essenciais para o crescimento celular como ácido pantotênico, tiamina, pirodoxina que são fornecidos juntamente com o extrato de levedura, não estão presentes (COOPER; PADDOCK, 1984; ZHOU, Q. H.; KLEKNER; KOSARIC, Naim, 1992). O extrato de levedura pode ser substituído por peptona, mas ocorre um decréscimo na produção de biomassa e conseqüentemente soforolipídeos (COOPER; PADDOCK, 1984). A utilização de peptona suplementada com uréia favorece a produção de biomassa (RIBEIRO, I. A.; BRONZE, Maria R.; *et al.*, 2012).

O extrato de malte apresenta influência positiva para a produção de soforolipídeos, já peptona e extrato de levedura apresentam influência negativa e uréia praticamente não influencia na produção de soforolipídeos. De todas as fontes orgânicas com

exceção do extrato de malte, são fontes com altas proporções Nitrogênio/Carbono, portanto qualquer aumento na concentração destas fontes poderá diminuir a produção de soforolipídeos, já o extrato de malte tem altas proporções de carboidratos diminuindo a relação Nitrogênio/Carbono aumentando a produção de soforolipídeos (RISPOLI; BADIA; SHAH, Vishal, 2010).

A omissão de fontes de nitrogênio como extrato de levedura, utilizando fontes de carbono e nitrogênio combinada como, por exemplo, melaço de soja, uma menor produção é observada, mas justificada pela redução do custo do meio de fermentação (SOLAIMAN et al., 2007). Quando utilizado melaço de cana de açúcar e óleo de soja a produção de soforolipídeos foi maior sem a adição de extrato de levedura, mostrando que é possível de se eliminar fontes de N desnecessárias (extrato de levedura, uréia), com finalidade de diminuir custo e muitas vezes aumentar a produção, dependendo do tipo de substratos utilizados no processo fermentativo (PAKSHIRAJAN; SUMALATHA, 2010).

O tipo de fonte de nitrogênio e a sua concentração influencia na estrutura dos soforolipídeos obtidos e na razão de formas acídicas/lactônicas. Concentrações de extrato de levedura menores que 5 g/L favorece a formação de formas lactônicas e em concentrações mais elevadas as frações acídicas aumentam. Menores concentrações de extrato de levedura e longos tempos de fermentação aumentam os teores de formas lactônicas produzidas, independentemente do método de fermentação utilizado (CASAS, José A; GARCÍA-OCHOA, 1999). A omissão de extrato de levedura e uréia diminuem a produção de formas lactônica (SOLAIMAN et al., 2007), em contraste quando aos produzidos na presença (SOLAIMAN et al., 2004). A produção de formas acídicas diacetiladas são favorecidas pela substituição da uréia pelo NaNO_3 , possivelmente pelo atraso da fase estacionária, pois as formas acídicas são precursoras da formas lactônicas (RIBEIRO, I. A.; BRONZE, Maria R; *et al.*, 2012a).

2.11.3 Sais Minerais

Alguns sais minerais são essenciais para o crescimento e metabolismo microbiano, geralmente os meios de cultura utilizados para a produção de soforolipídeos, quando suplementados com sais minerais contêm KH_2PO_4 , MgSO_4 , MgCl_2 , NaCl and CaCl_2 . Existem poucos estudos que avaliam a influência dos sais na produção de soforolipídeos.

A suplementação do meio com KH_2PO_4 , além da fonte de nitrogênio possui

grande influência na produção de biomassa, já o $MgCl_2$ não influencia a produção de biomassa e soforolipídeos (CASAS, J.A.; GARCÍA DE LARA; GARCÍA-OCHOA, 1997). Para a produção de soforolipídeos K_2HPO_4 é uma melhor fonte de fósforo que o KH_2PO_4 . $CaCl_2$ influencia positivamente e $MgCl_2$ influência negativamente a produção de soforolipídeos (RISPOLI; BADIA; SHAH, Vishal, 2010).

2.11.4 Parâmetros fermentativos – Temperatura

Os processos fermentativos para a produção de soforolipídeos ocorrem na temperatura de 25 a 30°C. A temperatura ótima para a produção de soforolipídeos varia de acordo com as condições experimentais empregadas e estabelecidas pelos diversos autores. Uma das condições experimentais é o método fermentativo empregado, como batelada a 25°C, batelada alimentada a 27°C e bioreator a 30°C (MORYA, V K *et al.*, 2013).

A temperatura ótima para a produção de soforolipídeos por Células em repouso é de 21° C, mas por questões técnicas (tomada de amostras e adição de óleo) a temperatura de 30° C é utilizada (GÖBBERT; LANG; WAGNER, 1984). Para Deshpande e Daniels (1995) o crescimento é máximo a 30° C, mas a produção de soforolipídeos é melhor a 27° C (DESHPANDE; DANIELS, 1995). Davila, Marchal e Vandestateele demonstram que produção de soforolipídeos decresce na seguinte ordem de temperatura 25 > 28,5 > 32,5 > 37,0° C (DAVILA, A.-M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, J.-P., 1997).

2.11.5 Parâmetros fermentativos – pH

O pH desempenha um importante papel na eficiência enzimática e a produção de soforolipídeos pode ser afetada como resultado das diferenças da especificidade enzima-substrato (ASHBY; SOLAIMAN; FOGLIA, T. A., 2008). O crescimento da *Candida bombicola* e produção de soforolipídeos está associada ao uma forte queda de pH. Durante a fase exponencial de crescimento o pH diminui de valores de 6,0 para valores mais ácidos entre 2,6 e 4,0. Esta queda de pH é promovida devido ao consumo da fonte de nitrogênio e geração de ácidos orgânicos (ALBRECHT; RAU; WAGNER, 1996; ASHBY; SOLAIMAN; FOGLIA, T. A., 2008; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009a; RAU; MANZKE; WAGNER, 1996).

Para a produção de soforolipídeos inicialmente o pH inicial deve ser ajustado para valores entre 5,0 e 6,0 para promover o crescimento celular e posterior durante a fase estacionária é controlado através da adição de ácidos ou bases visando manter o pH estável em 3,5 durante a produção de soforolipídeos (DANIEL, H. J. *et al.*, 1999; GÖBBERT; LANG; WAGNER, 1984; HU, Y.; JU, 2001b; MORYA, V K *et al.*, 2013). Embora alguns autores não controlem as condições de pH para a produção de soforolipídeos (ASMER *et al.*, 1988; KLEKNER; KOSARIC, N; ZHOU, Q. H., 1991), a produção sob condições controladas de pH pode promover um aumento de até 27,6% na produção de soforolipídeos (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010).

Os soforolipídeos são produzidos em processos fermentativos muito longos (240 horas de fermentação), mas, a produção em condições ácidas (pH=3,5) e a ação antimicrobiana dos soforolipídeos diminuem a possibilidade de contaminação do meio de fermentação (BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.*, 2007).

2.11.6 Parâmetros fermentativos - Aeração e Oxigenação

O oxigênio é essencial não somente durante a fase exponencial, mas também boas condições de aeração são essenciais para a biossíntese de soforolipídeos, pelo menos por uma enzima envolvida na biossíntese a citocromo P450 monooxigenase que necessita de oxigênio molecular para sua atividade (BOGAERT, I. N. A. VAN; ZHANG, Jinxin; SOETAERT, 2011).

Geralmente altos níveis de oxigenação resultam no aumento da produção de soforolipídeos, este aumento é mais pronunciado quando volumes menores de meio são utilizados, contudo, altos níveis de agitação com baixos volumes de meio, diminuem a formação de soforolipídeos. Portanto, existe uma faixa ótima de oxigenação para a produção de soforolipídeos, que pode ser definida em termos de taxa de transferência de oxigênio. Em batelada alimentada com frascos agitados a aeração ótima está entre 50 e 80 mM O₂.L⁻¹.h⁻¹. (GUILMANOV *et al.*, 2002).

A aeração influencia na estrutura dos soforolipídeos, altos níveis de aeração durante o processo fermentativo, levam a ausência de formas desacetiladas e formação de altas proporções de formas diacetiladas, além de aumentar a fração de formas lactônicas (RATSEP; SHAH, Vishal, 2009). O ajuste nas condições de oxigenação nos períodos iniciais da

produção pode controlar o grau de insaturação do sofrorolípídeo, baixos níveis de oxigenação podem aumentar a proporção de sofrorolípídeos saturados (GUILMANOV et al., 2002).

2.11.7 Parâmetros fermentativos - Processo Fermentativo

O tipo de processo fermentativo (batelada, batelada alimentada, contínuo) influencia na produção de sofrorolípídeos. A produção em batelada em frascos agitados (shake flasks) é utilizada para a produção em pequena escala, ideal para estudos iniciais de produção, com volume de meio inicial de 20% do volume nominal do frasco (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009b; KIM, Youg-Bum; YUN; KIM, Eun-Ki, 2009) ou em larga escala em biorreatores (DANIEL, H. J. *et al.*, 1999; SHAH, Vishal; JURJEVIC; BADIA, 2007).

As maiores produções descritas na literatura são obtidas em biorreator trabalhando-se na forma de batelada alimentada, produções estas de 300 g/L (RAU et al., 2001), 365 g/L (KIM, Youg-Bum; YUN; KIM, Eun-Ki, 2009), 422 g/L (OTTO et al., 1999), e maior que 400 g/L (PEKIN, Gülseren; VARDAR-SUKAN; KOSARIC, Naim, 2005). Casas, García-Ochoa (1999) avaliando a produção por batelada, batelada alimentada e células em repouso observaram que a produção de sofrorolípídeos em biorreator é até seis vezes maiores que a batelada em frascos agitados, fato este principalmente devido a melhor aeração promovida pelo biorreator (CASAS, José A; GARCÍA-OCHOA, 1999).

A adição controlada do substrato hidrofóbico previne o efeito inibitório dos ácidos graxos no crescimento celular e na produção de sofrorolípídeos. Etil ésteres de óleo de canola adicionados ao meio de fermentação aumentou a produção de sofrorolípídeos de 20 g/L para 317 g/L, e também influenciou a mistura de sofrorolípídeos produzidos, ou seja, na distribuição das formas ácidas, lactônicas e no grau de acetilação (DAVILA, A.-M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, J.-P., 1997). A adição de substratos hidrofóbicos em excesso leva a formação de sofrorolípídeos com aspecto viscoso (formas lactônicas) que requerem lavagens adicionais, ao passo que a adição controlada de substrato lipídico produz sofrorolípídeos na forma de precipitados microcristalinos (formas acídicas), relativamente mais simples de coletar e purificar (RAU; MANZKE; WAGNER, 1996).

2.12 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

A imobilização celular compreende a adesão/confinamento de células microbianas viáveis dentro de uma determinada matriz de forma a limitar sua migração preservando suas atividades catalíticas. É um processo que ocorre naturalmente em muitos habitats. A adesão de microrganismos a superfícies e a formação de biofilmes são considerados processos de auto-imobilização e desempenham um importante papel na ecologia microbiana e patogenicidade (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985).

Nos últimos anos aumentou o interesse na imobilização de microrganismos em suportes inertes, uma vez que esta técnica oferece diversas vantagens sobre a fermentação com células livres como: (a) - aumento da produtividade, uma vez que a maior concentração de células microbianas imobilizadas permite uma maior eficiência na síntese de metabólitos; (b) redução de custos de manutenção dos reatores pois não ocorrem problemas de adesão de células aos eletrodos, ductos e sensores; (c) simplifica e reduz custos no processo de “downstream” ; (d) facilita a recuperação das células a reutilização das mesmas; (e) não ocorre o processo de “washout” em processos contínuos; (f) aumento da tolerância para altas concentrações de substratos e redução da inibição devido aos produtos formados; (g) redução dos riscos de contaminação microbiana devida as altas densidades celulares (f) proteção das células contra substâncias tóxicas e ou altas concentrações de substrato presente no meio (DEVI; SRIDHAR, 2000; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; ZHAO, J.; XIA, L., 2010; ZHOU, L. C. *et al.*, 2009).

2.12.1 Tipos de Imobilização Celular

A imobilização celular apresenta algumas desvantagens como: (a) o processo de imobilização pode ser oneroso; (b) existem limitações com relação a transferência de massa (oxigênio, substratos e nutrientes) e (c) pode ocorrer o rompimento da matriz de imobilização devido ao crescimento celular e liberação de gases (CHUNG, T. P.; TSENG; JUANG, 2003; RAZMOVSKI, Radojka; MILANOVIC, 2009; RAZMOVSKI, Radojka; VUČUROVIĆ, Vesna, 2012). Contudo essas limitações podem ser contornadas pela escolha correta do método e suporte de imobilização. O avanço das técnicas de imobilização celular e desenvolvimento de novos tipos de suporte permite que o processo de imobilização celular proteja a célula e

enzimas de condições adversas/extremas de: agitação, pH, temperatura, assepsia, presença de sais, solventes e inibidores. Condições estas que células não immobilizadas não suportariam (CHÁVARRI *et al.*, 2010; LOH; CHUNG, T.-S.; ANG, 2000; VERBELEN *et al.*, 2006). Os métodos de imobilização podem ser divididos em quatro grandes grupos (Figura 10): Imobilização em superfície de suporte, Aprisionamento em matriz porosa, Flocculação celular e Contenção mecânica por barreira.

2.12.1.1 Imobilização em superfície de suporte

A imobilização é realizada pela adsorção física entre as células e o suporte sólido, estando envolvidas forças de baixa energia como forças van der Waals ou interações hidrofóbicas ou iônicas de maior energia como ligações iônicas e covalentes (Figura 10a). A adsorção pode ser induzida por compostos como glutaraldeído, óxidos metálicos. É um método simples, de baixo custo e o suporte pode ser reutilizado. Entretanto pode ocorrer a dessorção das células devido a variações de pH, temperatura e força iônica do meio (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985; KOURKOUTAS *et al.*, 2004). Diversos suportes podem ser utilizados para imobilização como vidro (SILVA, S. S. *et al.*, 2003), bagaço de cana-de-açúcar (SANTOS, J. C. *et al.*, 2005), palha de milho (ZHANG, Y. *et al.*, 2009) e celulose (RAZMOVSKI, R; PEJIN, 1996).

2.12.1.2 Aprisionamento em matriz porosa

O aprisionamento em matriz porosa baseia-se na adição de células dentro de uma malha rígida ou semi-rígida que aprisionam as células impedindo sua difusão para o meio de cultura. Forma-se uma rede ou malha que envolve todas as células, esta malha permite a transferência de massa de metabólitos, nutrientes e gases entre o meio e as células. Existem dois métodos de aprisionamento. No primeiro, as células são difundidas para uma matriz porosa pré-formada, com o crescimento celular as células são efetivamente aprisionadas na matriz. No segundo método, a matriz é formada em torno das células a serem imobilizadas (Figura 10b). AS malhas são formadas através de extrusão ou emulsificação, por temperatura (ágar, agarose e carragenana) ou por ionização (álcool polivinílico, alginato e quitosana (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985; KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

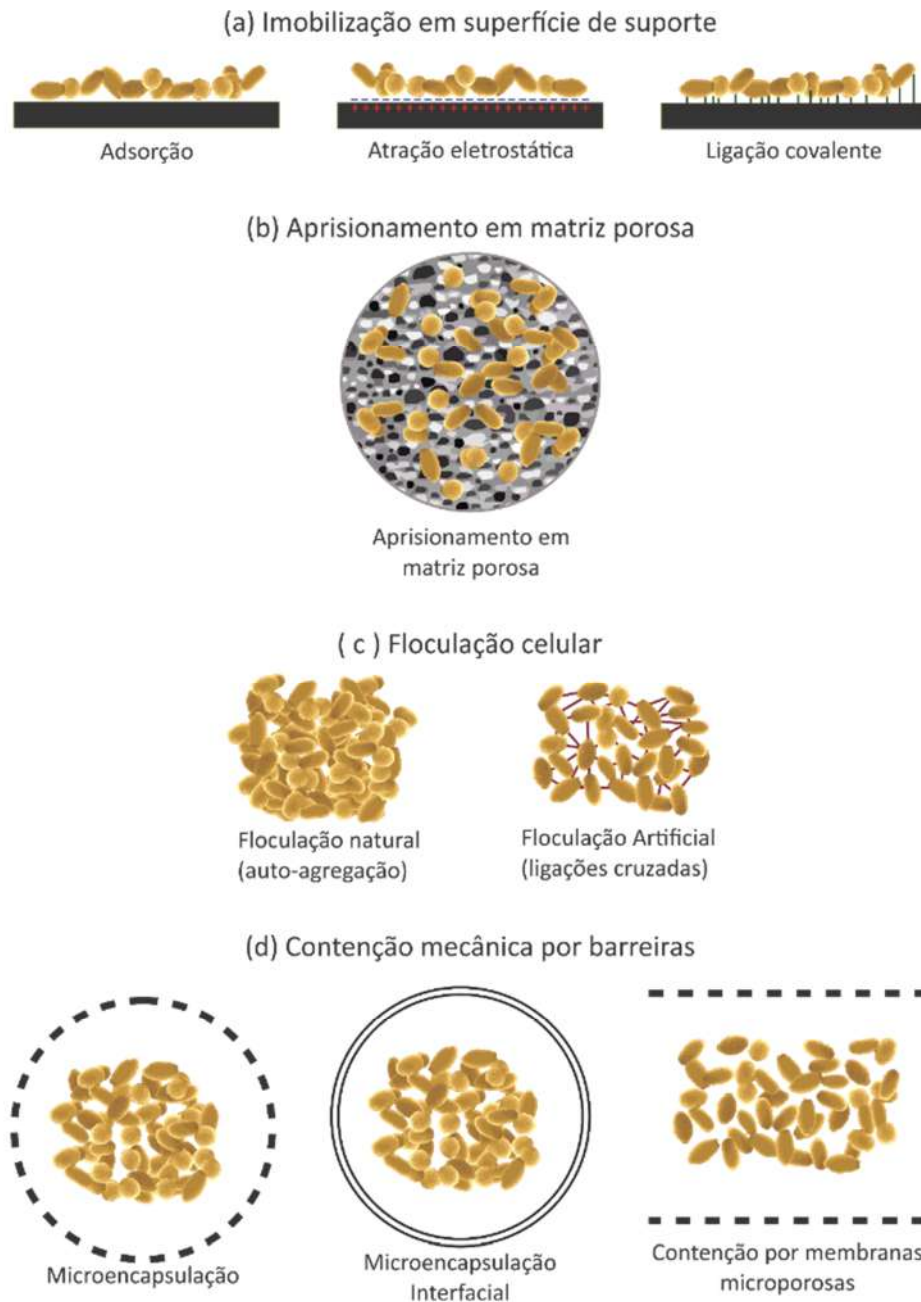
2.12.1.3 Floculação celular

A floculação celular é uma característica intrínseca das células microbianas. As células se agregam e floculam para formar aglomerados ou sedimentos, ligando-se umas as outras sem a necessidade de um suporte. O processo de floculação pode ser natural ou induzido por agentes floculantes ou reticulantes (Figura 10c). Os agregados formados pela floculação tornam possível o seu potencial uso em bioreatores como: bioreatores de leito empacotado, de tanque agitado contínuo e de leito fluidizado. Como não existe um suporte de imobilização a instabilidade e baixa resistência a tensão de cisalhamento são suas principais desvantagens. A floculação celular é utilizada para a produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum* (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2011), de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger* (PAPAGIANNI; MATTEY, 2006) e fabricação de etanol e cerveja pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (HE, L. Y.; ZHAO, X. Q.; BAI, F. W., 2012).

2.12.1.4 Contenção mecânica por barreiras

A contenção mecânica por barreiras é baseada no confinamento da célula entre duas membranas permeáveis. A contenção pode ocorrer através: a) microencapsulação (aprisionamento de células em uma microcápsula), b) microencapsulação interfacial (imobilização de células em uma superfície de dois líquidos imiscíveis) e c) contenção por membranas microporosas (confinamento de células por membranas porosas permeáveis) (Figura 10d). Esta técnica é amplamente utilizada na reciclagem de células e fermentações contínuas. As principais desvantagens da contenção por membranas microporosas são as limitações de transferência de massa e possível obstrução de membrana causada pelo crescimento celular no interior da mesma (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985; KOURKOUTAS et al., 2004).

Figura 10 – Métodos de imobilização celular



Fonte: Adaptado de (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

As características dos suportes utilizados no processo de imobilização celular são de suma importância na determinação do desempenho do sistema imobilizado. As características ideais destes suportes são: material atóxico para as células, resistência a ataques químicos e microbiano, hidrofiliicidade, biocompatibilidade, alta tensão de cisalhamento; seguro e ambientalmente correto; permeável aos substratos e produtos; inerte aos

componentes do meio; insolúvel nas condições do processo fermentativo (BICKERSTAFF, 1999; BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Os suportes podem ser classificados de acordo com sua composição química em orgânicos e inorgânicos. Os suportes orgânicos podem ser divididos em polímeros naturais e sintéticos (Tabela 8).

Tabela 8 - Tipos de suporte para imobilização celular

Orgânicos	
Polímeros naturais	
	Polissacarídeos: celulose, dextrana, ágar, agarose, quitina e alginato
	Proteínas: colágeno e albumina
	Carvão
Polímeros sintéticos	
	Poliestireno
	Outros: polimetacrilato, poliacrilamida, poliamidas e vinil
Inorgânicos	
	Minerais naturais: bentonita e sílica
	Materiais processados: vidro não poroso e poroso, metais e óxidos

Fonte: (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013)

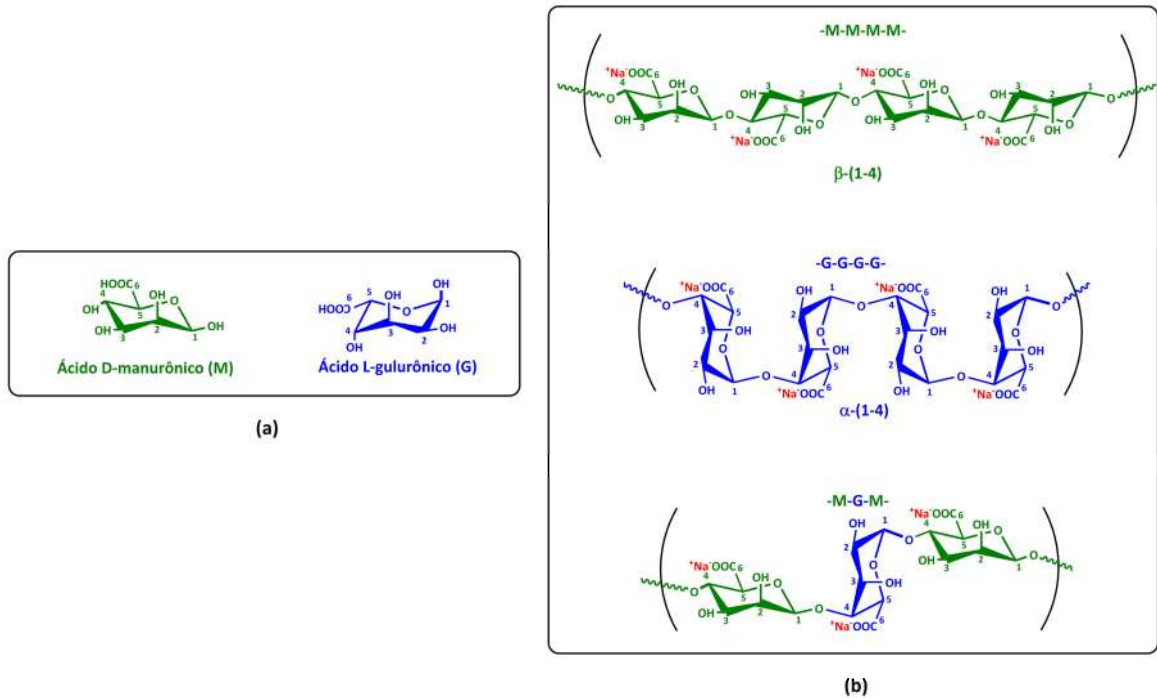
2.12.2 Suporte para imobilização - Alginato de sódio

Dentre as diversas técnicas de imobilização e tipos de suporte existentes, o processo de imobilização celular por aprisionamento em matriz porosa com gel de alginato de cálcio é o mais utilizado devido a sua simplicidade técnica, com uma alta taxa de retenção celular, biocompatibilidade e baixo custo. Como o processo de geleificação ocorre rapidamente na presença de cátions divalentes (cálcio, bário e estrôncio) em condições amenas, a perda da viabilidade e atividade dos microrganismos imobilizados é praticamente inexistente (DUARTE et al., 2013; LEE; MOONEY, 2012; MOHAMAD et al., 2015; SANTOS et al., 2005; THAVASI et al., 2011).

O alginato de sódio (Figura 11) é um heteropolissacarídeo linear constituído por unidades monoméricas de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) (Figura 11a). As unidades de ácido manurônico (M) estão ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e as unidades de ácido gulurônico estão ligadas entre si por ligações do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$. Estes monômeros são arranjados em um padrão de resíduos de blocos M e G, ao longo de uma cadeia com regiões homopoliméricas -G-G-G- ou -M-M-M- intercaladas com regiões heteropoliméricas -M-G-M- (Figura 11b).

A proporção entre cada tipo de cadeia é determinada pela fonte de extração do alginato (principalmente algas marrom) (DRAGET; SKJAKBRAK; SMIDSRÖD, 1994; ROWLEY; MADLAMBAYAN; MOONEY, 1999; SMIDSRÖD; SKJAK-BRAEK, 1990).

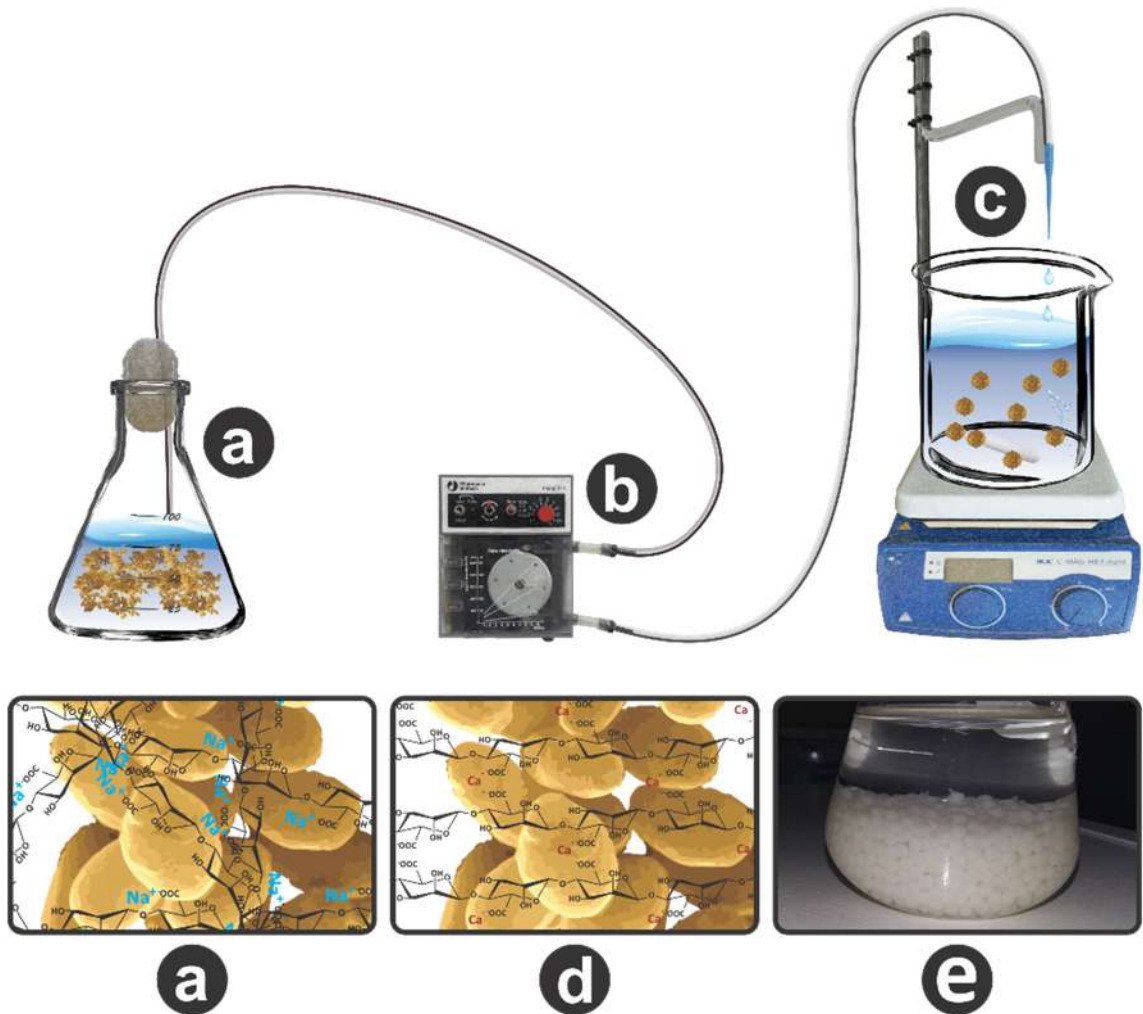
Figura 11 - Estrutura química dos alginatos



Fonte: O próprio autor (2017)

No processo de imobilização celular por aprisionamento em matriz porosa com alginato de cálcio (Figura 12), microrganismos são adicionados a uma solução de alginato de sódio formando uma suspensão (Figura 12a). Através de uma bomba peristáltica ou seringa (Figura 12b) esta suspensão é gotejada sobre uma solução de cátions divalentes, neste caso o Ca^{+2} (Figura 12c). O processo de geleificação ou polimerização ocorre através do deslocamento dos cátions sódio presentes no alginato de sódio por cátions cálcio presentes na solução, este deslocamento leva a formação de ligações iônicas intercadeias (Figura 12d), resultando na formação de esferas de um gel consistente e insolúvel que aprisionam os microrganismos em seu interior (Figura 12e) (PARK, J. K.; CHANG, 2000; SHI *et al.*, 2013). O diâmetro da esfera formada depende de vários fatores como: velocidade do fluxo e densidade da solução de alginato, concentração e microrganismos suspensos em solução, concentração da solução iônica de Ca^{+2} e tempo de polimerização (DRAGET; SKJAKBRAK; SMIDSRÖD, 1994).

Figura 12 - Processo de imobilização celular



Fonte: O próprio autor (2017)

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICATIVA

Todos os processos fermentativos descritos na literatura até o presente momento sobre a produção de soforolipídeos referem-se a fermentação submersa em batelada e batelada alimentada conduzidas em frascos agitados, bioreatores ou fermentação em estado sólido. Não existem relatos sobre o processo de produção de soforolipídeos através de imobilização celular. A proposta de um novo método de produção para os soforolipídeos pode ser um fator a mais a auxiliar na diminuição dos custos de produção.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Considerando-se: as diversas vantagens que os soforolipídeos apresentam sob os surfactantes; o amplo campo de aplicação dos soforolipídeos e os altos custos para a produção dos soforolipídeos. O presente trabalho teve por objetivo principal desenvolver e avaliar produção de soforolipídeos por *Candida bombicola* ATCC® 22214™ através do processo de imobilização celular em alginato de cálcio.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Definir o meio de fermentação inicial para a produção de soforolipídeos;
- Determinar as condições iniciais do processo de imobilização (concentração de alginato de sódio, concentração de células imobilizadas, concentração de cloreto de cálcio, tempo de cura);
- Avaliar o comportamento das células imobilizadas e a produção de soforolipídeos através de curva de produção;
- Determinar os ciclos de reutilização das células imobilizadas;
- Otimizar a produção de soforolipídeos;
- Determinar as estruturas dos soforolipídeos produzidos;
- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura a imobilização celular em esferas de alginato.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO

O microrganismo utilizado para a produção de soforolipídeos foi levedura *Candida bombicola* (ATCC® 22214™), obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (2013). A cepa foi mantida em placas de petri, em meio de manutenção (item 4.3.1), conservadas sobre refrigeração a 4° C e repiques mensais (BAJAJ, V.; TILAY; ANNAPURE, U., 2012; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009a).

4.2 ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS E MATERIAIS

Todos os meios e materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121° C, 1 atm, durante 15 minutos e os procedimentos realizados em câmara de fluxo laminar.

4.3 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.3.1 Meio de Manutenção

O meio de manutenção da cepa continha em g/L: 10 de glicose, 3 de extrato de levedura, 5 de peptona e 20 de ágar, com pH final ajustado para 6,0 +/- 0,2 (BAJAJ, V.; TILAY; ANNAPURE, U., 2012; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009a).

4.3.2 Meio de Obtenção de Inóculo

O meio de obtenção de inóculo continha em g/L: 100 de glicose, 10 de extrato de levedura e 1 de uréia (BAJAJ, V.; TILAY; ANNAPURE, U., 2012; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009a).

4.3.3 Parâmetros do Processo Fermentativo

Todos os ensaios de fermentação foram realizados por batelada simples, em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio, com pH final do meio ajustado para para 6,0 +/- 0,2, incubados em shaker orbital à 200 rpm e temperatura de 30° C.

4.3.4 Reativação das Células e Obtenção do Inóculo

Para a reativação celular, uma 1 alça das células mantidas no meio de preservação (item 4.1) foram inoculadas no meio de obtenção de inóculo (item 4.3.2) e incubadas por 24 horas. Ao final de 24 horas foi realizado um novo repique na proporção de 10% ($V_{da\ reativação\ celular}/V_{do\ meio\ de\ obtenção\ de\ inóculo}$) no meio de obtenção de inóculo (item 4.3.2) e e incubados por 48 horas (ASHBY; SOLAIMAN, 2010).

4.3.5 Biomassa para Imobilização

A biomassa para imobilização foi obtida através da realização de uma fermentação para obtenção do inóculo (item 4.3.4). Ao final de 48 horas a fermentação foi interrompida por centrifugação a 8000 rpm, 4 °C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa lavada com salina 0,9% em condições estéreis, o procedimento de lavagem foi repetido por três vezes. A biomassa úmida obtida foi utilizada no processo de imobilização, na determinação da concentração de células a serem imobilizadas foi utilizado uma curva de correlação entre biomassa seca por biomassa úmida (VILELA *et al.*, 2013).

4.3.6 Preparo das Esferas de Alginato de Cálcio

Para a obtenção das esferas com células imobilizadas, o alginato de sódio, na concentração de 25 g/L foi adicionado lentamente em água deionizada sobre agitação para que não ocorresse a formação de grumos. Após a completa dissolução a solução foi autoclava e deixada em repouso a 4 °C por 24 horas para completa desaeração.

Após as 24 horas, 50 g de células (biomassa úmida) foi adicionada lentamente a solução de alginato de sódio para obtenção de uma suspensão homogênea. Através de uma bomba peristáltica essa suspensão foi gotejada em uma solução de CaCl₂ 0,1 mol/L para que ocorresse a gelatinização. Posteriormente, as esferas foram mantidas em uma solução de CaCl₂ sob agitação a 4° C por 24 horas até completa gelatinização, também denominada de tempo de cura. As esferas com células imobilizadas obtidas foram lavadas 3 vezes com solução salina a 0,9%, para retirada de materiais em suspensão e células não aderidas. (CIANI *et al.*, 2015; RAZMOVSKI, Radojka; MILANOVIC, 2009; RAZMOVSKI, R; VUČUROVIĆ, V., 2011).

4.4 FERMENTAÇÕES

Foram realizadas três tipos de fermentação por batelada simples em frascos agitados: fermentação por células livres, células em repouso e células imobilizadas.

4.4.1 Produção de Soforolipídeos por Células Livres

Os ensaios foram realizados em triplicata no meio de fermentação contendo em g/L: glicose - 100, óleo de girassol - 100 e extrato de levedura 1,0; inóculo de 0,1 g/L e tempo de fermentação de 192 horas. A cada 24 horas de fermentação, os cultivos foram interrompidos (item 4.5) e realizadas as análises do acompanhamento das fermentações (item 4.7).

4.4.2 Produção de Soforolipídeos por Células em repouso

Os ensaios foram realizados em triplica no meio de fermentação contendo em g/L: glicose - 100, óleo de girassol - 100 e extrato de levedura 0,1; inóculo de 5,0 g/L e tempo de fermentação de 192 horas. A cada 24 horas de fermentação, os cultivos foram interrompidos (item 4.5) e realizadas as análises do acompanhamento das fermentações (item 4.7).

4.4.3 Produção de soforolipídeos por Células Imobilizadas

Para o desenvolvimento do processo de imobilização celular de *Candida bombicola* em alginato de cálcio, avaliação da eficiência do processo de imobilização e produção de soforolipídeos foram realizados os seguintes experimentos.

4.4.3.1 Definição do meio de fermentação inicial

No ensaio para a definição do meio de fermentação inicial, manteve-se fixo o valor da concentração de glicose (100 g/L), do óleo de girassol (100 g/L). As concentrações de extrato de leveduras avaliadas foram de 0,0 ([N]=0,0); 0,1 ([N]=0,1); 0,5 ([N]=0,5) e 1,0 g/L ([N]=1,0), os valores do parâmetro avaliado e dos fixados do processo de imobilização são

mostrados na Tabela 9. Os ensaios foram conduzidos em triplicata com tempo de fermentação de 120 horas. Ao final os cultivos foram interrompidos (item 4.5) e realizadas as análises de acompanhamento das fermentações (item 4.7).

Tabela 9 – Parâmetros para o ensaio de definição do meio de fermentação inicial para a produção de sofrorolipídeos por células imobilizadas

Parâmetro avaliado – Meio de Fermentação Inicial		
Ensaio	Concentração de Extrato de Levedura (g/L)	
[N]=0,0	0,0	
[N]=0,1	0,1	
[N]=0,5	0,5	
[N]=1,0	1,0	
Parâmetros Fixados		
Parâmetro	Unidade	Valor
Inóculo	% v/v	10
Concentração de Extrato de Levedura	g/L	Avaliado
Concentração de Células Imobilizadas	g/L	50
Concentração de Alginato de Sódio	g/L	25
Concentração de CaCl ₂	mol/L	0,1
Tempo de Cura	h	24

4.4.3.2 Padronização da concentração de células imobilizadas

Na padronização da concentração de células imobilizadas foram avaliadas as concentrações de 25 ([CEL]=25), 50 ([CEL]=50) e 75 g/L ([CEL]=75) (biomassa (g) / volume de alginato(L)), os valores do parâmetro avaliado e dos fixados do processo de imobilização são mostrados na Tabela 10.

Os ensaios foram conduzidos em triplicata com tempo de fermentação de 120 horas. Ao final os cultivos foram interrompidos (item 4.5) e realizadas as análises de acompanhamento das fermentações (item 4.7).

Tabela 10 – Parâmetros para o ensaio de padronização da concentração de células imobilizadas para a produção de sofrorolipídeos por células imobilizadas

Parâmetro avaliado – Concentração de Células Imobilizadas		
Ensaio	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)	
[CEL]=25	25	
[CEL]=50	50	
[CEL]=75	75	
Parâmetros Fixados		
Parâmetro	Unidade	Valor
Inóculo	% v/v	10
Concentração de Extrato de Levedura	g/L	0,1
Concentração de Células Imobilizadas	g/L	Avaliado
Concentração de Alginato de Sódio	g/L	25
Concentração de CaCl ₂	mol/L	0,1
Tempo de Cura	h	24

4.4.3.3 Padronização da concentração de alginato de sódio

Para a padronização da concentração de alginato de sódio foram avaliadas as concentrações de alginato de sódio de 10 ([ALG]=10), 20 ([ALG]=20), 30 ([ALG]=30), 40 ([ALG]=40) e 50 g/L ([ALG]=50), os valores do parâmetro avaliado e dos fixados do processo de imobilização são mostrados na Tabela 11.

Os ensaios foram conduzidos em triplicata com tempo de fermentação de 120 horas. Ao final os cultivos foram interrompidos (item 4.5) e realizadas as análises de acompanhamento das fermentações (item 4.7).

Tabela 11 – Parâmetros para o ensaio de padronização da concentração de alginato de sódio para a produção de sofrorolípídeos por células imobilizadas

Parâmetro avaliado – Concentração de Alginato de Sódio		
Ensaio	Concentração de Alginato de Sódio (g/L)	
[ALG]=10	10	
[ALG]=20	20	
[ALG]=30	30	
[ALG]=40	40	
[ALG]=50	50	
Parâmetros Fixados		
Parâmetro	Unidade	Valor
Inóculo	% v/v	10
Concentração de Extrato de Levedura	g/L	0,1
Concentração de Células Imobilizadas	g/L	50
Concentração de Alginato de Sódio	g/L	Avaliado
Concentração de CaCl ₂	mol/L	0,1
Tempo de Cura	h	24

4.4.3.4 Padronização da concentração da cloreto de cálcio

As concentrações de cloreto de cálcio avaliadas para o processo de gelificação do alginato de sódio foram de 0,05 (CaCl₂[0,050]), 0,1 (CaCl₂[0,100]), 0,15 (CaCl₂[0,150]) e 0,2 mol/L (CaCl₂[0,200]), os valores do parâmetro avaliado e dos fixados do processo de imobilização são mostrados na Tabela 12. Os ensaios foram conduzidos em triplicata com tempo de fermentação de 120 horas.

Ao final os cultivos foram interrompidos (item 4.5) e realizadas as análises de acompanhamento das fermentações (item 4.7).

Tabela 12 – Parâmetros para o ensaio de padronização da concentração de cloreto de cálcio para a produção de sofrolipídeos por células imobilizadas

Parâmetro avaliado – Concentração de Cloreto de Cálcio		
Ensaio	Concentração de Cloreto de Cálcio (mol/L)	
CaCl ₂ [0,050]	0,050	
CaCl ₂ [0,100]	0,100	
CaCl ₂ [0,150]	0,150	
CaCl ₂ [0,200]	0,200	
Parâmetros Fixados		
Parâmetro	Unidade	Valor
Inóculo	% v/v	10
Concentração de Extrato de Levedura	g/L	0,1
Concentração de Células Imobilizadas	g/L	50
Concentração de Alginato de Sódio	g/L	30
Concentração de CaCl ₂	mol/L	Avaliado
Tempo de Cura	h	24

4.4.3.5 Padronização do tempo de cura do alginato de cálcio

O processo de geleificação do alginato de sódio é promovido pelo cloreto de cálcio através do deslocamento do sódio do alginato de sódio. Este processo é dependente do tempo e conhecido como tempo de cura. Na padronização do tempo de cura avaliou-se os tempos de 1 (TC=1h), 6 (TC=6h), 12 (TC=12h), e 24 horas (TC=24h), os valores do parâmetro avaliado e dos fixados do processo de imobilização são mostrados na Tabela 13.

Os ensaios foram conduzidos em triplicata com tempo de fermentação de 120 horas. Ao final os cultivos foram interrompidos (item 4.5) e realizadas as análises de acompanhamento das fermentações (item 4.7).

Tabela 13 – Parâmetros para o ensaio do tempo de cura do alginato de cálcio para a produção de sofrolipídeos por células imobilizadas

Parâmetro avaliado – Tempo de Cura do Alginato de Cálcio		
Ensaio	Tempo de Cura (horas)	
TC=1h	1	
TC=2h	6	
TC=3h	12	
TC=4h	24	
Parâmetros Fixados		
Parâmetro	Unidade	Valor
Inóculo	% v/v	10
Concentração de Extrato de Levedura	g/L	0,1
Concentração de Células Imobilizadas	g/L	50
Concentração de Alginato de Sódio	g/L	30
Concentração de CaCl ₂	mol/L	0,1
Tempo de Cura	h	Avaliado

4.4.3.6 Cinética da produção de soforolipídeos

Após a avaliação e padronização dos fatores que influenciam no processo de imobilização celular (meio de fermentação inicial, concentração de células imobilizadas, concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura). A produção de soforolipídeos por células imobilizadas foi realizada com o objetivo de avaliar a cinética de produção. Os parâmetros utilizados neste ensaio foram: meio de fermentação contendo em g/L: 100 de glicose, 100 de óleo de girassol e 0,1 de extrato de levedura, inóculo de 10% (volume de esferas/volume do meio de fermentação), concentração de células imobilizadas de 50 g/L, concentração de alginato de sódio de 30 g/L, concentração de cloreto de cálcio de 0,1 g/L, tempo de cura de 24 horas e tempo de fermentação de 192 horas. O experimento foi realizado em triplicata. A cada 24 horas de fermentação, os cultivos foram interrompidos (item 4.5) e realizadas as análises de acompanhamento das fermentações (item 4.7).

4.4.3.7 Otimização da produção de soforolipídeos

A otimização da produção de soforolipídeos por células imobilizadas foi realizada através de um delineamento fatorial fracionado do tipo 3^{4-1} com três repetições no ponto central. Foram otimizadas as concentrações das variáveis glicose, óleo de girassol, K_2HPO_4 e $CaCl_2$. A Tabela 14 mostra o planejamento fatorial com as variáveis com seus valores codificados e decodificados. Os parâmetros utilizados neste ensaio foram: inóculo de 10% (v/v), concentração de células imobilizadas de 50 g/L, concentração de alginato de sódio de 30 g/L, concentração de cloreto de cálcio de 0,1 mol/L, tempo de cura de 24 horas e tempo de fermentação de 96 horas. Ao final os cultivos foram interrompidos (item 4.5) e realizadas as análises de acompanhamento das fermentações (item 4.7).

Tabela 14 – Planejamento fatorial do tipo 3^{4-1} utilizado para a otimização da produção de soforolipídeos por células imobilizadas

Ensaio	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas			
	x_1	x_2	x_3	x_4	Glicose (g/L)	Óleo de Girassol (g/L)	K_2HPO_4 (g/L)	$CaCl_2$ (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	30,00	30,00	1,50	2,50
2	-1	-1	0	1	30,00	30,00	4,50	3,50
3	-1	-1	1	0	30,00	30,00	3,00	4,50
4	-1	0	-1	1	30,00	65,00	1,50	4,50
5	-1	0	0	0	30,00	65,00	3,00	3,50
6	-1	0	1	-1	30,00	65,00	4,50	2,50
7	-1	1	-1	0	30,00	100,00	1,50	3,50
8	-1	1	0	-1	30,00	100,00	3,00	2,50
9	-1	1	1	1	30,00	100,00	4,50	4,50
10	0	-1	-1	1	65,00	30,00	1,50	4,50
11	0	-1	0	0	65,00	30,00	3,00	3,50
12	0	-1	1	-1	65,00	30,00	4,50	2,50
13	0	0	-1	0	65,00	65,00	1,50	3,50
14	0	0	0	-1	65,00	65,00	3,00	2,50
15	0	0	1	1	65,00	65,00	4,50	4,50
16	0	1	-1	-1	65,00	100,00	1,50	2,50
17	0	1	0	1	65,00	100,00	3,00	4,50
18	0	1	1	0	65,00	100,00	4,50	3,50
19	1	-1	-1	0	100,00	30,00	1,50	3,50
20	1	-1	0	-1	100,00	30,00	3,00	2,50
21	1	-1	1	1	100,00	30,00	4,50	4,50
22	1	0	-1	-1	100,00	65,00	1,50	2,50
23	1	0	0	1	100,00	65,00	3,00	4,50
24	1	0	1	0	100,00	65,00	4,50	3,50
25	1	1	-1	1	100,00	100,00	1,50	4,50
26	1	1	0	0	100,00	100,00	3,00	3,50
27	1	1	1	-1	100,00	100,00	4,50	2,50
28	0	0	0	0	65,00	65,00	3,00	3,50
29	0	0	0	0	65,00	65,00	3,00	3,50
30	0	0	0	0	65,00	65,00	3,00	3,50

4.4.3.8 Avaliação dos ciclos de reutilização de células imobilizadas

Após a otimização da produção de soforolipídeos foi avaliado o número de ciclos de reutilização das células imobilizadas. Os parâmetros do processo fermentativo utilizados neste ensaio foram: meio de fermentação em g/L (30 de glicose, 30 de óleo, 4,5 de K_2HPO_4 e 4,5 de $CaCl_2$); inóculo de 10% (v/v), concentração de células imobilizadas de 50 g/L, concentração de alginato de sódio de 30 g/L, concentração de cloreto de cálcio de 0,1 mol/L, tempo de cura de 24 horas e tempo de fermentação de 96 horas.

Ao final de cada ciclo de 96 horas as esferas com células imobilizadas eram coletadas em peneira, lavadas 3 vezes com solução salina estéril e transferidas para um novo meio de fermentação e incubadas novamente para um próximo ciclo de reutilização. O sobrenadante do meio de fermentação sem as esferas imobilizadas foi centrifugado (item 4.5) e realizadas as análises de acompanhamento das fermentações (item 4.7).

4.4.3.9 Produção de soforolipídeos nas condições otimizadas

Foi realizada uma fermentação utilizando as condições otimizadas para a produção de soforolipídeos. Os parâmetros do processo fermentativo utilizados neste ensaio foram: meio de fermentação em g/L (30 de glicose, 30 de óleo, 4,5 de K_2HPO_4 e 4,5 de $CaCl_2$; inóculo de 10% (v/v); concentração de células imobilizadas de 50 g/L; concentração de alginato de sódio de 30 g/L; concentração de cloreto de cálcio de 0,1 mol/L; tempo de cura de 24 horas e tempo de fermentação de 96 horas.

No início da fermentação (tempo 0 horas) e no final da fermentação (tempo 96 horas) foram selecionadas 30 esferas com células imobilizadas para caracterização física das esferas com células imobilizadas por microscopia eletrônica de varredura (item 4.8). Os soforolipídeos extraídos desta fermentação foram utilizados para a caracterização estrutural (item 4.9).

4.5 INTERRUPÇÃO DOS CULTIVOS

Ao final das fermentações as esferas foram coletadas com peneira e submetidas a dissolução com citrato de sódio 0,5M por 30 minutos, as células foram recuperadas por centrifugação a 8000 rpm 4° C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi quantificada e denominada de biomassa imobilizada (X_i) (item 4.7.6.2) (PEREIRA *et al.*, 2014). O meio sem as esferas foi centrifugado a 8000 rpm 4° C por 10 minutos. A biomassa obtida foi quantificada e denominada de biomassa livre (X_f) (item 4.7.6.1). Antes do sobrenadante ser submetido a extração dos soforolipídeos e óleos residuais (item 4.6) retirou-se uma alíquota de 1000 uL para dosagens de açúcares totais (item 4.7.2)

4.6 EXTRAÇÃO DOS SOFOROLIPÍDEOS E ÓLEOS RESIDUAIS

O sobrenadante obtido da interrupção do cultivo (item 4.5) foi adicionado ao funil de separação e submetido a três extrações com 25 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi transferida para balão de fundo redondo e rotoevaporado a 50° C, 510 mmHg. Após rotaevaporação, o balão contendo os soforolipídeos e o óleo residual foi lavado com 25 mL de metanol:H₂O 4:1 e 25 mL de hexano. As duas fases foram separadas em funil de separação e transferidos para cadinhos de alumínio previamente tarados e secos a 60 °C até

peso constante, para a determinação gravimétrica dos sofrorolipídeos e óleos residuais respectivamente (LANGER *et al.*, 2006; PALME *et al.*, 2010; SAMAD *et al.*, 2014).

4.7 ACOMPANHAMENTO DAS FERMENTAÇÕES

4.7.1 pH

Os pHs dos reagentes, meios e fermentações foram determinados através de análise potenciométrica. Dois parâmetros analíticos cinéticos são derivados da determinação do pH, o pH_i = pH Inicial do meio de fermentação e o pH_f = pH final do meio de fermentação .

4.7.2 Consumo de Açúcares (S_a)

Os açúcares totais presentes no sobrenadante (item 4.5) foram dosados pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). O Consumo de Açúcares (S_a expresso em g/L) foi calculado através da diferença entre a concentração de açúcares totais inicial e a concentração de açúcares totais residuais.

4.7.3 Consumo de Óleo de Girassol (S_o)

A quantificação do óleo residual foi realizada por análise gravimétrica da fase do hexano do processo de extração (item 4.6) (LANGER *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2014; SAMAD *et al.*, 2014). Através da diferença entre a concentração de óleo inicial e a de óleo residual foi calculado o Consumo de Óleo de Girassol (S_o expresso em g/L).

4.7.4 Consumo de Carbono Total (S_T)

A quantificação do consumo de carbono total (S_T , g/L) foi calculada através da soma do consumo de açúcares S_a (item 3.7.2) e consumo de óleo de girassol S_o (item 4.7.3) (Equação 1) (FELSE *et al.*, 2007; SHAH, Vishal; JURJEVIC; BADIA, 2007).

$$S_T = S_g + S_o \quad (\text{Equação 1})$$

4.7.5 Quantificação dos Soforolipídeos(P)

A produção de sofrorolipídeos (P, g/L) foi obtida por análise gravimétrica da fase metanol:H₂O obtida no processo de extração (item 4.6) (LANGER et al., 2006; PEREIRA et al., 2014; SAMAD et al., 2014).

4.7.6 Quantificação da Biomassa

As biomassas obtidas da interrupção dos cultivos (item 4.5) foram transferidas para cadinhos de alumínio previamente tarados e secas em estufa a 105 ° C até peso constante e quantificadas por gravimetria.

4.7.6.1 Biomassa livre (X_f)

A biomassa livre (X_f , g/L) foi calculada através da razão da massa de células livres no meio de fermentação (X_f) (item 4.5 e 4.7.6.1) pelo volume do meio de fermentação em litros (L) (SANTOS, DIEGO T. *et al.*, 2008; VUCUROVIC; RAZMOVSKI, 2012;).

$$X_f = \frac{X_{fm}}{V} \quad (\text{Equação 2})$$

4.7.6.2 Biomassa imobilizada (X_i)

A biomassa imobilizada (X_i , g/L) foi calculada através da razão da massa de células imobilizadas no alginato (X_i) (item 4.5 e 4.7.6.2) pelo volume do meio de fermentação (L) (SANTOS, D. T. *et al.*, 2008; VUCUROVIC; RAZMOVSKI, R. N., 2012; YU, J.; ZHANG, Xu; TAN, T., 2007)

$$X_i = \frac{X_{im}}{V} \quad (\text{Equação 3})$$

4.7.6.3 Biomassa total (X_t)

A biomassa total (X_t , g/L): foi calculada através da soma da concentração de células livres X_f (item 4.7.6.1) com a concentração de células imobilizadas X_i (item 4.7.6.2) (SANTOS, D. T. *et al.*, 2008; VUCUROVIC; RAZMOVSKI, R. N., 2012).

$$X_t = X_f + X_i \quad (\text{Equação 4})$$

4.7.7 Retenção de Células no Suporte (R)

A Retenção de Células (R, g/g) foi calculada através da razão da biomassa imobilizada (X_i) (item 4.7.6.2) pela massa seca do alginato utilizada na imobilização (M_{alg} , g) (SANTOS, D. T. *et al.*, 2008; VUCUROUROVIC; RAZMOVSKI, R. N., 2012; YU, J.; ZHANG, Xu; TAN, T., 2007)

$$R = \frac{X_{im}}{M_{alg}} \quad (\text{Equação 5})$$

4.7.8 Fuga de Células (X_s)

A fuga de células (X_s , %) foi calculada através da razão da biomassa livre (X_f , g/L) (item 4.7.6.1) pela biomassa total (X_t , g/L) (item 4.7.6.3) multiplicado por 100 (SANTOS, D. T. *et al.*, 2008; VUCUROUROVIC; RAZMOVSKI, R. N., 2012; YU, J.; ZHANG, Xu; TAN, T., 2007).

$$X_s = \left(\frac{X_f}{X_t} \right) * 100 \quad (\text{Equação 6})$$

4.7.9 Eficiência de Imobilização (Y_i)

A eficiência de imobilização (Y_i , %) foi calculada através da razão da biomassa imobilizada (X_i , g/L) (item 4.7.6.2) pela biomassa total (X_t , g/L) (item 4.7.6.3) multiplicado por 100 (SANTOS, D. T. *et al.*, 2008; VUCUROUROVIC; RAZMOVSKI, R. N., 2012; YU, J.; ZHANG, Xu; TAN, T., 2007).

$$Y_i = \left(\frac{X_i}{X_t} \right) * 100 \quad (\text{Equação 7})$$

4.7.10 Rendimento da Produção $Y_{P/S}$

O rendimento da produção ou fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$ g%/g) foi calculado através da razão da produção de soforolipídeos (P, g/L) (item 4.7.5) pelo consumo de carbono total (S_T , g/L) (item 4.7.4) (DAVILA, A. M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, Jean-Paul, 1994; ELSE *et al.*, 2007; SHAH, Vishal; JURJEVIC; BADIA, 2007).

$$Y_{P/S} = \frac{P_{SOF}}{S_T} \quad (\text{Equação 8})$$

4.7.11 Produtividade Volumétrica (Q)

A produtividade volumétrica (Q, g/L.d) foi calculada através da razão entre a produção de soforolipídeos (P, g/L) (item 4.7.5) pelo volume do meio (L) e tempo de fermentação em dias (t) (DAVILA, A. M.; MARCHAL; VANDECASTEELE, Jean-Paul, 1994; ELSE *et al.*, 2007; SHAH, Vishal; JURJEVIC; BADIA, 2007).

$$Q_{SOF} = \frac{P_{SOF}}{V * t} \quad (\text{Equação 9})$$

4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O processo de imobilização celular foi avaliado através de Microscopia Eletrônica de Varredura. As esferas caracterizadas foram as obtidas da fermentação descrita no item 4.4.3.9 - produção de soforolipídeos nas condições otimizadas. As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no LMEM-Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (UEL). A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em células livres de *Candida bombicola*, esferas integras com as células imobilizadas e esferas fraturadas com nitrogênio líquido. As células livres foram submetidas a tratamento com polilisina por 2 horas para aderência das células a lamínula. Posteriormente as lamínulas, as esferas integras e fraturadas foram fixadas por 6 horas com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0% e tampão cacodilato de sódio a 0,2 mol/L. Posteriormente foram lavadas 3 vezes com tampão cacodilato 0,1M por 15 minutos, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% por uma hora,

lavadas 3 vezes novamente com tampão cacodilato 0,1M e desidratadas com álcool etílico a 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por 10 minutos cada.

Após a desidratação, as amostras foram secas por ponto crítico no equipamento BAL-TEC CPD 030 utilizando CO₂ como agente de troca. Após a secagem as amostras foram montadas com fitas de carbono dupla face no suporte de amostras do MEV (“stubs”). Após a montagem, os stubs foram metalizados com ouro por deposição através do sistema de evaporação (“sputtering”) no equipamento Bal-Tec SCD 050 operando com uma pressão de vácuo de 10-15 mmbar, temperatura de 20° C, com uma corrente de 40 mA e tempo de 158 segundos. Ao final do processo as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura no equipamento FEI Quanta 200 (NAJAFPOUR; YOUNESI; SYAHIDAH KU ISMAIL, 2004; SINGH, B.; SATYANARAYANA, 2008; YANG, X. *et al.*, 2012) .

4.9 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS SOFOROLÍPÍDEOS

Os soforolípídeos obtidos nas fermentações por células livres (item 4.4.1), por células em repouso (item 4.4.2) e por células imobilizadas (item 4.4.3.9), após a sua quantificação (item 4.7.5) foram resuspensas novamente em 25 mL de acetato de etila e filtradas com filtro de 20 microns, o filtrado obtido foi seco em estufa 60 °C por 72 horas e liofilizado e utilizado na caracterização estrutural dos soforolípídeos. A caracterização e determinação estrutural dos soforolípídeos produzidos foram realizadas por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (item 4.9.1), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (item 4.9.2) e Espectrometria de Massas (MS) (item 4.9.3).

4.9.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais dos soforolípídeos por FTIR foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UEL - RMN-UEL, no espectrômetro IR Prestige 21 (Shimadzu) equipado com o software OriginPro 8.0. Para as análises 1 mg do soforolípídeo foi misturado com 100 mg de brometo de potássio e pressurizados a 7.500 Kg por 30 segundos para obtenção de pastilhas translúcidas. As leituras foram conduzidas em transmitância, sistema com resolução de 2 cm⁻¹, faixa de 400-4000 cm⁻¹ com 500 scans (CHANDRAN; DAS, 2011).

4.9.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UEL - RMN-UEL, no Espectrômetro de RMN Bruker Mod. Avance III operando a 400 MHz para ^1H equipado com sonda multinuclear inversa (BBI) de 5 mm. As amostras dos sofrólipídeos foram analisadas pelos métodos ^1H , ^{13}C e HSQC. O sistema de solvente foi $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (Clorofórmio deuterado/Metanol deuterado) e o espectro foi expresso por ppm a partir do padrão de referência interno (SMYTH *et al.*, 2010).

4.9.3 Espectrometria de Massa (MS)

A caracterização estrutural foi realizada no Laboratório de Materiais e Moléculas-LAMM/UEL, no Espectrometro de Massas com Analisador Híbrido Quadrupolo-Tempo de Voô – Bruker (Cologne Alemanha) – Modelo Compact Triple-Quadrupole ESI-OTFO II. As amostras de sofrólipídeos foram diluídas com metanol grau MS e submetidas a análise por injeção direta. Os parâmetros para a espectroscopia de massa foram: ionização negativa por eletrospray, fluxo de injeção de 5 μL por minuto, faixa de relação massa/carga 50 a 2000 m/z , voltagem de 4,5kV, temperatura do capilar ajustada para 250°C e o fluxo do gás de desolvatação ajustado para 50 L/h e nebulizador a 2 bar (RIBEIRO, I. A.; BRONZE, Maria R; *et al.*, 2012b; RIBEIRO, I. A.; BRONZE, Maria R.; *et al.*, 2012; SMYTH *et al.*, 2010).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os delineamentos e as análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas através do software STATISTICA For Windos Versão 10.0 (STATSOFT, 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho são apresentados na forma de:

5.1) Artigo de revisão - Publicado

“Biosynthesis and Production of Sophorolipids”

5.2) Artigo de revisão - Publicado

“Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it’s Applications”

5.3) Artigo para Submissão

“ Produção de soforolipídeos por células imobilizadas de *Candida bombicola* ATTCC[®] 22214[™] em alginato de cálcio”

Revista: Biosource Technology

<https://www.journals.elsevier.com/bioresource-technology>

Fator de Impacto: 5.661 – Qualis: A1.

5.4) Patente

“Microencapsulação celular por alginato de sódio de leveduras do gênero *Candida* para a produção de soforolipídeos”

5.5) Elaboração de artigo

A partir dos resultados complementares apresentados no Apêndice A, será elaborado o artigo: “Comparação estrutural dos soforolipídeos produzidos por batelada células livres, células em repouso e células imobilizadas”

Revista: Bioengineered

<http://www.tandfonline.com/toc/kbie20/current>

Fator de Impacto: 1,87 – Qualis: B2.

5.1 ARTIGO PUBLICADO - BIOSYNTHESIS AND PRODUCTION OF SOPHOROLIPIDS

OLIVEIRA, M. R. *et al.* Biosynthesis and Production of Sophorolipids. **International Journal of Scientific & Technology Research**, 2014. v. 3, n. 11, p. 133–143.

Disponível em: <http://www.ijstr.org/final-print/nov2014/Biosynthesis-And-Production-Of-Sophorolipids.pdf>

Biosynthesis and Production of Sophorolipids

Marcos Roberto de Oliveira, Doumit Camillos-Neto, Cristiani Baldo, Agnes Magri, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Abstract— Sophorolipids are biosurfactants belonging to the class of the glycolipid, produced mainly by the osmophilic yeast *Candida bombicola*. Structurally they are composed by a disaccharide sophorose (2'-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glycopyranose) which is linked β -glycosidically to a long fatty acid chain with generally 16 to 18 atoms of carbon with one or more unsaturation. They are produced as a complex mix containing up to 40 molecules and associated isomers, depending on the species which produces it, the substrate used and the culture conditions. They present properties which are very similar or superior to the synthetic surfactants and other biosurfactants with the advantage of presenting low toxicity, higher biodegradability, better environmental compatibility, high selectivity and specific activity in a broad range of temperature, pH and salinity conditions. Its biological activities are directly related with its chemical structure. Sophorolipids possess a great potential for application in areas such as: food; bioremediation; cosmetics; pharmaceutical; biomedicine; nanotechnology and enhanced oil recovery.

Index Terms — biosurfactants, glycolipid, sophorolipids, sophorose, yeast, *Starmarella bombicola*, *Candida bombicola*.

1 INTRODUCTION

The sophorolipids (SLP) are biosurfactants belonging to the glycolipids class, produced by many non-pathogenic yeasts, being the yeast *Candida bombicola* the most important. Structurally they are composed by a disaccharide sophorose (2'-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glycopyranose) linked by a β -glycosidic bond to a long fatty acid chain [1], [2].

The SLP are one of the most promising known biosurfactants and offers several advantages over the synthetic surfactants such as: high selectivity and specific activity in a broad range of temperature, pH and salinity conditions [3], low toxicity, high biodegradability and ecological acceptance [4], [5], and they may be produced in great amounts [6]. They possess a low capacity of foam formation and high detergency which facilitates its application in several areas [7], and they may be produced from renewable resources [8] or industrial residues [9] and are of easy recovery [10].

SLP can be applied in several areas such as: - agriculture (fungicide [11]); - food (anti-freezing [12], preservative [13]); - biomedicine (anti-tumor [14], anti-microbial [15], anti-viral and spermicide [16], immunomodulator [17]); - bioremediation (soil remediation [18], removal of heavy metals [19]); - cosmetics (dermatological applications [20], [21]); - nanotechnology (formation of nanoparticles [22], nanoparticles conjugated to drugs [23]) and oil (enhanced oil recovery [24]).

In spite of the numerous applications which the SLP possess, the larger-scale production and the high cost are still great obstacles for its economic competitiveness. The high cost of production is mainly due to the synthetic culture medium and the downstream process which may come to represent 60% of the total cost of the fermentative process

[25]. To overcome the obstacles of high production costs, two basic strategies may be used: (a) the use of low cost substrates for the formulation of the culture medium, (b) development of efficient and optimized bioprocesses of the culture conditions and recovery (high production with maximum recovery) [26], [27].

2 PRODUCER MICROORGANISMS

Several microorganisms have already been reported as producers of SLP. Gorin, Spencer and Tulloch (1961) [1] isolated from sow thistle petals the osmophilic yeast *Torulopsis magnoliae* which produced an extracellular glycolipid with an oily aspect, which has been identified as being composed by unities of a disaccharide sophorose (2'-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glycopyranose) partially acetylated, linked by a β -glycosidic bond to 17-L-hydroxyoctadecanoic and 17-L-hydroxy-9-octadecanoic acids [1].

In 1967, another species of yeast *Torulopsis gropengiesseri* was described by Jones [28] as a producer of extracellular glycolipids, not in the form of oil (acidic form) as described by Gorin, Spencer and Tulloch [1], but in the crystal form (lactonic form) where the sophorose was part of a macrocyclic ring. Tulloch and Spencer, in 1968 [29] reclassified the yeast *Torulopsis magnoliae* as *Torulopsis apicola*. Nowadays, the *Torulopsis apicola* is classified and *Candida apicola*, once that the genus *Torulopsis* has become obsolete and is now classified under the genus *Candida* [30]. Also in 1968 Tulloch, Spencer and Deinema [31] have identified a new SLP producing yeast called *Candida bogoriensis* isolated from the leaf surface of the shrub (*Randia malleifera*), nowadays this yeast is known and *Rhodotorula bogoriensis*. Spencer, Gorin and Tulloch, in 1970 [32] have identified in several nectar samples collected from wild flowers from different regions in Canada, a SLP producing yeast identified as *Torulopsis bombicola*, nowadays known as *Candida bombicola*.

In 1983 Cooper and Padock [33] showed that the yeast *Torulopsis petrophilium*, isolated as a microorganism which degrades fractions of crude oil is capable of producing glycolipids identical to the ones of *Torulopsis bombicola*. Another yeast *Wickerhamiella domercqiae* Y2A, isolated from effluents contaminated with oil, was identified by Chen and colleagues (2006) [34], as a producer of SLP. In 2008 a strain

- Marcos Roberto de Oliveira, Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, State University of Londrina, and Federal Technological University of Paraná, Londrina, Paraná, Brazil. E-mail: marcosroberto@utfpr.edu.br
- Doumit Camillos-Neto, Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, State University of Londrina, Paraná, Brazil.
- Cristiani Baldo, Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, State University of Londrina, Paraná, Brazil.
- Agnes Magri, Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, State University of Londrina, Paraná, Brazil.
- Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, State University of Londrina, Paraná, Brazil. E-mail: macelligoi@uel.br

of a thermo-tolerant yeast *Pichia anomala* PY1, was isolated from "Khao Mhak" (Thai fermented food) and described as a producer of SLP [35]. Konishi and colleagues, in 2008 [36], through of screening based on the phylogenetic information of a known SLP producer, described the yeast *Candida batistae* CBS 8550 as a producer of SLP. Imura and colleagues in 2010 [37] reported the production of SLP by yeast *Candida floricola* TM 1502. Kurtzman and colleagues (2010) [38] identified three more SLP producing species *Candida riidocensis*, *Candida stellata* and *Candida* sp. NRRL Y 27208. Kurtzman (2012) [39] reports that the *Candida* sp NRRL Y-27208 strain represents a new species *Candida kuoi*.

Chandran and Das (2011) [4] isolated from hydrocarbon contaminated sites in India, two SLP producing yeasts *Candida rugosa* and *Rhodotorula muciliginosa*. The same authors in 2012 [3] also isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil in India a new species of yeast which is an efficient degrading of diesel as well as a powerful SLP producer in the presence of diesel, the species was identified as *Candida tropicalis*. Poomtien and colleagues in 2013 [41] isolated from cosmetic industrial wastes in Thailand the yeast *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 an efficient SLP producing. Basak and colleagues (2013) [42] isolated from common effluent treatment plant in India, the yeast *Cryptococcus* sp. VITGBN2 a potent producer of SLP.

2.1 *Candida bombicola* ATCC 22214

Candida bombicola ATCC 22214 is the most widely used SLP producing yeast, being initially identified through biochemical tests as belonging to the genus *Torulopsis*. The name *Torulopsis bombicola* is proposed because of its frequent occurrence in close association with bumble bees [32]. In 1998, based in phylogenetic analysis, the creation of the genus *Starmerella* was proposed to accommodate the teleomorphic state (sexual stage) of the *Candida bombicola*. The name *Starmerella* was given to the genus in honor to William T. Starmer, in recognition to its contribution to ecology and evolution of yeasts associated to plants and insects [43].

Nowadays the genus *Starmerella* contains approximately 30 species of yeast, most known by being associated to bees, nectar, pollen, or to its habitats and related substrates. The species belonging to the genus *Starmerella* as *Candida magnoliae*, *Candida bombicola* and *Candida batistae* seem to be involved in mutualistic relations with bees. Physiologically similar to most yeasts of the genus *Starmerella*, are fermentative microorganisms which use few carbon sources, are osmotolerant, which points out relative specialization to the common niche and the possible association with nectar as its main habitats [43], [44]. Despite the *Candida bombicola* yeast carrying the name of the genus *Candida*, it finds itself phylogenetically far from the pathogenic yeasts, like *Candida albicans* [45]. Furthermore, *Starmerella bombicola* / *Candida bombicola* is included in microorganism with technological beneficial use having frameworks as "the history of use", "traditional food" or "general recognition of safety" [46].

3 STRUCTURES OF THE SOPHOROLIPIDS

The SLP are amphipathic or amphiphilic molecules formed by a hydrophilic moiety and a hydrophobic moiety. The hydrophilic moiety is composed of a sophorose disaccharide (2'-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glycopyranose) linked to a hydrophobic moiety composed of a long chain of fatty acid linked by a glycosidic bond. The β -glycosidic bond occurs between the anomeric carbon of the sophorose (C1') and the ω carbon (terminal) or ω -1 (sub-terminal) hydroxylated from the fatty acid [2], [29].

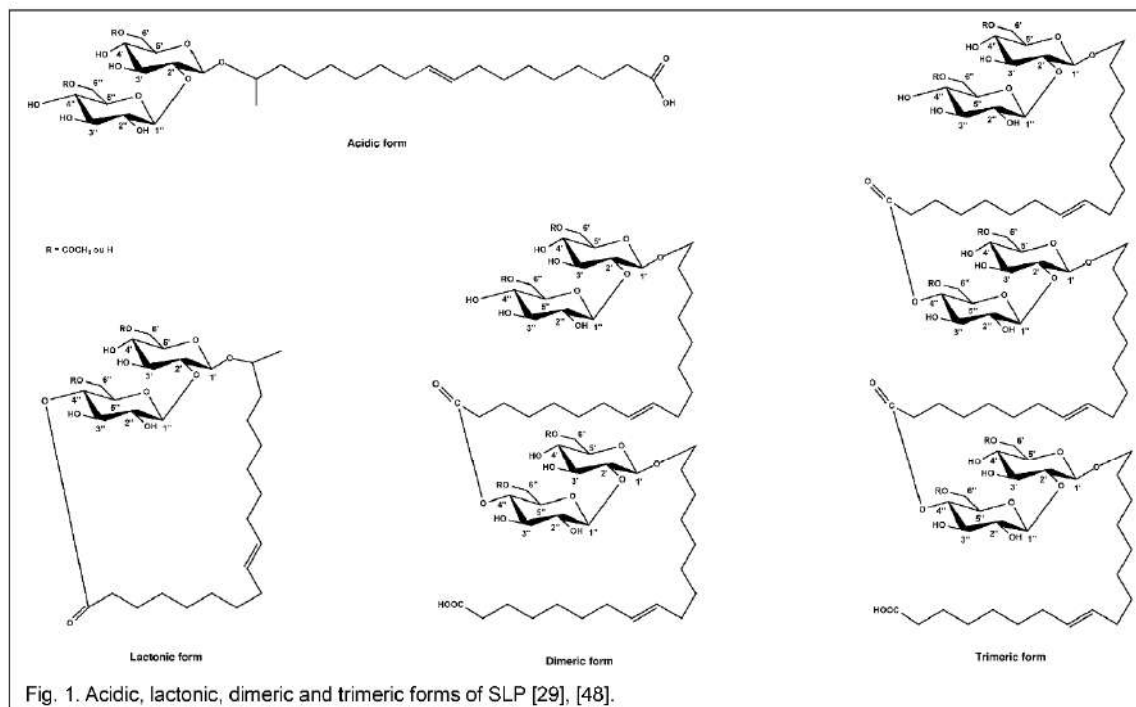
They are typically produced in the form of a mix of molecules structurally related. This complex mix can be constituted by up to 40 different types of SLP with associated isomers [47]. They may also occur in the polymeric (dimeric and trimeric) form [48]. This wide structural variation presented by the SLP is related to many factors: a) The hydroxyl grouping of C6' and C6'' of sophorose can be found deacetylated, monoacetylated or diacetylated [2], [49]; b) They may be produced in the lactonic and acidic form. In the lactonic form, the carboxyl grouping of the fatty acid is esterified to the C4' of the sophorose, being also able to be esterified to the C6' or C6'', although this is less frequent [2]; c) The size of the carbonic chain of the fatty acid generally varies between C16 and C18 [50]; d) The fatty acids can be saturated, monounsaturated or polyunsaturated [49]; e) The fatty acids may be hydroxylated in the ω (terminal) or in the ω -1 (sub terminal) carbon [51]; f) Presence of stereoisomers [51].

The figure 1 shows the acidic, lactonic and trimeric forms of the SLP. Different microorganisms produce different forms of SLP, although these forms can also be altered varying the conditions of the fermentative process, such as the supplying of different lipophilic substrates during the fermentative process [52]. The table 1 shows different forms of SLP produced for several producer microorganisms.

Since the SLP are produced as a mixing of the acidic and lactonic form, its properties and applications are directly related to these forms. The lactonic forms have better biocide activities [57], anticancer [14], spermicide, cytotoxic and proinflammatory [16] and are more hydrophobic [58]. The acidic forms are better foaming agents and have a higher solubility in water [7] and can be better used in the food industry, bioremediation and cosmetics [54].

4 PHYSIOLOGICAL ROLES OF THE SOPHOROLIPIDS

Even though the physiological roles of the biosurfactants are not completely elucidated, they perform several essential functions for the cell growth and maintenance. A generalization of such functions is extremely difficult, for the biosurfactants with different chemical structures and very distinct superficial properties. Therefore, each biosurfactant can perform different physiological functions, providing different advantages for the producing microorganisms in its ecological niches [59].



Even as biosurfactants, the physiological role of the SLP isn't completely understood until now, but some hypothesis can be made. The SLP are secondary metabolites and do not seem to have an essential function for cellular growth, development and reproduction [2], [60].

TABLE 1
STRUCTURAL PROFILE OF SLP PRODUCED FOR SEVERAL
MICROORGANISMS

Producer microorganisms	Forms of SLP produced						Reference
	UnAc	MnAc	DnAc	UnLc	MnLc	DnLc	
<i>Candida epicola</i> NRRL Y-2481	●	●	●	●	●	●	[36]
<i>Candida batistiae</i> CBS 8550					●	●	[36]
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214			●			●	[38], [52]
<i>Candida floricola</i> TM1502			●				[37]
<i>Candida nodocensisa</i>	●	●	●		●		[38]
<i>Candida rugosa</i>					●		[40]
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27208 (<i>Candida kuoi</i>)	●	●	●		●		[38]
<i>Candida stellata</i>	●	●	●				[38]
<i>Candida tropicalis</i>					●		[3]
<i>Cryptococcus</i> sp. VITGBN2			●				[42]
<i>Cyberlindnera samutprakamensis</i> JP52				●		●	[41]
<i>Pichia anomala</i> PY1			●			●	[35]
<i>Rhodotorula muciliginosa</i>			●				[40]
<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	●	●	●				[55], [56]
<i>Wickerhamiella domercqiae</i> Y2A	●	●	●		●	●	[54]

UnAc - Unacetylated acidic; MnAc - Monoacetylated acidic; DnAc - Diaetylated acidic; UnLc -

Unacetylated lactonic; MnLc - Monoacetylated lactonic; DnLc - Diaetylated lactonic.

● - Large quantities; ● - Small quantities.

They are probably formed and liberated to the extracellular medium as extracellular storage of carbon [61]. The SLP producer microorganisms such as *Candida bombicola* and *Candida apicola* occur in honey, nectar, pollen [43] and are involved in mutualistic relations with bees [44]. Since these habitats are of high osmotic pressure, the production of SLP may be a form of adaptation and protection to these high concentrations of sugar [61], besides being an adaptive advantage, where the yeast, converts and stores the carbohydrates and makes them less available to other microorganisms [62].

Many microorganisms are capable of growing in lipophilic substrates, like for example, hydrocarbons as a unique source of carbon. These microorganisms are capable of emulsifying hydrophobic carbon sources during growth. This emulsifying capacity is given by the production of extracellular biosurfactants, mainly of glycolipids, which allows the capture of the substrate to the periplasmic space [63]. However, this theory, isn't much accepted for the formation of SLP, especially because there can be produced without any hydrophobic substrate present and when present are produced in amounts which highly exceeds the necessary concentration for the emulsification of these substrates [62]. The SLP possess antimicrobial activity against algae [64], yeasts [57] and bacteria [65] through the mechanisms involving membrane destabilization and increased permeability [67]. The antimicrobial activity can serve as an interspecies competition mechanism as it occurs in other biosurfactants [68].

5 BIOSYNTHESIS OF THE SOPHOROLIPIDS

The biosynthesis of SLP occurs in the stationary phase under nitrogen limiting conditions [69], total phosphate exhaustion [70] and dissociated from cellular growth [71]. The figure 2 shows schematically the biosynthesis of the SLP. In the presence of hydrophobic carbon sources, such as the alkanes, alcohol, fatty acids and esters of fatty acids, the yeasts such as *Candida bombicola* synthesizes SLP.

The biosynthesis process begins with a hydroxylation of the fatty acid present in the medium. This fatty acid can be of several origins: supplemented in the form of fatty acid; in the form of n-alkanes, alcohol, aldehyde, triglycerides or esters of fatty acids, which will be metabolized until its correspondent fatty acid; - in the case it isn't present, the fatty acid will be formed through de novo synthesis, from the acetyl-CoA. On the other hand, when the concentration of glucose is low, these hydrophobic carbon sources are metabolized through the β -oxidation and use for the cellular maintenance instead of the SLP synthesis [72].

The activation process of the fatty acids occur through hydroxylation of its terminal (ω) carbon or ($\omega-1$) subterminal, this hydroxylation is mediated by the enzyme CYP52M1 (cytochrome P450 monooxygenase belonging to the CYP52 family) NADPH depending, bonded to the cellular membrane, leading to the formation of the activated hydroxylated correspondent fatty acid. It can be metabolized through β -oxidation or act as precursor for the synthesis of SLP [61]; [73]. The enzyme CYP52M1 is expressed exclusively in the stationary phase and possibly potentialized by a damage resistant protein (DAP1) which stabilizes and regulates the CYP450 protein and participates in the metabolism of the lipids and sterols [74], [75].

In the next two stages, two molecules of glucose will be linked to the activated fatty acid. The first glucose molecule is linked (position C1') to the ω hydroxyl grouping or $\omega-1$ of the fatty acid by action of the Glucosyltransferase I (UgtA1). The reactions require that the glucose is activated in the form of UDP-glucose (Uridine diphosphate glucose) which acts as a donor of glucosyl grouping. In the next step, a second glucose is glycosidically linked to the first glucose (position C2') by Glucosyltransferase II (UgtA2). Both enzymes UgtA1 and UgtA2 are expressed in high amounts in the beginning of the stationary phase. The glucose supplied in the medium, isn't directly incorporated in the SLP structure, great part of the present glucose in the medium is metabolized through the glycolytic pathway, being that the SLP glucose is formed from the gluconeogenesis [74], [75], [76].

The product of the second glycosylation reaction are SLP in its unacetylated acidic form, further acetylation and lactonization reactions promote structural variations. The acetylation of the sophorose in the C6' and C6'' positions is mediated by action of by acetyltransferase [62], [77]. The lactonization process occurs through an esterification reaction between the carboxyl grouping of the fatty acid and the hydroxyl C4'' grouping, being it possible to occur more rarely in the C6' or C6'', the enzyme responsible for the lactonization occurs by the action of a cell wall-bound lactonesterase [75].

The excretion process of the SLP was not still completely understood, this process may occur from the formation of vesicles, mediated possibly by passive or active transporters, like the ABC transporter protein (Mdr) [78].

6 PRODUCTION OF SOPHOROLIPIDS

The production of SLP is strongly stimulated when two sources of carbon (lipophilic and hydrophilic) are present in the medium [2], in the absence of hydrophobic sources low productions can be observed [79]. The hydrophobic carbon source is normally incorporated in the hydrophobic faction of the SLP, mainly those with C16 and C18 [51]. In the case of absence, it can be synthesized from other sources of carbon from the synthesis de novo, however, the production of SLP will be smaller [70].

The production, type and proportion of the acidic/lactonic forms of SLP produced depend on several factors such as: producer strain, the composition of the environment (hydrophilic and hydrophobic carbon sources, nitrogen and salt source), environmental conditions (temperature, pH, agitation, aeration and time) and the kind of cultivation process employed (batch, feed batch and continuous) [80], [69].

6.1 Carbon sources

The SLP can be produced from a single source of hydrophilic carbon (carbohydrates), however the production will considerably increase if a second hydrophobic source of carbon (lipids, hydrocarbon, vegetal oil and animal fat) is added [69]. The main source of hydrophilic carbon used in the production of the SLP is glucose, which may be used for cellular growth and the production of SLP [81]. Other mono or disaccharides can be used as a hydrophilic substrate, among these carbohydrates we have sucrose, fructose, xylose [81], lactose, galactose [82], [8], mannose, maltose and raffinose [83]. The use of other hydrophilic carbon sources doesn't change the structure of the hydrophilic portion of the SLP (sophorose), which means the sophorose structure isn't determined by the sugar used. The different mono and disaccharides are metabolized, the glucose, supplying substrate for the intracellular synthesis of sophorose [83]. However, when these other carbohydrates are used as a source of hydrophilic carbon, smaller levels of production are obtained [84], [85].

The lactose, among the several carbohydrates already evaluated for the production of SLP can't be metabolized by *Candida bombicola*, when it is used, an absence of cellular growth can be observed [82]. The absence of capacity to metabolize lactose is due to the deficiency of a transporter system of lactose or of the enzyme galactosidase [86].

With the goal of decreasing the production cost, several sources of complex hydrophilic carbon sources, such as sugar cane molasses [87], soy molasses [53] and deproteinized whey [10] were evaluated. However, the observed production levels are smaller when compared to the levels obtained in the synthetic medium under the same experimental conditions. This way, the cost reduction may end up counter the smaller production obtained.

The hydrophobic carbon source influences in the production and final composition of the SLP mix. The structural profile commonly observed are SLP with a hydrophobic portion composed by chains with C16 and C18, due to the specificity of the cytochrome P450 monooxygenase, which promotes the terminal hydroxylation (ω) or subterminal ($\omega-1$) and further covalent linked to the glucose molecule by the glucosyltransferase. The enzymatic affinity by certain substrates depends on its absolute length, fatty acids with a length between 22,55 and 25,0 Å, as the stearic acid (C18:0) and the oleic acid (C18:1) are easily incorporated directly to the SLP structure, while the myristic acid (C14) or lauric acid (C12) are shorter fatty acids which difficult the direct incorporation. The addition of hydroxylated substrates or the addition of substrates with similar structures to the stearic and oleic acids facilitates the direct incorporation [88].

Several sources of hydrophobic carbon were evaluated for the production of SLP, such as the alkanes (C12, C14, C15, C16, C17, C18 and C20), saturated fatty acids (C18:0), unsaturated fatty acids (C16:1; C18:1 and C20:4) [51], alcohols (1,12-dodecanodiol), ethyl-ester dodecanoic acid, 12-hydroxydodecanoic acid, 1,12-dodecanodiol [69] and single cell-oil (*Cryptococcus curvatus*) [10], vegetal oils such as coconut oil, corn oil, grape seed oil, olive oil, sunflower oil [89], rapeseed oil, palm plant oil [69], Turkish corn oil [6], safflower oil [90] and soy oil [91]. Also several residues were used as substrate for the production of SLP as restaurant waste oil [66], soybean dark oil [71], dairy industry wastewater [92], oil refinery residue [93] and animal fat such as pig tallow [94] and fish oil [69].

When the alkanes are used as a hydrophobic source, they need to be oxidated into its corresponding fatty acids therefore the substrates which are similar to the fatty acids are preferred over the substrates which are similar with the alkanes, like the alkyl esters. The production of SLP from the n-alkanes increases with the increase of the chain in the following order C18>C16>C14>C12. Alkanes C16 and C18 are directly incorporated for the shortest a stretching can occur in the chain with the addition of 2, 4 or 6 carbons, being that a direct incorporation can also occur, but in a smaller proportion [69].

The production of SLP from canola, sunflower and palm oil is smaller when compared to its respective esters, once the esters can be easily hydrolyzed, supplying the previous fatty acids and a source of energy. In the case of the oils to the hydrolysis of the glycerides seems to be a limiting stage for the production of SLP. The composition of the fatty acids of the SLP obtained from its oils and esters are similar. As in the case of the alkanes, the fatty acids with C16 and C18 show a direct incorporation. SLP produced from oils always exhibit a higher level of the diacetylated lactonic forms than the ones produced from its esters, even though its esters present a higher production rate. A higher content of polyunsaturated fatty acids promotes the production of SLP in the acidic form [69].

The production of SLP from several fatty acids such as the myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), linolenic acid

(C18:3) and eicasonoic acid (C20:0). It can be seen that the increase in the chain's length from C14 to C16 and C18 results in a significant increase in the production of SLP, with a drop in production from C20:0. The degree unsaturation affects the production of SLP, the absence of unsaturation C18:0, leads to a small decrease in the production of SLP. Monounsaturated fatty acids C18:1 result in a high production of SLP, while a decrease is observed with the increase of the amount of unsaturation (C18:1 > C18:0 > C18:2 > C18:3) [95].

Hydrophobic substrates with a short chain (C10 to C14) such as fatty acids and its esters and primary alcohols are not directly incorporated in the SLP structure but degraded and used by synthesis de novo of the C16 and C18 fatty acids and further incorporation to the structure of the SLP. Secondary alcohols ($\beta-1$ hydroxylated) as 2-dodecanol (C12), 2-tetradecanol (C14) and 2-hexadecanol (C16), allows the direct incorporation. With the increase of secondary alcohol chain (C12 – C16) the production of SLP increase too [96, 97].

Substrates with the terminal carboxylic grouping, like dodecyl, glutarate, and malonate ester are substrates with a higher degree of incorporation over substrates with groupings alkyl terminal with pentenyl dodecanate and dodecyl pentanoate [98]. The addition of hydrophobic esterified substrates with longer chains, such as the methyl ester of erucic acid (54% of docosenoic acid C22:1 and docosadienoic acid C22:2) leads to the consequent production of SLP of the longest chain, showing the direct incorporation of these fatty acids in the SLP structure. The methyl esterification of these substrates promotes the production of SLP mainly in the acidic form [99].

6.2 Nitrogen Sources

The SLP producing microorganisms may metabolize organic and inorganic sources of nitrogen. Several authors have already evaluated inorganic sources such as NH_4NO_3 [100], NaNO_3 [79], [55], $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [101], [55], NH_4Cl [38], and organic sources such as yeast extract [60], malt extract, peptone extract, soytone [102], corn steep liquor [103]. Among the evaluated nitrogen sources, the yeast extract is the best nitrogen source used for the production of biomass and SLP [60], being a source of nitrogen, vitamins and trace elements such as zinc, magnesium and iron.

The values found in literature for the yeast extract are of 1 g.L^{-1} [89], [81]; 2 g.L^{-1} [104]; 3 g.L^{-1} [90]; 4 g.L^{-1} [8] e 5 g.L^{-1} [79]. The variation observed in these values are given by the different experimental conditions tested, as well as different carbon sources, like those of complex carbon [105] or the addition of sources of inorganic nitrogen [100]. In low concentrations (1g.L^{-1}) of yeast extract the production of SLP is stimulated and in higher concentrations (5g.L^{-1}) cellular growth is stimulated [60] [89].

Nitrogen limitation is one of the requirements for the production of SLP by *Candida bombicola*. Several complex nitrogen sources such as yeast extract, malt extract and soytone are sources with high in nitrogen/carbohydrate ratios; therefore any increase in the concentration of these sources can decrease the production of SLP. However the malt extract has high proportions of carbohydrates decreasing the

nitrogen/carbohydrate ratio, increasing the production of SLP [102].

When urea is used as the only source of nitrogen, the cellular growth becomes limited, for other essential elements for the cellular growth, such as the pantothenic acid, thiamine, pyridoxine, which are supplied with the yeast extract, aren't present [90], [79]. The utilization of the low-value soy molasses as a combined nitrogen and carbon-source for SLP production, results in lower production, but could be justified by the cost reduction of the fermentative process [106]. When used, the sugar cane molasses and soybean oil, the production of SLP was higher without the addition of yeast extract, showing that it is possible to eliminate unnecessary nitrogen sources (yeast extract, urea), decreasing costs and increase the production, depending on the type of substrate used in the fermentative process [104].

The type of nitrogen source and its concentration influences in the structure of the SLP obtained and in the ratio of acidic/lactonic forms. Concentrations of yeast extract smaller than 5 g.L^{-1} favors the formation of lactonic forms and in higher concentrations the acidic fractions increase, smaller concentrations of yeast extract and long fermentation periods increase the rates of produced lactonic forms, independently of the fermentation method used [89]. The absence of yeast extract and urea decrease the production of lactonic forms [106], in contrast, when to the ones produced in the presence of it [52]. The production of acidic diacetylated forms are favored by the substitution of urea by NaNO_3 , possibly by the delay of the stationary phase, for the acidic forms are precursors of the lactonic forms [55].

6.3 Minerals

In literature, there are few studies which evaluate the influence of the minerals in the production of SLP. Some minerals are essential for the microbial growth and metabolism, generally the culture used for the production of SLP, when supplemented with minerals containing KH_2PO_4 , MgSO_4 , MgCl_2 , NaCl and CaCl_2 . The supplementation of the medium with KH_2PO_4 , beyond the nitrogen source, possesses great influence in the production of biomass. For the production of SLP, the K_2HPO_4 is a better source of phosphorus than KH_2PO_4 . On the contrary MgCl_2 doesn't influence the production of biomass [60] and influences negatively the production of SLP and CaCl_2 influences positively the production of SLP [102].

6.4 Parameters of the Fermentative Process

6.4.1 Temperature

The fermentative processes for the production of the SLP occur between temperatures of 21°C to 30°C . The best temperature for the production of SLP varies accordingly to the experimental conditions employed and established by several authors. The best temperature for the production of SLP by resting-cell is of 21°C , but because of technical matters (better sample-taking and better analysis at lower glycolipid concentration) the temperature of 30°C is used [83].

For processes in a bioreactor in a batch and fed-batch, temperatures of 25°C and 30°C show very similar results for

the production of SLP [89]. The production of SLP in shake flasks decreases quickly with the increase of temperature from 27°C ($129,8 \text{ g.L}^{-1}$) > 30°C ($93,2 \text{ g.L}^{-1}$) > 34°C ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$) > 37°C ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$) [94]. In an industrial process, temperatures of 25°C / 30°C are preferred over 21°C , once the high costs are associated to processes of refrigeration/cooling processes and another factor is that fats and oils do not mix well at lower temperatures like 21°C .

6.4.2 pH

The pH plays an important role in the enzymatic efficiency and the production of SLP can be affected as a result of the specificity differences of the enzyme-substrate. The growth of *Candida bombicola* and the production of SLP are associated to a strong decrease of the pH. During the exponential phase of growth, the pH decreased from values of 6,0 to more acid values between 2,6 and 4,0. This descent of pH is promoted due to the consumption of the nitrogen source and generation of fatty acids [70], [80].

For the production of SLP initially the pH must be adjusted for values between 5,0 and 6,0 to promote cellular growth and further during the stationary phase keep it stable in 3,5 for the production of SLP [83], [49]. Although some authors do not control the conditions of pH for the production of SLP [2], [84] the production under controlled conditions of pH may promote and increase of up to 27,6% in the production of SLP [104]. The production of SLP in acid conditions (3,5) and the antimicrobial effect of the SLP protects the culture of the contamination process, even more, where the SLP are produced in too long fermentative processes (200 hours of fermentation) [62].

6.4.3 Aeration and Oxygenation

The oxygen is essential not only during the exponential phase, but also good aeration conditions are essential for the biosynthesis of SLP, mainly due to the cytochrome P450 monooxygenase needing molecular oxygen for its activity. Generally high oxygenation levels result in increase of the SLP production, this increase is stronger when lower volumes of culture are used. However, high levels of agitation with lower volumes of culture medium decrease the formation of SLP.

Therefore, there is a good rate of oxygenation for the production of SLP, which can be defined in terms of transfer rate of oxygen. In fed-batch in shake flasks the best aeration is between 50 and 80 $\text{mm O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [107]. The aeration can influence in the structure of the SLP, high levels of aeration during the fermentative process lead to the absence of the deacetylated forms and the formation of high proportions of diacetylated forms, also increasing the fraction of lactonic forms [108]. The adjustment in the oxygenation conditions in the initial periods can control the degree of unsaturation of the SLP, low levels of oxygenation can increase the proportion of saturated SLP [107].

6.5 Fermentation Process

The different types of fermentation process (batch, fed-batch, continuous), influences in the production of SLP. The production in batch in shake flasks is used for the production

in small scale, ideal for the initial studies of production, with an initial environment volume of 20% of the nominal volume of the flask [71], [105] or in large scales in bioreactors [49], [66].

The biggest productions described in literature are obtained in bioreactor working in the fed-batch form, productions of 300 g.L⁻¹ [101], 365 g.L⁻¹ [71], 400 g.L⁻¹ [6] and bigger than 422 g.L⁻¹ [48]. The production in bioreactor by batch, fed-batch and resting cell allows productions up to six times higher if compared to batch in shake flasks, mainly due to a better aeration promoted by the bioreactor [89].

The controlled addition of the hydrophobic substrate prevents the inhibitory effect of the fatty acids in cellular growth, the production of SLP increases from 20 g.L⁻¹ to 317 g.L⁻¹ with the controlled addition of hydrophobic substrates (ethyl esters of rapeseed) to the fermentation medium, also influencing in the form of the mix of the SLP produced, which means, in the distribution of the acid and lactic forms and in the degree of acetylation [109]. The addition of hydrophobic substrates in excess leads to the formation of SLP with a viscous aspect (lactic forms) which require additional washings, while the controlled addition of the lipid substrate produces SLP in the form of microcrystalline precipitates (acidic forms), relatively simpler to collect and purify [110].

7 CONCLUSION

Despite numerous advantages and applications that the SLP possess over the synthetic surfactants, the large scale production and the relatively high cost are still a great obstacle for the economic competition. To overcome the barrier of high costs in the production of SLP, many strategies can be used: the use of substrates of low cost and renewable agro industrial alternative substrates for the formulation of medium of culture, development of efficient and optimized bioprocesses of the cultivation conditions and downstream (maximum production with maximum recovery). Therefore, in the industrial fermentative processes the optimization of the medium and culture conditions are essential and critical factors which affect directly the concentration, production, productivity and the costs of the metabolite wished to produce the SLP.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PNPd), Brazil and Fundação Araucária, Brazil for financial support.

REFERENCES

- [1] P.A. Gorin, J.F.T. Spencer, & A.P. Tulloch, "Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*," *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 39, no. 6199, pp. 846–855, 1961.
- [2] H.J. Asmer, S. Lang, F. Wagner, & V. Wray, "Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids," *Journal of Academic Industrial Research*, vol. 65, no. 9, pp. 1460–1466, 1988.
- [3] P. Chandran, & N. Das, "Role of Sophorolipid Biosurfactant in Degradation of Diesel Oil by *Candida tropicalis*," *Bioremediation Journal*, vol. 16, no. 1, pp. 19–30, 2012, doi:10.1080/10889868.2011.628351.
- [4] X.-J. Ma, H. Li, & X. Song, "Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamella domercqiae* var sophorolipid CGMCC 1576," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 376, no. 1, pp. 165–172, 2012, doi:10.1016/j.jcis.2012.03.007.
- [5] S.-H. Baek, X.-X. Sun, Y.-J. Lee, S.-Y. Wang, K.-N. Han, J.-K. Choi, J.-H. Noh, & E.-K. Kim, "Mitigation of harmful algal blooms by sophorolipid," *Journal of Microbiology Biotechnology*, vol. 13, no. 5, pp. 651–659, 2003.
- [6] G. Pekin, F. Vardar-Sukan, & N. Kosaric, "Production of Sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey," *Engineering in Life Sciences*, vol. 5, no. 4, pp. 357–362, 2005, doi:10.1002/elsc.200520086.
- [7] Y. Hirata, M. Ryu, Y. Oda, K. Igarashi, A. Nagatsuka, T. Furuta, & M. Sugiura, "Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 108, no. 2, pp. 142–146, 2009, doi:10.1016/j.jbiosc.2009.03.012.
- [8] Q.H. Zhou, & N. Kosaric, "Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*," *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 72, no. 1, pp. 67–71, 1995.
- [9] R.D. Ashby, A. Nuñez, D.K.Y. Solaiman, & T.A. Foglia, "Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream," *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 82, no. 9, pp. 625–630, 2005, doi:10.1007/s11746-005-1120-3.
- [10] H.J. Daniel, M. Reuss, & C. Sydatk, "Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214," *Biotechnology Letters*, vol. 20, no. 12, pp. 1153–1156, 1998.
- [11] D.-S. Yoo, B.-S. Lee, & E.-K. Kim, "Characteristics of Microbial Surfactants as Antifungal Agent Against Plant Pathogenic Fungus," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 15, no. 6, pp. 1164–1169, 2005.
- [12] K. Masaru, T. Nakane, Y. Akitani, K. Nobuchika, T. Nakada, S. Tomiyama, & J. Nagai, "Composition for high-density cold storage transportation," *Patent JP 21999000345173*, 2001, Japan.
- [13] B. Yuan, S. Yang, & J. Chen, "Antimicrobial Activity of Sophorolipids on Pathogenic Fungi Isolated from Fruits," *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, vol. 17, no. 3, pp. 330–333, February 2012, doi:10.3724/SP.J.1145.2011.00330.
- [14] L. Shao, X. Song, X.-J. Ma, H. Li, & Y. Qu, "Bioactivities of sophorolipid with different structures against human esophageal cancer cells," *The Journal of Surgical Research*, vol. 173, no. 2, pp. 286–91, April 2012, doi:10.1016/j.jss.2010.09.013.
- [15] V. Dingle Pulate, S. Bhagwat, & A.A. Prabhune, "Microbial Oxidation of Medium Chain Fatty Alcohol in the Synthesis of Sophorolipids by *Candida bombicola* and its Physicochemical Characterization," *Journal of Surfactants and Detergents*, vol. 16, no. 2, pp. 173–181, July 2012, doi:10.1007/s11743-012-1378-4.
- [16] V. Shah, G.F. Doncel, T. Seyoum, K.M. Eaton, I. Zalenskaya, R. Hagver, A. Azim, & R.A. Gross, "Sophorolipids, Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no. 10, pp. 4093–4100, 2005, doi:10.1128/AAC.49.10.4093-4100.2005.
- [17] R. Hardin, J. Pierre, R. Schulze, C.M. Mueller, S.L. Fu, S.R. Walther, A. Stanek, V. Shah, R. a Gross, J. Weedon, M. Nowakowski, M.E. Zenilman, & M.H. Bluth, "Sophorolipids improve sepsis survival: effects of dosing and derivatives," *The Journal of Surgical Research*, vol. 142, no. 2, pp. 314–319, 2007, doi:10.1016/j.jss.2007.04.025.
- [18] S.-W. Kang, Y.-B. Kim, J.-D. Shin, & E.-K. Kim, "Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 160, no. 3, pp. 780–90, March 2010, doi:10.1007/s12010-009-8580-5.

- [19] C.N. Mulligan, R.N. Yong, & B.F. Gibbs, "Heavy metal removal from sediments by biosurfactants," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 85, no. 1-2, pp. 111–125, 2001.
- [20] K. Kim, Y. Dalsoo, K. Youngbum, L. Baekseok, S. Doonhoon, & K. Eun-Ki, "Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 12, no. 2, pp. 235–241, 2002.
- [21] T.T.L. Nguyen, & D.A. Sabatini, "Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, no. 2, pp. 1232–1244, 2011, doi:10.3390/ijms12021232.
- [22] M.B. Kasture, P. Patel, A.A. Prabhune, C. V Ramana, A.A. Kulkarni, & B.L. V Prasad, "Synthesis of silver nanoparticles by sophorolipids: Effect of temperature and sophorolipid structure on the size of particles," *Journal of Chemical Sciences*, vol. 120, no. 6, pp. 515–520, January 2008, doi:10.1007/s12039-008-0080-6.
- [23] S. Dhar, E.M. Reddy, A.A. Prabhune, V. Pokharkar, A. Shiras, & B.L. V Prasad, "Cytotoxicity of sophorolipid-gellan gum-gold nanoparticle conjugates and their doxorubicin loaded derivatives towards human glioma and human glioma stem cell lines," *Nanoscale*, vol. 3, no. 2, pp. 575–80, February 2011, doi:10.1039/c0nr00598c.
- [24] A. Elshafie, S.N. Al-Bahry, Y.M. Al-Wahaibi, A.S. Al-Bemani, S.J. Joshi, & D. Al-Maqbali, "Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Possible Application in Enhancing Oil Recovery," In *4 Th International Symposium on Applied Molecular Microbiology in Oil Systems (ISMOS)* (pp. 1–63) 2013, Rio de Janeiro.
- [25] B.S. Saharan, R.K. Sahu, & D. Sharma, "A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives," *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, vol. 2011, no. 1, pp. 1–14, 2011.
- [26] M. Nitschke, C. Ferraz, & G.M. Pastore, "Selection of microorganisms for biosurfactant production using agro industrial wastes," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 35, pp. 81–85, 2004.
- [27] R.S. Makkar, S.S. Cameotra, & I.M. Banat, "Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production," *AMB Express*, vol. 1, no. 1, pp. 5, 2011, doi:10.1186/2191-0855-1-5.
- [28] D.F. Jones, "Novel macrocyclic glycolipids from *Torulopsis gropengiesseri*," *Journal of the Chemical Society*, vol. 39, pp. 479–484, 1967.
- [29] A.P. Tulloch, & J.F.T. Spencer, "Fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis apicola* IV. Products from esters and hydrocarbons with 14 and 15 carbon atoms and from methyl palmitoleate," *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 46, no. 9, pp. 1459–1465, 1968.
- [30] F.C. Odds, M.G. Rinaldi, C.R. Cooper, A. Fothegill, L. Pasarelli, & M.R. McGinnis, "*Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, no. 1, pp. 313–316, 1997.
- [31] A.P. Tulloch, J.F.T. Spencer, & M.H. Deinema, "A new hydroxy fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*," *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 46, no. 3, pp. 345–348, 1968.
- [32] J.F.T. Spencer, P.A.J. Gorin, & A.P. Tulloch, "*Torulopsis bombicola* sp.n," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 36, no. 1, pp. 129–133, 1970.
- [33] D.G. Cooper, & D.A. Paddock, "*Torulopsis petrophilum* and Surface Activity," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 46, no. 6, pp. 1426–1429, 1983.
- [34] J. Chen, X. Song, H. Zhang, Y. Qu, & J. Miao, "Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 72, no. 1, pp. 52–59, 2006, doi:10.1007/s00253-005-0243-z.
- [35] J. Thaniyavarn, T. Chianguthai, P. Sangvanich, N. Roongsawang, K. Washio, M. Monkawa, & S. Thaniyavarn, "Production of Sophorolipid Biosurfactant by *Pichia anomala*," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 72, no. 8, pp. 2061–2068, 2008, doi:10.1271/bbb.80166.
- [36] M. Konishi, T. Fukuoka, T. Morita, T. Imura, & D. Kitamoto, "Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*," *Journal of Oleo Science*, vol. 57, no. 6, pp. 359–369, 2008.
- [37] T. Imura, Y. Masuda, H. Minamikawa, T. Fukuoka, M. Konishi, T. Morita, H. Sakai, M. Abe, & D. Kitamoto, "Enzymatic conversion of diacetylated sophoroselipid into acetylated glucoselipid: surface-active properties of novel bolaform biosurfactants," *Journal of Oleo Science*, vol. 59, no. 9, pp. 495–501, 2010.
- [38] C.P. Kurtzman, N.P.J. Price, K.J. Ray, & T.-M. Kuo, "Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella* (*Candida*) *bombicola* yeast clade," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 311, no. 2, pp. 140–146, 2010, doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02082.x.
- [39] C.P. Kurtzman, "*Candida kuoi* sp nov, an anamorphic species of the *Starmerella* yeast clade that synthesizes sophorolipids," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 62, no. Pt 9, pp. 2307–2311, 2012, doi:10.1099/ijse.0.039479-0.
- [40] P. Chandran, & N. Das, "Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil," *International Journal of Science and Nature*, vol. 2, no. 1, pp. 63–71, 2011.
- [41] J. Poomtien, J. Thaniyavarn, P. Pinphanichakam, S. Jindamorakot, & M. Monkawa, "Production and Characterization of a Biosurfactant from *Cyberlindnera samutprakamensis* JPS2T," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 77, no. 12, pp. 2362–2370, 2013, doi:10.1271/bbb.130434.
- [42] G. Basak, D. Devlin, D. Nilanjana, "Dual Role of Acidic Diacetate Sophorolipid as Biostabilizer for ZnO Nanoparticle Synthesis and Biofunctionalizing Agent against *Salmonella enterica* and *Candida albicans*," *Journal of Microbiology and Biotechnology* vol. 24, no. 1, pp. 87–96, 2013., doi: http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1307.07081.
- [43] C.A. Rosa, & M.-A. Lachance, "The yeast genus *Starmerella* gen nov and *Starmerella bombicola* sp nov, the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow," *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 48, pp. 1413–1417, 1998.
- [44] C.A. Rosa, M. Lachance, J. Silva, J.A. Teixeira, M. Marini, Y. Antonini, & R. Martins, "Yeast communities associated with stingless bees," *FEMS Yeast Research*, vol. 4, no. 3, pp. 271–275, 2003, doi:10.1016/S1567-1356(03)00173-9.
- [45] M.A. Santos, T. Ueda, K. Watanabe, & M.F. Tuite, "The non-standard genetic code of *Candida* spp: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation?," *Molecular Microbiology*, vol. 26, no. 3, pp. 423–431, 1997.
- [46] Bourdichon, François, Serge Casaregola, Chohreh Farrokhi, Jens C. Frisvad, Monica L. Gerds, Walter P. Hammes, James Hamnett, et al. 2012. "Food Fermentations: Microorganisms with Technological Beneficial Use." *International Journal of Food Microbiology* 154: 87–97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030.
- [47] T.J.P. Smyth, A. Perfumo, R. Marchant, & I.M. Banat, "Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids" *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 3717–3718) (K. N. Timmis, Ed.), 2010, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi:10.1007/978-3-540-77587-4.
- [48] N.P.J. Price, K.J. Ray, K.E. Vermillion, C. a Dunlap, & C.P. Kurtzman, "Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast," *Carbohydrate Research*, vol. 348, pp. 33–41, 2012, doi:10.1016/j.carres.2011.07.016.
- [49] R.T. Otto, H.J. Daniel, G. Pekin, K. Müller-Decker, G. Fürstenberger, M. Reuss, & C. Sydalk, "Production of sophorolipids from whey II Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 52, pp. 495–501, 1999.

- [50] Y. Hu, & L.-K. Ju, "Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 29, no. 10, pp. 593–601, 2001, doi:10.1016/S0141-0229(01)00439-2.
- [51] A. Nuñez, R.D. Ashby, T.A. Foglia, & D.K.Y. Solaiman, "Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization," *Chromatographia*, vol. 53, pp. 673–677, 2001.
- [52] D.A. Cavaleiro, & D.G. Cooper, "The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214," *Journal of Biotechnology*, vol. 103, no. 1, pp. 31–41, 2003, doi:10.1016/S0168-1656(03)00067-1.
- [53] D.K.Y. Solaiman, R.D. Ashby, A. Nuñez, & T. a Foglia, "Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate," *Biotechnology Letters*, vol. 26, no. 15, pp. 1241–1245, 2004, doi:10.1023/B:BILE.0000036605.80577.30.
- [54] X. Ma, H. Li, L.-J. Shao, J. Shen, & X. Song, "Effects of nitrogen sources on production and composition of sophorolipids by *Wickerhamiella domeroqiae* var *sophorolipid* CGMCC 1576," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 91, no. 6, pp. 1623–1632, 2011, doi:10.1007/s00253-011-3327-y.
- [55] I.A. Ribeiro, M.R. Bronze, M.F. Castro, & M.H.L. Ribeiro, "Design of selective production of sophorolipids by *Rhodotorula bogoriensis* through nutritional requirements," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 25, no. 11, pp. 630–640, 2013, doi:10.1002/jmr.2188.
- [56] A. Nuñez, R.D. Ashby, T. a Foglia, & D.K.Y. Solaiman, "LC/MS analysis and lipase modification of the sophorolipids produced by *Rhodotorula bogoriensis*," *Biotechnology Letters*, vol. 26, no. 13, pp. 1087–93, July 2004, doi:10.1023/B:BILE.0000032970.95603.6d.
- [57] S. Ito, M. Kinta, & S. Inoue, "Growth of yeasts on n-alkanes: inhibition by a lactonic sophorolipid produced by *Torulopsis bombicola*," *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 44, no. 9, pp. 2221–2223, 1980.
- [58] K. Joshi-Navare, P. Khanvilkar, & A. Prabhune, "Jatropha oil derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive," *Biochemistry Research International*, vol. 2013, pp. 1–11, January 2013, doi:10.1155/2013/169797.
- [59] L. Fracchia, M. Cavallo, M.G. Martinotti, & I.M. Banat, "Biosurfactants and Bioremediation Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials," pp. 325-326, In D. N. Ghista (Ed.), *Biomedical Science, Engineering and Technology* (1st ed., p. 876) 2011, Rijeka: InTech.
- [60] J.A. Casas, S. García de Lara, & F. García-Ochoa, "Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 21, no. 3, pp. 221–229, 1997, doi:10.1016/S0141-0229(97)00038-0.
- [61] R.K. Hommel, L. Weber, A. Weiss, U. Himmelreich, O. Rilke, & H.P. Kleber, "Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose," *Journal of Biotechnology*, vol. 33, no. 2, pp. 147–155, 1994, doi:10.1016/0168-1656(94)90107-4.
- [62] I.N.A. Van Bogaert, K.M.J. Saerens, C. De Muynck, D.W.G. Develter, W. Soetaert, & E.J. Vandamme, "Microbial production and application of sophorolipids (a)," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 76, no. 1, pp. 23–34, 2007, doi:10.1007/s00253-007-0988-7.
- [63] S. Ito, & S. Inoue, "Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 43, no. 6, pp. 1278–1283, 1982.
- [64] X.-X. Sun, J.-K. Choi, & E.-K. Kim, "A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 304, no. 1, pp. 35–49, 2004, doi:10.1016/j.jembe.2003.11.020.
- [65] V. Shah, D. Badia, & P. Ratsep, "Sophorolipids having enhanced antibacterial activity," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, no. 1, pp. 397–400, 2007, doi:10.1128/AAC.01118-06.
- [66] V. Shah, M. Jurjevic, & D. Badia, "Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production," *Biotechnology Progress*, vol. 23, no. 2, pp. 512–515, 2007, doi:10.1021/bp0602909.
- [67] A. Azim, V. Shah, G.F. Doncel, N. Peterson, W. Gao, & R.A. Gross, "Amino acid conjugated sophorolipids: A new family of biologically active functionalized glycolipids," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 17, no. 6, pp. 1523–1529, 2006, doi:10.1021/bc060094n.
- [68] J.D. Desai, & I.M. Banat, "Microbial production of surfactants and their commercial potential," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 61, no. 1, pp. 47–64, 1997.
- [69] A.M. Davila, R. Marchal, & J.-P. Vandecasteele, "Sophorose lipid production from lipidic precursors: Predictive evaluation of industrial substrates," *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 13, no. 4, pp. 249–257, July 1994, doi:10.1007/BF01569757.
- [70] A. Albrecht, U. Rau, & F. Wagner, "Initial steps of sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 46, no. 1, pp. 67–73, 1996.
- [71] Y.-B. Kim, H.S. Yun, & E.-K. Kim, "Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture," *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 23, pp. 6028–6032, 2009, doi:10.1016/j.biortech.2009.06.053.
- [72] A.D.J. Cortés-Sánchez, H. Hernández-Sánchez, & M.E. Jaramillo-Flores, "Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives," *Microbiological Research*, vol. 168, no. 1, pp. 22–32, 2013, doi:10.1016/j.micres.2012.07.002.
- [73] I.N. a Van Bogaert, S. Groeneboer, K.M.J. Saerens, & W. Soetaert, "The role of cytochrome P450 monooxygenase in microbial fatty acid metabolism," *The FEBS Journal*, vol. 278, no. 2, pp. 206–221, 2011, doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07949.x.
- [74] K. Ciesielska, B. Li, S. Groeneboer, I.N.A. Van Bogaert, Y.-C. Lin, W. Soetaert, Y. Van de Peer, & B. Devreese, "SILAC-Based Proteome Analysis of *Stammerella bombicola* Sophorolipid Production," *Journal of Proteome Research*, vol. 12, no. 10, pp. 4376–92, October 2013, doi:10.1021/pr400392a.
- [75] K. Ciesielska, I.N.A. Van Bogaert, S. Chevineau, B. Li, S. Groeneboer, W. Soetaert, Y. Van de Peer, & B. Devreese, "Exoproteome analysis of *Stammerella bombicola* results in the discovery of an esterase required for lactonization of sophorolipids," *Journal of Proteomics*, vol. 98, no. 2014, pp. 159–74, February 2014, doi:10.1016/j.jprot.2013.12.026.
- [76] K.M.J. Saerens, S.L.K.W. Roelants, I.N. a Van Bogaert, & W. Soetaert, "Identification of the UDP-glucosyltransferase gene UGT1A1, responsible for the first glycosylation step in the sophorolipid biosynthetic pathway of *Candida bombicola* ATCC 22214," *FEMS Yeast Research*, vol. 11, no. 1, pp. 123–132, 2011, doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00695.x.
- [77] I.N.A. Van Bogaert, D. Develter, W. Soetaert, & E.J. Vandamme, "Cloning and characterization of the NADPH cytochrome P450 reductase gene (CPR) from *Candida bombicola*," *FEMS Yeast Research*, vol. 7, no. 6, pp. 922–928, 2007, doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00282.x.
- [78] I.N.A. Van Bogaert, K. Holvoet, S.L.K.W. Roelants, B. Li, Y.-C. Lin, Y. Van de Peer, & W. Soetaert, "The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: a biotechnological interesting biosurfactant produced by *Stammerella bombicola*," *Molecular Microbiology*, vol. 88, no. 3, pp. 501–509, 2013, doi:10.1111/mmi.12200.
- [79] D.G. Cooper, & D.A. Paddock, "Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 47, no. 1, pp. 173–176, 1984.
- [80] R.D. Ashby, D.K.Y. Solaiman, & T. a Foglia, "Property control of sophorolipids: influence of fatty acid substrate and blending," *Biotechnology Letters*, vol. 30,

- no. 6, pp. 1093–1100, 2008, doi:10.1007/s10529-008-9653-1.
- [81] V. Bajaj, A. Tilay, & U. Annapure, "Enhanced production of bioactive Sophorolipids by *Stammerella bombicola* NRRL Y-17069 by design of experiment approach with successive purification and characterization," *Journal of Oleo Science*, vol. 61, no. 7, pp. 377–386, 2012.
- [82] Q.H. Zhou, & N. Kosaric, "Effect of Lactose and Olive Oil on Intra and Extracellular Lipids of *Torulopsis bombicola*," *Biotechnology Letters*, vol. 15, no. 5, pp. 477–482, 1993.
- [83] U. Göbber, S. Lang, & F. Wagner, "Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*," *Biotechnology Letters*, vol. 6, no. 4, pp. 225–230, 1984.
- [84] V. Klekner, N. Kosaric, & Q.H. Zhou, "Sophorose lipids produced from sucrose," *Biotechnology Letters*, vol. 13, no. 5, pp. 345–348, 1991.
- [85] I.A. Ribeiro, M.R. Bronze, M.F. Castro, & M.H.L. Ribeiro, "Sophorolipids: improvement of the selective production by *Stammerella bombicola* through the design of nutritional requirements," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, no. 5, pp. 1875–1887, 2012, doi:10.1007/s00253-012-4437-x.
- [86] H.J. Daniel, R.T. Otto, M. Reuss, & C. Syldatk, "Sophorolipid production with high yields on whey concentrate and rapeseed oil without consumption of lactose," *Biotechnology Letters*, vol. 20, no. 8, pp. 805–807, 1998.
- [87] A. Daverey, & K. Pakshirajan, "Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media," *Food Research International*, vol. 42, no. 4, pp. 499–504, 2009, doi:10.1016/j.foodres.2009.01.014.
- [88] I.N.A. Van Bogaert, S.J.J. Fleurackers, S. Van Kerrebroeck, D.W.G. Develter, & W. Soetaert, "Production of new-to-nature sophorolipids by cultivating the yeast *Candida bombicola* on unconventional hydrophobic substrates," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 108, no. 4, pp. 734–741, April 2011, doi:10.1002/bit.23004.
- [89] J.A. Casas, & F. Garcia-Ochoa, "Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 88, no. 5, pp. 488–494, 1999.
- [90] Q.H. Zhou, V. Klekner, & N. Kosaric, "Production of sophorose lipids by *Torulopsis bombicola* from safflower oil and glucose," *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 69, no. 1, pp. 89–91, 1992.
- [91] S. Ogawa, & Y. Ota, "Influence of Exogenous Natural Oils on the w-1 and w-2 Hydroxy Fatty Acid Moiety of Sophorose Lipid Produced by *Candida bombicola*," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 64, no. 11, pp. 2466–2468, 2000.
- [92] A. Daverey, & K. Pakshirajan, "Pretreatment of synthetic dairy wastewater using the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 163, no. 6, pp. 720–728, 2011, doi:10.1007/s12010-010-9077-y.
- [93] W. Bednarski, M. Adamczak, J. Tomasiak, & M. Paszczyk, "Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast," *Bioresource Technology*, vol. 95, no. 1, pp. 15–18, 2004, doi:10.1016/j.biortech.2004.01.009.
- [94] M. Deshpande, & L. Daniels, "Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat," *Bioresource Technology*, vol. 54, no. 1995, pp. 143–150, 1995.
- [95] A.P. Felse, V. Shah, J. Chan, K.J. Rao, & R.A. Gross, "Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, no. 2, pp. 316–323, 2007, doi:10.1016/j.enzmictec.2006.04.013.
- [96] A. Brakemeier, S.L. Tm, D. Wullbrandt, L. Merschel, A. Benninghoven, N. Buschmann, & F. Wagner, "Novel Sophorose Lipids from Microbial Conversion of 2-Alkanols," *Biotechnology Letters*, vol. 11, no. 11, pp. 1183–1188, 1995.
- [97] A. Brakemeier, D. Wullbrandt, & S. Lang, "*Candida bombicola*: production of novel alkyl glycosides based on glucose/2-dodecanol," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 50, no. 2, pp. 161–166, 1998, doi:10.1007/s002530051271.
- [98] I.N.A. Van Bogaert, S.J.J. Fleurackers, S. Van Kerrebroeck, D.W.G. Develter, & W. Soetaert, "Production of new-to-nature sophorolipids by cultivating the yeast *Candida bombicola* on unconventional hydrophobic substrates," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 108, no. 4, pp. 734–741, April 2011, doi:10.1002/bit.23004.
- [99] J.-D. Shin, J. Lee, Y.-B. Kim, I.-S. Han, & E.-K. Kim, "Production and characterization of methyl ester sophorolipids with 22-carbon-fatty acids," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 9, pp. 3170–3174, 2010, doi:10.1016/j.biortech.2009.12.019.
- [100] W.C. McCaffrey, & D.G. Cooper, "Sophorolipids production by *Candida bombicola* using self-cycling fermentation," *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 79, no. 2, pp. 146–151, 1995, doi:10.1016/0922-338X(95)94082-3.
- [101] U. Rau, S. Hammen, R. Heckmann, V. Wray, & S. Lang, "Sophorolipids: a source for novel compounds," *Industrial Crops and Products*, vol. 13, no. 2, pp. 85–92, 2001, doi:10.1016/S0926-6690(00)00055-8.
- [102] F.J. Rispoli, D. Badia, & V. Shah, "Optimization of the fermentation media for sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design," *Biotechnology Progress*, vol. 26, no. 4, pp. 938–44, 2010, doi:10.1002/btpr.399.
- [103] S. Shah, & A.A. Prabhune, "Purification by silica gel chromatography using dialysis tubing and characterization of sophorolipids produced from *Candida bombicola* grown on glucose and arachidonic acid," *Biotechnology Letters*, vol. 29, no. 2, pp. 267–272, 2007, doi:10.1007/s10529-006-9221-5.
- [104] A. Daverey, & K. Pakshirajan, "Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 79, no. 1, pp. 246–253, 2010, doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.002.
- [105] A. Daverey, & K. Pakshirajan, "Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 160, no. 7, pp. 2090–2101, 2010, doi:10.1007/s12010-009-8797-3.
- [106] D.K.Y. Solaiman, R.D. Ashby, J. a Zerkowski, & T. a Foglia, "Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*," *Biotechnology Letters*, vol. 29, no. 9, pp. 1341–1347, 2007, doi:10.1007/s10529-007-9407-5.
- [107] V. Guilmanov, A. Ballistreri, G. Impallomeni, & R.A. Gross, "Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 77, no. 5, pp. 489–494, 2002, doi:10.1002/bit.10177.
- [108] P. Ratsap, & V. Shah, "Identification and quantification of sophorolipid analogs using ultra-fast liquid chromatography-mass spectrometry," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 78, no. 3, pp. 354–356, 2009, doi:10.1016/j.mimet.2009.06.014.
- [109] A.M. Davila, R. Marchal, & J.-P. Vandecasteele, "Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 47, pp. 496–501, 1997.
- [110] U. Rau, C. Manzke, & F. Wagner, "Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214," *Biotechnology Letters*, vol. 18, no. 2, pp. 149–154, 1996.

5.2 ARTIGO PUBLICADO – SOPHROLIPIDS A PROMISING BIOSURFACTANT AND IT'S APPLICATIONS

OLIVEIRA, M. R. *et al.* Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research(IJBR)**, 2015. v. 6, n. 2, p. 161–174.

Disponível em: <https://bipublication.com/files/IJABR-V6I2-2015-3.pdf>

Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications

Marcos Roberto de Oliveira¹, Agnes Magri², Cristiani Baldo², Doumit Camillos-Neto²,
Tamires Minucelli², Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi²

¹ Department of Food Science and Technology,
Federal Technological University of Paraná, Brazil

²Department of Biochemistry and Biotechnology,
State University of Londrina, Brazil

*Corresponding author: Email: macelligoi@uel.br,

Tel: +55-43337142700; Fax: +55-4333714054

[Received-25/03/2015, Published-11/04/2015]

ABSTRACT:

Sophorolipids (SLPs) are the most promising glycolipid biosurfactants produced in large quantity by several non-pathogenic yeast species, among these *Candida bombicola* ATCC 22214 is the most studied SLP producing yeast. SLPs composed by the disaccharide sophorose (2'-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glycopyranose) linked (β – glycosidically) to a long fatty acid chain with generally 16 to 18 atoms of carbon with one or more unsaturation. These compounds have characteristics, which are similar or even superior to the other biosurfactants and surfactants. Some of these advantages are environmental compatibility, high biodegradability, low toxicity, high selectivity and specific activity in a broad range of temperature, pH and salinity conditions. They fulfill the eco-friendly criteria combine Green chemistry and a lower carbon footprint. SLP possess a great potential for application in areas such as: Agriculture, Food, Biomedicine, Bioremediation, Cosmetics and Enhanced Oil Recovery.

Keywords: surfactants, biosurfactants, applications sophorolipids, *Candida bombicola*

[I] NTRODUCTION

Biosurfactants are surfactants produced by bacteria, yeasts and fungi. Due to their environment-friendly nature, biosurfactants have carved a niche in the market today. The current market-trends show that biosurfactants demand in the next years is going to increase manifolds based on their utility in detergent, paint, cosmetics, textile, agriculture, food and pharmaceutical industries [1]. Among of the

different biosurfactants, the glycolipids are one of the most important classes of these amphiphilic compounds, being rhamnolipid, trehalolipids and SLP the best known [2].

SLP is one of the most promising and attractive biosurfactant which combines green chemistry with lower carbon footprint (without the undesirable side products or environmental downsides associated with synthetic surfactants)

[3, 4]. SLP have numerous properties that make them superior to synthetic surfactants including: stability in the wide range of pHs, temperatures, and salinity [5], low-foaming and excellent detergent properties [6], water hardness (high concentration of divalent cations) does not affect their interfacial properties, synergism between acidic and lactonic forms of SLP increase surfactants activities [7], are readily biodegradable and exhibit good surface activity (critical micelle concentration (CMC), surface tension and emulsification behavior) [8, 9]. SLP can be produced in large quantities [10] based on renewable resources [11] agro-industrial by-products and residues [12] and easy and simplified product recovery [13, 14]. Given the increasing interest in SLP biosurfactant and their highly attractive characteristics, here we explore the wide range of SLP applications.

[II] PRODUCER MICROORGANISMS

SLP are produced by several microorganisms (*Candida batistae* CBS 8550 [18], *Rhodotorula bogoriensis* [19], *Candida floricola* TM1502 [20], *Candida riodecensis* [21], *Candida rugosa*

[22], *Candida kuoi* [23], *Candida stellata* [24], *Candida tropicalis* [25], *Cryptococcus sp.* VITGBN2 [26], *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 [27], *Pichia anomala* PY1 [28], *Rhodotorula muciliginosa* [22], *Candida bombicola* [29], *Candida apicola* [30, 31], *Torulopsis gropengiesseri* [32], *Torulopsis petrophilum* [33] and *Wickerhamiella domercqiae* Y2A [34]). Among these species *Candida bombicola* ATCC 22214 is the most studied SLP producing yeast, which exhibits both the highest yield and productivity. *Candida bombicola* is phylogenetically distant from the others pathogenic yeasts, like *Candida albicans* [15, 16]. Furthermore, *Candida bombicola* is included in microorganism with technological beneficial and have GRAS (Generally Recognized as Safe) status [17].

[III] SLP STRUCTURES

SLP are amphiphilic molecules composed of hydrophilic moiety, a sophorose disaccharide (2'-O- β -D-glucofuranosyl- β -D-glycopyranose), linked to the hydrophobic moiety, a long chain of fatty acid [Figure-1a].

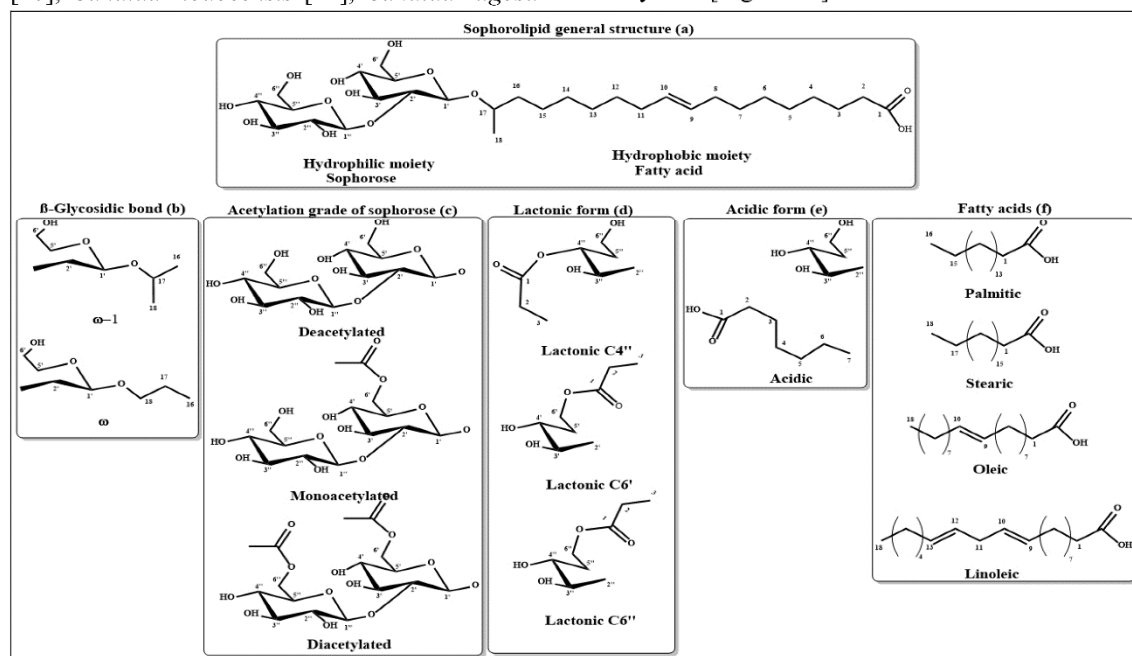


Fig: 1. General structure and structural variation of SLP.

Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and its Applications

They are produced as a mix of structurally related molecules, reaching up to 40 different types and associated isomers [35]. The high number of different structures arises from several possible combinations of: **(a)** the β -glycosidic bond links the anomeric carbon of the sophorose (C1') to the ω -carbon (terminal) or ω -1 hydroxylated (sub-terminal) from the fatty acid [Figure-1b]. [36, 30]; **(b)** acetylation of the hydroxyl groups of the sugar moiety; sophorose C6' and C6'' carbons might be deacetylated, monoacetylated or diacetylated [Figure-1c] [36, 37]; **(c)** presence of lactonic or acidic forms; lactonic form - carboxyl group of the fatty acid moiety is esterified to the sophorose in C4'', C6' or C6'' (esterification in C4'' is more frequent) [Figure-1d], acidic form – the carboxyl group of the fatty acid moiety is not esterified [Figure-1e] [36]; **(d)** the fatty acid chain might vary in size (mostly between C16 and C18), with presence of unsaturation (saturated, monounsaturated or polyunsaturated) [Figure-1f] [38]; -presence of stereoisomers [39] and SLP might also occur in the polymeric form (dimeric or trimeric) [40].

[III] APPLICATIONS

As mentioned earlier, SLP are produced as a mix of structurally related molecules (like acidic and lactonic forms), consequently their properties and applications are directly related to the

composition of the mix (structure activity relationship). Lactonic forms are more hydrophobic [41] and have been reported to have better biocide activities [42], anticancer [43], spermicide, cytotoxic and proinflammatory activities [44]. On other hand, acidic forms are better foaming agents, have higher water solubility [7] and have been reported to present better use in food industry, bioremediation and cosmetics [45]. In addition, the composition of the SLP mix and proportion of the acidic or lactonic forms depends on several factors, such as: strain; medium composition - carbon sources (hydrophilic or hydrophobic) [46], nitrogen and salt sources [47, 48]; environmental conditions (temperature, pH, agitation, aeration and period of culture) [49]; and operation process (batch, feed batch and continuous) [39, 50].

Besides of the composition, SLP have been currently commercialized in many countries by various companies [Table-1]. SLPs are active ingredient in several products of beauty and personal care (bath products, acne pads, anti-dandruff products, pencil-shaped lip rouge, lip cream, lipsticks, and toothpaste), household cleaner's products and bio pesticides [51]. In next topics, we explore the some of the most prominent SLP applications envisaging their highly attractive characteristics and the recent advances in the SLP applications field.

Company	Location	Focus on
Allied Carbon Solutions Ltd.	Japan	Agricultural products, ecological research
DSM Nutritional Products	USA	Pharmaceutical products, cosmetics and food products
Ecover Belgium	Belgium	Cleaning products, cosmetics, bioremediation, pest control, pharmaceuticals
Groupe Soliance	France	Cosmetics
Henkel	Germany	Glass cleaning products, laundry, beauty products
Kaneka Co.	Japan	Cosmetics and toiletry products
MG Intobio Co. Ltd.	South Korea	Beauty and personal care, bath supplies e.g., soaps with new functions
Saraya Co. Ltd.	Japan	Cleaning products, hygiene products
Synthesize LLC	USA	Cleaning products, cosmetics, fungicides, crude oil emulsification

Table: 1. SLP producing companies around the world.

3.1. Agriculture

In agriculture, SLP can be used for phytopathogens control (biocidal properties) and as adjuvant in formulation of herbicides (surfactant properties). SLP show antifungal properties against plant pathogenic fungi, including *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. Damping-off is a soil borne root disease caused by these phytopathogens.

These diseases spread rapidly through soil by migrating with water in form of zoospore, and infecting seeds, leaves, and stem of water-culturing plants. SLP are very effective in inhibition of mycelial growth, motility as well as in the lysis of zoospore. Along with the low toxicity and biodegradability, the antifungal properties suggest that SLP possess great potential as promising and environment-compatible bio control agent [52].

SLP have excellent promise as natural surfactants/emulsifiers for post emergence herbicides. Post emergence herbicide formulations contain adjuvants to allow greater adherence to the plant surface and for increased penetration of the plant cuticle. Non-ionic surfactants, such as polyethoxylated tallowamines (POEA) currently used in several post emergence herbicides are petroleum-base, ecotoxic and toxic to a wide range of organisms. SLP can replace synthetic surfactants like POEA. Lactonic SLP from *Candida bombicola* (LacSLP), acidic SLP from *Candida kuoi* (AcSLP) form emulsions with lipophilic contact herbicide lemongrass oil (LGO). The AcSLP formed longer-lasting and stable emulsions with LGO better than commercial POEAs.

The herbicide damage ratings (HDR) values are greater with the AcSLP/LGO and LacSLP mixtures than with LGO applied alone or together with POEA. Additionally, the low-foaming by the SLP preparations is highly desirable to minimize air entrapment, which can cause pump and sprayer malfunctions [53].

3.2. Food

Surfactants have been used in the food industry for many centuries. Lecithin from egg yolk and proteins from milk are natural surfactants (which form foams, gels, emulsions, etc.) and are used in preparation of many food products as salad creams, deserts, margarine, etc. Surfactants also contribute to creaminess, appearance, palatability, texture, stability and rheology proprieties of foods [54]. In the food industries the emulsifying property of SLP can be used for improve the physical properties (volume, texture, viscosity, stability and general eating characteristics) of products of vegetable fat emulsion-based or starch-based and animal food products [55]. SLP added to wheat flour or a product containing it, modifies quality of final product. Production of bread from the wheat flour containing the SLP promotes better volume, appearance and shelf-life of bread [56].

Microbial and chemical contaminations in food have severe consequences for public health and also have a significant adverse economic impact. Vegetables and fruits and are handled by agricultural workers and consumers in food distribution channels, which provides opportunities for contamination with microbial hazards such as *Salmonella* spp., verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) and Norovirus (NoV) [57]. Germicides composition for cleaning fruits, vegetables, food processing equipment, surfaces and utensils, includes a mixture of surfactant (anionic surfactant - sodium lauryl sulfate or biosurfactant like SLP) and fruit acids (glycolic, lactic, malic, citric and tartaric acid). Besides acting as agent surfactant/emulsify SLP act as antimicrobial/germicidal agent. SLP present in germicide formulation in amounts of 1% are sufficient to kill 100% of *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* in 30 seconds after application of germicide [58]. Other germicidal formulation suitable for cleaning fruits and vegetables containing SLP is effective against the majority of the gram-

negative microorganism affecting agriculture. The treatment with this formulation resulted in > 90 % reduction of *Salmonella typhimurium* ATCC 23564, > 99 % reduction *Escherichia coli* ATCC 8739 and 100% reduction of *Erwinia chrysanthemi* ATCC 11663 and *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 after 10 minutes of exposure. Furthermore these formulation decreases microbial spoilage and increase shelf life in fruits and vegetables (chikoos, tomatoes, lemons and cucumber) [59].

Fruits are highly perishable products; the quality is affected by post-harvest handling, transportation, storage and marketing. Pathogenic fungi isolated from root (*Penicillium*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Graymould*, *Mucro e Yeasts*) are the main cause of diseases and rot of fruits during transporting and storing. SLP from *Wickerhamiella domercqiae* Y2A show antimicrobial activity against these pathogenic fungi. SLP inhibits proliferation, spore germination and the spread of mycelium. These findings suggest that SLP can be used in the prevention of fungal infections in fruits, during the process of harvesting, transportation and storage, increasing the quality and shelf life of fruits. SLP mechanism is not clear, presumably SLP change or damage cell wall or membrane structure [60].

Food contamination may also result from biofilm. Biofilm act as a protective matrix of primarily polysaccharide material produced by, and containing, bacteria which stick to surfaces. These biofilms are potential sources of contamination, which may lead to food spoilage and disease transmission. Thus controlling the adherence of microorganisms to food contact surfaces is an essential step in providing safe and quality products to consumers [54]. SLP presents antimicrobial properties and the ability to inhibit and disrupt biofilms formation by gram-positive (*Ralstonia eutropha* ATCC 17699) and gram-negative microorganisms (*Bacillus subtilis* BBK006) [61].

3.3. Biomedicine

SLP have further potential and applications as they act as biologically active compounds in biomedicine, particularly as anti-microbial, anti-tumor, antiviral and immune-modulator. Most of these biological activities probably due to the fact that the SLP has the ability to destabilize cell membranes structure change membrane permeability and modifying the cell surface that will eventually lead to cell lysis [62, 63, 41].

3.3.1 Anticancer activity

SLP display anticancer activity against several kinds of tumoral cells and might have a potential use for cancer treatment. SLP synthesized by *Wickerhamiella domercqiae* show cytotoxic effects in several cancerous cell lines. SLP exhibited significant inhibition of cell proliferation on cancer cells of H7402 (liver cancer line). The cytotoxic effect of SLP in liver cell lines H7402 is due to the ability of these molecules to induce apoptosis (block cell cycle at G1 phase and partly at S phase, increase of activity caspase-3 and increase of intracellular concentration of Ca_2^+) [64].

SLP produced by *Wickerhamiella domercqiae* exhibited different cytotoxic effects in cell lines KYSE 109 and KYSE 450 (human esophageal cancer). Diacetylated lactonic SLP promote a better inhibition on these two cell lines than that of monoacetylated lactonic SLP. Concerning the unsaturation degree of hydroxyl fatty acid in SLP, the monoisaturated SLP had the strongest cytotoxic effect, diunsaturated SLP had a little weaker cytotoxic effect, while saturated sophorolipid had the weakest cytotoxic effect (only 20% of cells were inhibited at 60 mg/mL concentration). Monoisaturated or diunsaturated and monoacetylated or diacetylated acidic SL groups have little anticancer activity. In other words there is correlation of SLP congeners and anti-cancer activities [43].

SLP mediated cytotoxic responses to pancreatic cancer cell lines. SLP natural mixture (containing a combination of eight isoforms lactonic and

acidic SLP) or derivatives (ethyl ester, methyl ester, ethyl ester monoacetate, ethyl ester diacetate, acidic SLP and diacetylated lactonic SLP) show diverse responses against human pancreatic carcinoma cells. These different responses are due to different mechanisms to kill pancreatic cancer cells by necrosis. The anticancer responses are dose and derivative-dependent. The cytotoxicity of SLP is specific to malignant cells since no cytotoxicity was observed against normal human cells, which minimize the side effects commonly associated with current therapeutic regimes [65].

3.3.2 Anti-microbial activity

The antimicrobial activity of SLP is due to their biological activity through certain mechanisms that involve destabilization and alteration of the permeability of the cellular membrane and rupture of cells causing extrusion of the cell contents [9, 66]. Besides antibacterial agent, SLP also act as antialgal [67], antifungal [52], antimycoplasma [58] and antiviral agents [44].

The antimicrobial activity of SLP depends on their chemical structure and the cell wall structure of microorganisms. Differences in the degree of inhibition of gram positive and negative bacteria are due differences in cell wall structure and osmolarities. SLP from *Candida bombicola* (diacetylated lactonic SLP, monoacetylated lactonic SLP, deacetylated lactonic SLP and monoacetylated acidic SLP) act in different ways: (a) no inhibition is observed in the case of the gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* and the yeast *Candida albicans*; (b) diacetylated and monoacetylated lactonic SLP are better inhibitors of gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecium*, and *Propionibacterium acnes*) than deacetylated lactonic SLP and monoacetylated acidic SLP. Most of these bacteria are found frequently in the obstructed sebaceous glands of the skin causing reduced respiration and acnes, which makes SLP potential ingredients in the

production of cosmetic, hygienic and pharmacological–dermatological products [68].

SLP produces by *Candida bombicola* with hydrophobic moiety derived from lauryl–myristyl alcohol (SLPLA) have a potent antimicrobial activity against gram negative, gram positive and yeast. Against gram negative bacteria SLPLA show a complete inhibition (*Escherichia coli* (gastroenteritis, urinary tract infections and neonatal meningitis) and *Pseudomonas aeruginosa* (cross infections in hospitals and clinics)) and gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* (food-poisoning and skin infections) and *Bacillus subtilis* (food contamination)). For gram positive bacteria the treatment with the SLPLA results in the rupture of cells (lysis), for gram negative bacteria promotes shrinking of the cells or the presence of irregularities on the cell surface rather than breakdown or rupture [66].

Besides acting as an antimicrobial agent SLP may work synergistically in association with antibiotics. SLP enhance the activity of tetracycline. Tetracycline alone against *Staphylococcus aureus* could not promote total inhibition until the end of 6h of exposure, association tetracycline + SLP promote total inhibition before of 4h of exposure. The association of cefaclor + SLP also showed better efficiency against *Escherichia coli* than cefaclor alone (48% more inhibition within 2 h of exposure as compared to cefaclor alone) [41].

Polyhexamethylene biguanide (PHMB) possess the anti-fungal activities and is used for disinfectant swimming pool, contact lens and antimicrobial wound dressings. Non-woven textiles with PHMB are effective against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. Non-woven textiles containing PHMB with SLP increase PHMB permeation into the stratum corneum significantly reduced colony forming units of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* suggesting that

PHMB and SLP are effectiveness for *Tinea pedis* prevention [69].

3.3.3 Anti-viral and spermicide activity

SLP and its structural analogs have spermicidal and anti-HIV activities. The virucidal and sperm immobilizing activity are similar to those of Nonoxynol-9 (commercial spermicide and potential HIV transmission-preventative agent). Structure-activity relationship showed that the acetylation of sophorose head groups and esterification of the carboxyl groups of the fatty acids show the same effects on specific activity. Di-acetylated ethyl ester of SLP is the most potent spermicidal and anti-HIV agent followed by mono-acetylated and no-acetylated ethyl esters. The relationship between chain length of fatty acids and spermicidal and virucidal are not the same. Shorter-carbon-chain has higher potency as virucidal agents and lower spermicidal activity. Longer-carbon-chain has lower potency as virucidal agents and higher spermicidal activity. Acidic SLP were weak spermicides and exhibited good antiviral activity against HIV and is the least cytotoxic of structural analogs tested. Lactonic forms of SLP exhibited high spermicidal, cytotoxic, and proinflammatory activities with low virucidal activity [44].

The Herpes simplex virus (HSV) causes of a great number of infections both in the orofacial and in the genital area. Natural mixtures of lactonic, non-lactonic, ethyl, methyl esters and diacetylated ethyl esters of SLP produced by *Candida bombicola* can act as an anti-HSV agent. From five tested compounds the best activity was displayed by Ethyl 17-L-[(2'-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl)-oxy]-cis-9-octadecenoate, which showed high anti-herpes virus activity [70].

3.3.4 Immuno-modulatory activity

Septic shock is a common and frequent cause of death in hospitals. In patients with sepsis caused by gram-negative bacteria, bacterial components including DNA, endotoxin and specifically cell wall lipopolysaccharide (LPS), are believed to be

causative factors of septic shock via induction of cytokine cascades. Septic shock can result in activation of the coagulation cascade and apoptosis, causing further organ damage and disseminated intravascular coagulation. Administration of SLP after induction of intra-abdominal sepsis significantly decreases mortality in a rat model of septic peritonitis. This mortality decrease might be, at least in part, mediated by decreased of macrophage number, decrease of nitric oxide and proinflammatory cytokines production and modulation of inflammatory responses [71]. Since the sepsis model used is induced by bacteremia, it is possible that SLP decrease sepsis by exerting antimicrobial properties. In addition, SLP exhibit anti-inflammatory effects in other diseases and can continue to reduce sepsis-related mortality with different vehicles, dosing regimens, and derivatives [72]. Furthermore, SLP maximally decreased IgE production in U266 cells (IgE producing myeloma cell line), possibly through affecting plasma cell activity. This suggests that SLP possess anti-inflammatory activity and may provide a novel therapy in diseases of altered IgE regulation (BLUTH et al., 2006). SLP act as an anti-inflammatory agent and potential therapy in diseases of altered IgE regulation. SLP decrease IgE production in U266 cells by down regulating important genes involved in IgE pathobiology in a synergistic manner [73].

3.3.5 Drug delivery system

SLP are an interesting category of asymmetric bolaamphiphiles. SLP self-assemble into various structures due to their structural and amphiphilic properties, these structures have different shapes and sizes depending upon factors such as the temperature, pH and incubation-time of the reaction mixture. SLP also demonstrate metal reducing and capping capabilities exerting greater control on the reaction parameters and condense the step involved in synthesis of nanomaterial, which can be used as antimicrobial agent, biosensing, drug delivery systems, magnetic

resonance imaging enhancers and others biomedical applications [74, 75, 76].

Sodium salt of acidic SLP (SLPNa) spontaneously forms vesicles that can act as a skin penetration enhancer for active ingredients. The main active component of triterpene glycosides is mogrosides V (anti-atherosclerotic effects, anti-cancer activity, anti-allergy activity, and anti-diabetic effects in animal models). SLPNa vesicles increase significantly the amount of mogroside V that penetrate through the skin [77].

Lactoferrin (LCF), a multifunctional glycoprotein, activate dermal fibroblasts (stimulate dermal cells for wound re-epithelialization). SLP increases the transdermal absorption of LCF through a model skin increases. The effects of SLP on the LCF activities on dermal fibroblasts reveal that SLP not depressed the effect of LCF to any extent (cell proliferation activities and levels of collagen IV, elastic fiber components, and hyaluronan synthases). Instead, SLP increased the tropoelastin gene expression, suggesting a significant synergism between LCF and SLP (enhancement effects on cell proliferation, collagen synthesis, and hyaluronan synthesis) [78].

Gold nanoparticles are biocompatible, non-cytotoxicity and are used as drug delivery system. Biocompatible SLP-conjugated gellan gum reduced and capped gold nanoparticles show anticancer activity against gliomas cell. The simple SLP conjugated gellan gum reduced/capped gold nanoparticles shows greater efficacy in killing the human glioma cell line LN-229 and human glioma stem cell line HNGC-2. When doxorubicin hydrochloride (anthracycline antibiotic) is also conjugated to these gold nanoparticles, the cytotoxic effects became more prominent. Thus, the nanoparticles were able to significantly inhibit the cell viability indicating that the combination therapy (SLP + doxorubicin)

has a greater potential in eradication of glioma cancer cells and even glioma stem cells [79].

3.4. Cosmetics

SLP biosurfactant have been produced and commercially applied as active ingredient in cosmetics products for body and skin applications. They are used as emulsifiers, foaming agentes, solubilizers, wetting agents and detergents [80]. Among of several expected characteristics for cosmetics application, SLP show low cytotoxicity towards human keratinocytes and fibroblasts [37, 7]. In addition, SLP promote the metabolism of fibroblasts and collagen neosynthesis in the dermis of the skin, acting as an agent that restructures repairs and tones up skin [81]. SLP stimulate leptin synthesis through adipocytes, which may reduce subcutaneous fat overload, which make its role in cellulitis treatment [82].

The increase in elastase activity from dermal fibroblastos leads to aging skin and the appearance of wrinkles. SLP inhibit free radical formation through inhibition of elastase activity [83]. SLP act as activator of macrophages, fibrinolytic agent (healing agent the treatment of wounds), desquamating agent and depigmenting agent through a partial inhibition of melanogenesis in the treatment of brown spots [84]. In addition, their bactericides and bacteriostatic properties play role for control of dandruff, acne treatment and as an active ingredient in deodorants [85].

3.5. Bioremediation

Bioremediation is a process that uses microorganisms for accelerate degradation of environmental contaminants. Biosurfactants produce by bacteria; fungi and yeast increase the surface area, solubility and bioavailability of hydrophobic water-insoluble substrates, stimulating the growth of oil-degrading microorganisms and improve their ability to utilize hydrocarbons [86].

One problem faced today is the decontamination of soils polluted with poorly soluble poly-cyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) like anthracene, fluorene, phenanthrene and pyrene. Phenanthrene is a model substrate for studies of biodegradation. SLP increases the solubility and availability of phenanthren stimulating the microbial biodegradation by *Sphingomonas yanoikuyae*. The maximum biodegradation *Sphingomonas yanoikuyae* is 1.3 mg/L-h in the presence of SLP compared to 0.8 mg/L-h without SLP [87].

Exposure to the heavy metals through ingestion or uptake of drinking water (particularly where water is reused) and foods can lead to accumulation in animals, plants and humans, which is a serious health public issue. Sources of metals include domestic and industrial effluents, the atmosphere, runoff and lithosphere. The main treatments for metal-contaminated sediments include solidification/stabilization and washing. SLP can remove heavy metals from metal-contaminated sediment (110 mg/kg copper and 3300 mg/kg zinc). A single washing with with 4% SLP removed 25% of the copper and 60% of the zinc. The mechanism for metal removal by the biosurfactants occurs through sorption of the surfactant on to the soil surface and complexation with the metal, detachment of the metal from the soil into the soil solution and hence association with surfactant micelles [88].

Oil pollution causes a great environmental problem to terrestrial and marine ecosystems. The components of petroleum have low aqueous solubility and strong binding and sorption onto solids particules. A common remediation process of contaminated sites is based on the extraction by organic solvents or surfactants. SLP improve the bioremediation of sites contaminated with hydrocarbons increasing the bioavailability of microbial consortia for biodegradation. Addition of SLP in soil increased biodegradation of model compounds: 2-methylnaphthalene (95% degradation in 2 days), hexadecane (97%, 6 days), and pristane (85%, 6 days). SLP show

effective biodegradation of crude oil in soil (80% biodegradation of saturates and 72% aromatics in 8 weeks) [89].

Harmful algal blooms, especially toxic dinoflagellate red tide, is one the most serious marine environmental problems to have aroused the world's attention. The deleterious effects of harmful algal blooms seriously constrain the sustainable development of coastal areas and cases of human poisoning resulting from algal toxins have been reported each year. The SLP shows potential in controlling harmful algal blooms by potent inhibition on harmful algae against several species like *Alexandrium tamarense*, *Heterosigma akashiwo*, *Cochlodinium polykrikoides* [67] *Scrispsiella trochoidea*, *Prorocentrum minimum*, *Cochlodinium polykrikoides* and *Heterosigma akashiwo* [9].

3.6. Microbial Enhanced Oil Recovery

Process of oil production leaving behind residual oil in the reservoirs. The residual oil represents about 2–4 trillion barrels or 67% of the total oil reserve. In oil industry to increase the production of crude oil is utilized the enhanced oil recovery (EOR). Microbial enhanced oil recovery (MEOR) employs microorganisms to pull out remaining oil from the reservoirs. Up to 50% of the residual oil can be recovery with low operation cost [90]. SLP and others biosurfactants can improve oil drainage into well bore, wetting of solid surfaces, reduction of oil viscosity, stimulating release of oil entrapped by capillaries and oil pour point, lowering of interfacial tension and dissolving of oil [91, 92]. The efficiency of the SLP in reducing the interfacial tension between water and various hydrophobic substances makes it more attractive for use in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and enhanced oil recovery (EOR) [93]. SLP can affect liquid-liquid interfaces by the lower the interfacial tensions and can also act on solid-liquid interfaces. These proprieties can be used to release bitumen from tar sands or, more technically, bituminous sands an unconventional oil/petroleum deposit [94].

Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and its Applications

Oil drilling is a process that involves drilling and pumping of oil. The drill cuttings from oil e gas exploration coming up to the surface impregnated with large amount of oil. SLP can be used for cleansing solid particles (drill cuttings) impregnated with a polluting fluid comprising hydrocarbon [95] and regeneration of hydrocarbons from dregs and muds [96].

[IV] CONCLUSION

This review presented the properties of SLP and their applications in many areas including agriculture, food, biomedicine, bioremediation, cosmetics and microbial enhanced oil recovery. Several scientific publications have been reporting that SLP could be a potential alternative for the synthetic surfactant. Currently various companies around the world market products derived from SLP as beauty and personal care products, cleaning products and agricultural products. They have the labels “bio-based” or “green” or “eco-friendly” or “sustainable”. The reason behind the large interest in SLP is due to their wide structural and functional diversity and a wide range of applications in various areas.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PNPD), Brazil and Fundação Araucaria, Brazil for financial support.

REFERENCES

1. Kaur Sekhon, K., Khanna, S. & Cameotra, S.S., (2012), Biosurfactant Production and Potential Correlation with Esterase Activity. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. Vol-03, issue 07
2. Desai, J.D. & Banat, I.M., (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews*. Vol-61, issue 1
3. Develter, D.W.G. & Laurysen, L.M.L., (2010), Properties and industrial applications of sophorolipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Vol-112, issue 6, pg 628–638
4. Develter, D.W.G. & Fleurackers, S.J.J., (2010), Sophorolipids and Rhamnolipids. In M. Kjellin & I. Johansson, eds. *Surfactants from Renewable Resources*. John Wiley & Sons
5. Chandran, P. & Das, N., (2012), Role of Sophorolipid Biosurfactant in Degradation of Diesel Oil by *Candida tropicalis*. *Bioremediation Journal*. Vol-16, issue 1, pg 19–30
6. Hirata, Y., Ryu, M., Oda, Y., et al., (2009), Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol-108, issue 2, pg 142–146
7. Hirata, Y., Ryu, M., Igarashi, K., et al., (2009), Natural synergism of acid and lactone type mixed sophorolipids in interfacial activities and cytotoxicities. *Journal of Oleo Science*. Vol-58, issue 11, pg 565–572
8. Ma, X.-J., Li, H. & Song, X., (2012), Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. *Journal of Colloid and Interface Science*. Vol-376, issue 1, pg 165–172
9. Baek, S.-H. et al., (2003), Mitigation of harmful algal blooms by sophorolipid. *Journal Microbiology Biotechnology*. Vol-13, issue 5, pg 651–659
10. Pekin, G., Vardar-Sukan, F. & Kosaric, N., (2005), Production of Sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey. *Engineering in Life Sciences*. Vol-5, issue 4, pg 357–362
11. Zhou, Q.H. & Kosaric, N., (1995), Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Vol-72, issue 1, pg 67–71
12. Ashby, R.D. et al., (2005), Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Vol-82, issue 9, pg 625–630
13. Daniel, H.J., Reuss, M. & Syldatk, C., (1998), Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214. *Biotechnology Letters*. Vol-20, issue 12, pg 1153–1156
14. Palme, O. et al., (2010), Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic

Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and its Applications

- particle manipulation. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Vol-112,issue 6, pg 663–673
15. Santos, M.A. et al., (1997), The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation? *Molecular microbiology*. Vol-26,issue 3, pg 423–431
 16. T. SUGITA, T. NAKASE, Nonuniversal usage of the leucine CUG codon in yeasts: Investigation of basidiomycetous yeast., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 45(4), 193,197 (1999).
 17. Bourdichon, F. et al., (2012), Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*. Vol-154, pg 87–97
 18. Konishi, M. et al., (2008), Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *Journal of Oleo Science*. Vol-57,issue 6, pg 359–369
 19. Tulloch, A.P., Spencer, J.F.T. & Deinema, M.H., (1968), A new hydroxy fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. *Canadian Journal of Chemistry*. Vol-46,issue 3, pg 345–348
 20. Imura, T. et al., (2010), Enzymatic conversion of diacetylated sophoroselipid into acetylated glucoselipid: surface-active properties of novel bolaform biosurfactants. *Journal of Oleo Science*. Vol-59,issue 9, pg 495–501
 21. Kurtzman, C.P. et al., (2010), Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. *FEMS Microbiology Letters*. Vol-311,issue 2, pg 140–146
 22. Chandran, P. & Das, N., (2011), Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. *International Journal of Science and Nature*. Vol-2,issue 1, pg 63–71
 23. Kurtzman, C.P., (2012), *Candida kuoi* sp. nov., an anamorphic species of the *Starmerella* yeast clade that synthesizes sophorolipids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol-62,issue 9, pg 2307–2311
 24. Kurtzman, C.P. et al., (2010), Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. *FEMS Microbiology Letters*. Vol-311,issue 2, pg 140–146
 25. Chandran, P. & Das, N., (2012), Role of plasmid in diesel oil degradation by yeast species isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil (a). *Environmental Technology*. Vol-33,issue 6, pg 645–652
 26. Basak, G., Das, D. & Das, N., (2013), Dual role of acidic diacetate sophorolipid as biostabilizer for ZnO nanoparticle synthesis and biofunctionalizing agent against *Salmonella enterica* and *Candida albicans*. *Journal of microbiology and biotechnology*. Vol-24,issue 1, pg 87–96
 27. Poomtien, J. et al., (2013), Production and Characterization of a Biosurfactant from *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52T. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. Vol-77,issue 12, pg 2362–2370
 28. Thaniyavarn, J. et al., (2008), Production of Sophorolipid Biosurfactant by *Pichia anomala*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. Vol-72,issue 8, pg 2061–2068
 29. Spencer, J.F.T., Gorin, P.A.J. & Tulloch, A.P., (1970), *Torulopsis bombicola* sp.n. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol-36,issue 1, pg 129–133
 30. Tulloch, A.P., Hill, A. & Spencer, J.F.T., (1968), Structure and reactions of lactonic and acidic sophorosides of 17-hydroxyoctadecanoic acid. *Canadian Journal of Chemistry*. Vol-46, pg 3337–3351
 31. Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T. & Tulloch, A.P., (1961), Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. *Canadian Journal of Chemistry*. Vol-39,issue 6199, pg 846–855
 32. Jones, D.F., (1967), Novel macrocyclic glycolipids from *Torulopsis gropengiesseri*. *Journal of the Chemical Society*. Vol-39, pg 479–484
 33. Cooper, D.G. & Paddock, D.A., (1983), *Torulopsis petrophilum* and Surface Activity. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol-46,issue 6, pg 1426–1429
 34. Chen, J., Song, X., Zhang, H. & Qu, Y., (2006), Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol-39,issue 3, pg 501–506
 35. Smyth, T.J.P., Perfumo, A., Marchant, R. & Banat, I.M., (2010), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* K. N. Timmis, ed.,

Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications

- Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pg 3706-3721
36. Asmer, H.J. et al., (1988), Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *Journal of Academic Industrial Research*. Vol-65,issue 9, pg 1460–1466
 37. Otto, R.T. et al., (1999), Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol-52, pg 495–501
 38. Hu, Y. & Ju, L.-K., (2001), Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol-29,issue 10, pg 593–601
 39. Nuñez, A. et al., (2001), Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. *Chromatographia*. Vol-53, pg 673–677
 40. Price, N.P.J. et al., (2012), Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. *Carbohydrate Research*. Vol-348, pg 33–41
 41. Joshi-Navare, K., Khanvilkar, P. & Prabhune, A., (2013), *Jatropha oil* derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive. *Biochemistry Research International*. Vol-2013, pg 1–11
 42. Ito, S., Kinta, M. & Inoue, S., (1980), Growth of yeasts on n-alkanes: inhibition by a lactonic sophorolipid produced by *Torulopsis bombicola*. *Agricultural and Biological Chemistry*. Vol-44,issue 9, pg 2221–2223
 43. Shao, L. et al., (2012), Bioactivities of sophorolipid with different structures against human esophageal cancer cells. *The Journal of surgical research*. Vol-173,issue 2, pg 286–91
 44. Shah, V. et al., (2005), Sophorolipids , Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol-49,issue 10, pg 4093–4100
 45. Ma, X. et al., (2011), Effects of nitrogen sources on production and composition of sophorolipids by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol-91,issue 6, pg 1623–1632
 46. Cavaleiro, D.A. & Cooper, D.G., (2003), The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Journal of Biotechnology*. Vol-103,issue 1, pg 31–41
 47. Solaiman, D.K.Y. et al., (2007), Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnology Letters*. Vol-29,issue 9, pg 1341–1347
 48. Ribeiro, I.A. et al., (2013), Design of selective production of sophorolipids by *Rhodotorula bogoriensis* through nutritional requirements. *Journal of Molecular Recognition*. Vol-25,issue 11, pg 630–640
 49. Guilmanov, V. et al., (2002), Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol-77,issue 5, pg 489–494
 50. Davila, A.M., Marchal, R. & Vandecasteele, J.-P., (1994), Sophorose lipid production from lipidic precursors: Predictive evaluation of industrial substrates. *Journal of Industrial Microbiology*. Vol-13,issue 4, pg 249–257
 51. Shete, A.M. et al., (2006), Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol-65,issue February, pg 91–115
 52. Yoo, D.-S., Lee, B.-S. & Kim, E.-K., (2005), Characteristics of Microbial Surfactants as Antifungal Agent Against Plant Pathogenic Fungus. *Journal of Microbiological Methods*. Vol-15,issue 6, pg 1164–1169
 53. Vaughn, S.F. et al., (2014), Utilization of sophorolipids as biosurfactants for postemergence herbicides. *Crop Protection*. Vol-59, pg 29–34
 54. Kralova, I. & Sjöblom, J., (2009), Surfactants Used in Food Industry: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology*. Vol-30,issue 9, pg 1363–1383
 55. Allingham, R.P., (1971), Sophoroside Esteres in Prepared Food Products. Patent US 3.622.344, pg 12
 56. Akira, S. & Akira, Y., (1986), Method of Modifying Quality of Wheat Flour Product. Patent JP 61-205449A, pg 2

Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications

57. Van Boxstael, S. et al., (2013), Food safety issues in fresh produce: Bacterial pathogens, viruses and pesticide residues indicated as major concerns by stakeholders in the fresh produce chain. *Food Control*. Vol-32,issue 1, pg 190–197
58. Pierce, D. & Heilman, T.J., (2001), Germicidal composition. Patent US 6.262.038 B1. Vol-I,issue 12, pg 7
59. Dengle-Pulate, V. et al., (2014), Application of Sophorolipids Synthesized Using Lauryl Alcohol as Germicide and Fruit-Vegetable Wash. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. Vol-3,issue 7, pg 1630–1643
60. Yuan, B., Yang, S. & Chen, J., (2012), Antimicrobial Activity of Sophorolipids on Pathogenic Fungi Isolated from Fruits. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*. Vol-17,issue 3, pg 330–333
61. Rienzo, M.A.D. De et al., (2014), Antimicrobial properties of sophorolipids produced by *Candida Bombicola* ATCC 22214 against gram positive and Gram-negative bacteria. *New Biotechnology*. Vol-31,issue 6, pg S66–S67
62. Kim, K. et al., (2002), Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol-12,issue 2, pg 235–241
63. Banat, I.M. et al., (2010), Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol-87,issue 2, pg 427–444
64. Chen, J. et al., (2006), Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol-72,issue 1, pg 52–59
65. Fu, S.L. et al., (2008), Sophorolipids and their derivatives are lethal against human pancreatic cancer cells. *The Journal of Surgical Research*. Vol-148,issue 1, pg 77–82
66. Dengle-Pulate, V. et al., (2013), Antimicrobial and SEM Studies of Sophorolipids Synthesized Using Lauryl Alcohol. *Journal of Surfactants and Detergents*.
67. Sun, X.-X., Choi, J.-K. & Kim, E.-K., (2004), A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol-304,issue 1, pg 35–49
68. Lang, S., Katsiwela, E. & Wagner, F., (1989), Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat Science Technology*. Vol-91,issue 9, pg 363–366
69. Sanada, H. et al., (2014), Antifungal Effect of Non-Woven Textiles Containing Polyhexamethylene Biguanide with Sophorolipid: A Potential Method for Tinea Pedis Prevention. *Healthcare*. Vol-2,issue 2, pg 183–191
70. Gross, R.A. & Shah, V., (2007), Anti-herpes virus properties of various forms of sophorolipids. World patent 2007130738 A1, pg 6
71. Bluth, M.H. et al., (2006), Sophorolipids block lethal effects of septic shock in rats in a cecal ligation and puncture model of experimental sepsis. *Critical Care Medicine*. Vol-34,issue 1, pg E188
72. Hardin, R. et al., (2007), Sophorolipids improve sepsis survival: effects of dosing and derivatives. *The Journal of Surgical Research*. Vol-142,issue 2, pg 314–319
73. Hagler, M. et al., (2007), Sophorolipids decrease IgE production in U266 cells by downregulation of BSAP (Pax5), TLR-2, STAT3 and IL-6. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol-119,issue 1, pg 1030
74. Kasture, M.B. et al., (2007), Multiutility sophorolipids as nanoparticle capping agents: synthesis of stable and water dispersible Co nanoparticles. *Langmuir*. Vol-23,issue 23, pg 11409–11412
75. Dhasaiyan, P. et al., (2013), Influence of the sophorolipid molecular geometry on their self-assembled structures. *Chemistry, an Asian journal*. Vol-8,issue 2, pg 369–372
76. Dubey, P., Selvaraj, K. & Prabhune, A.A., (2013), Sophorolipids: In Self Assembly And Nanomaterial Synthesis. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. Vol-2,issue 3, pg 1107–1133
77. Imura, T. et al., (2014), Spontaneous Vesicle Formation from Sodium Salt of Acidic Sophorolipid and Its Application as a Skin Penetration Enhancer. *Journal of Oleo Science*. Vol-63,issue 2, pg 141–147
78. Ishii, N. et al., (2012), Transdermal administration of lactoferrin with sophorolipid. *Biochemistry and Cell Biology*. Vol-90,issue 3, pg 504–512
79. Dhar, S. et al., (2011), Cytotoxicity of sophorolipid-gellan gum-gold nanoparticle

Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications

- conjugates and their doxorubicin loaded derivatives towards human glioma and human glioma stem cell lines. *Nanoscale*. Vol-3,issue 2, pg 575–80
80. Lourith, N. & Kanlayavattanukul, M., (2009), Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *International Journal of Cosmetic Science*. Vol-31,issue 4, pg 255–261
 81. Borzeix, F., (2000), Sophorolipids as stimulating agent of dermal fibroblast metabolism. US Patent 6.057.302, pg 14
 82. Pellecier, F. & André, P., (2004), Cosmetic use of sophorolipids as subcutaneous adipose cushion regulation agents and slimming application. World patent 2004108063 A2, pg 11
 83. Hillion, G. et al., (1998), Use of a sophorolipid to provide free radical formation inhibiting activity or elastase inhibiting activity. US Patent 5.756.471 A, pg 9
 84. Maingault, M., (1999), Utilization of sophorolipids as therapeutically active substances or cosmetic products, in particular for the treatment of the skin. US Patent 5.981.497, pg 7
 85. Mager, H., Röthlisberger, R. & Wagner, F., (1986), Use of sophoroselipid-lactone for the treatment of dandruffs and body odour. European Patent EP0209783 A1, pg 8
 86. Ron, E.Z. & Rosenberg, E., (2002), Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol-13,issue 3, pg 249–252
 87. Schippers, C. et al., (2000), Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *Journal of Biotechnology*. Vol-83,issue 3, pg 189–198
 88. Mulligan, C.N., Yong, R.N. & Gibbs, B.F., (2001), Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *Journal of Hazardous Materials*. Vol-85,issue 1-2, pg 111–125
 89. Kang, S. W. et al., (2010), Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol-160,issue 3, pg 780–90
 90. Shibulal, B. et al., (2014), Microbial enhanced heavy oil recovery by the aid of inhabitant spore-forming bacteria: an insight review. *The Scientific World Journal*. Vol-2014, pg 12
 91. Elshafie, A. et al., (2013), Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Possible Application in Enhancing Oil Recovery. In 4 Th International Symposium on Applied Molecular Microbiology in Oil Systems (ISMOS). Rio de Janeiro, pp. 1–63
 92. Shafiei, Z. et al., (2014), Surface Active Components: Review. *Current Research Journal of Biological Sciences*. Vol-6,issue 2, pg 89–95
 93. Daverey, A. & Pakshirajan, K., (2010), Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. Vol-79,issue 1, pg 246–253
 94. Cooper, D.G. & Paddock, D.A., (1984), Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol-47,issue 1, pg 173–176
 95. Baviere, M., Degouy, D. & Lecourtier, J., (1994), Process for washing solid particles comprising a sophoroside solution. US Patent 5.326.407, pg 5
 96. Pesce, L., (2002), A biotechnological method for the regeneration of hydrocarbons from dregs and muds, on the base of biosurfactants. World patent 2002062495 A1, pg 10

5.3 ARTIGO SUBMISSÃO - PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Candida bombicola* ATTCC 22214 EM ALGINATO DE CÁLCIO

“ Produção de sofrorolipídeos por células imobilizadas de *Candida bombicola* ATTCC 22214 em alginato de cálcio”

Revista: Bioresource Technology

<https://www.journals.elsevier.com/bioresource-technology>

Fator de Impacto: 5.661 – Qualis: A1.

PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDEOS POR CÉLULAS DE *Candida bombicola* ATCC 22214

IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO

Marcos Roberto de Oliveira^{1,2}, Cristiani Baldo², Doumit Camilios-Neto²,
Cesar Augusto Tischer², Admilton Gonçalves de Oliveira Junior³,
Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{2*}

¹Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos, UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Brasil

²Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

³Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

* Autor para correspondência Tel.: +55 43 33714513 - E-mail: macelligoi@uel.br

Resumo

Os soforolipídeos são biossurfactantes produzidos por *Candida bombicola* ATCC 22214 e possuem um amplo campo de aplicação, porém o custo elevado de produção exige desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes, para torná-los competitivos. O objetivo desse trabalho foi produzir e verificar a composição estrutural dos soforolipídeos por *Candida bombicola*, imobilizada em alginato de cálcio. O processo de imobilização foi padronizado e a produção de soforolipídeos foi otimizada, por delineamento fatorial 4^{3-1} com os fatores glicose, óleo de girassol, K_2HPO_4 e $CaCl_2$. A imobilização celular foi confirmada por MEV e os soforolipídeos caracterizados por FTIR e MS. As condições ótimas de imobilização foram: 50 g/L células; 30 g/L de alginato de sódio; 0,1 mol/L de cloreto de cálcio; tempo de cura de 12 horas e tempo de fermentação de 96 horas. No processo de otimização a produção atingiu 8,458 g/L com uma eficiência de imobilização de 90,922% nas condições em (g/L): 30 glicose, 30 de óleo de girassol, 0,1 de extrato de levedura, 4,5 de K_2HPO_4 e 4,5 de $CaCl_2$. As células imobilizadas foram estáveis por 3 ciclos, mantendo a eficiência em torno de 70,7497 %. Os soforolipídeos apresentaram a composição estrutural de 72,21% de formas ácidas e 27,79% de formas lactônicas.

Palavras-chave: Soforolipídeos, *Candida bombicola*, imobilização celular; alginato de cálcio.

1 Introdução

Os soforolipídeos são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos, produzidos principalmente pela levedura não patogênica *Candida bombicola*

ATCC 22214. Estruturalmente são compostos por um dissacarídeo sefarose (2'-O- β -D-glicopiranosil-1- β -D-glicopiranosose) unidos por ligação β -glicosídica a uma longa cadeia de ácido graxo (Gorin et al., 1961). Estes biossurfactantes são um dos mais promissores conhecidos e oferecem diversas vantagens sobre os surfactantes sintéticos como: estabilidade em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade (Chandran and Das, 2012), baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica (Li et al., 2012); baixa espumabilidade com alta detergência (Hirata et al., 2009) e produção a partir de recursos renováveis (Pakshirajan and Sumalatha, 2010).

São produzidos como um mistura de formas acídicas e lactônicas, estando suas propriedades e aplicações diretamente relacionadas a estas estruturas. Formas lactônicas apresentam melhores atividades biológicas como: antimicrobiana (Hu and Ju, 2001), antitumoral (Shao et al., 2012), biomédica (Pontes et al., 2016) e nanotecnologia (Baccile et al., 2016). Formas acídicas apresentam maior capacidade espumante e hidrosolubilidade, com aplicações na agricultura (Ernenwein et al., 2015), alimentos (Zhang et al., 2016), cosméticos (Ishii et al., 2012), recuperação melhorada de petróleo (Elshafie et al., 2015) e biorremediação (Minucelli et al., 2017).

Apesar das inúmeras vantagens e aplicações que os soforolipídeos apresentam, o elevado custo de produção e recuperação, são obstáculos que comprometem a competitividade perante aos surfactantes tradicionais. Uma das estratégias que pode ser adotada para superar esses obstáculos é o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes e otimizados para obter uma alta produção com máxima recuperação do produto (Makkar et al., 2011; Nitschke et al., 2004).

Dentro destes bioprocessos, a imobilização celular apresenta algumas vantagens como: aumento da produtividade; redução de custos de manutenção de

equipamentos causados por adesão de células aos eletrodos, ductos e sensores; processos de separação mais simples; recuperação e reutilização das células; redução dos riscos de contaminação; proteção das células contra substâncias tóxicas e ou altas concentrações de substrato (Kourkoutas et al., 2004; Zhao and Xia, 2010; Zhou et al., 2009).

A imobilização celular por aprisionamento em matriz porosa de alginato de cálcio é o processo mais amplamente utilizado, devido a sua simplicidade técnica, com uma alta taxa de retenção celular, alta biocompatibilidade e baixo custo. Como o processo de geleificação ocorre rapidamente na presença de cátions divalentes (cálcio, bário e estrôncio) em condições amenas, a perda da viabilidade e atividade dos microrganismos imobilizados é praticamente inexistente (Duarte et al., 2013; Mohamad et al., 2015).

Sendo assim os objetivos deste trabalho foram: padronizar as condições da imobilização celular da levedura *Candida bombicola* em alginato de cálcio, otimizar o meio de fermentação para a produção de soforolipídeos através da avaliação conjunta da eficiência de imobilização e produção de soforolipídeos. Caracterizar estruturalmente os soforolipídeos nas condições otimizadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas e avaliar o processo de imobilização celular por microscopia eletrônica de varredura.

2 Material e Métodos

2.1 Microrganismo para imobilização

Candida bombicola ATCC 22214 adquirida da American Type Culture Collection (2013) mantidas em meio de preservação (g/L: 10 de glicose, 3 de extrato de levedura, 5 de peptona e 20 de ágar) a 4 °C.

2.2 Imobilização celular

A biomassa para imobilização foi obtida por cultivo em meio de inóculo (g/L: 100 de glicose, 10 de extrato de levedura e 1 de ureia) por 48 horas a 30 °C e 200 rpm. A interrupção da fermentação realizada por centrifugação a 8000 rpm, 4 °C por 10 minutos e a biomassa foi lavada com solução salina estéril (3x) (Ashby and Solaiman, 2010). A concentração de células foi calculada correlacionando o peso de biomassa seca por úmida (Vilela et al., 2013). A imobilização foi realizada através da homogeneização de 50 g/L de células úmidas com solução de alginato de sódio (2,5% m/v). A suspensão foi gotejada (bomba peristáltica) em uma solução de CaCl₂ 0,1 mol/L. As esferas com as células imobilizadas foram mantidas na solução de CaCl₂ 0,1 mol/L sob agitação a 4 °C por 24 horas. Antes das fermentações as esferas foram lavadas com solução salina (3x) para retirada de materiais em suspensão e células não aderidas (Ciani et al., 2015).

2.3 Produção de sofrorolipídeos por células de Candida bombicola imobilizadas em alginato de cálcio

Os parâmetros fixados para as fermentações foram: concentração de glicose e óleo de girassol em 100 g/L; inóculo de 10% (volume das células imobilizadas/volume do meio de fermentação); temperatura de 30 °C; velocidade 200 rpm e tempo de 120 horas. Os ensaios realizados em triplicata.

Os parâmetros de imobilização avaliados e padronizados foram: (A) - concentração de extrato de levedura [EXT] de 0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 g/L; (B) concentração de células imobilizadas [CEL] de 25; 50 e 75 g/L; (C) concentração de alginato de sódio [ALG] de 10; 20; 30; 40 e 50 g/L; (D) concentração de CaCl₂ [Ca⁺²] 0,05; 0,1; 0,15 e 0,2 mol/L, (E) Tempo de cura TC de 1; 6; 12 e 24 horas e (F) Ciclos de reutilização das esferas imobilizadas.

2.4 Otimização da produção de sofrorolipídeos por células de Candida bombicola imobilizadas em alginato de cálcio

A produção por células de *Candida bombicola* imobilizadas em alginato de cálcio foi realizada através de delineamento fatorial fracionado do tipo 3⁴⁻¹ com três repetições no ponto central. As variáveis testadas foram glicose – X₁ (30; 65 e 100 g/L), óleo de girassol- X₂ (30; 65 e 100 g/L), K₂HPO₄ - X₃ (1,5; 3,0 e 4,5 g/L) e CaCl₂ - X₄ (2,5; 3,5 e 4,5 g/L).

2.5 Ciclos de reutilização das células imobilizadas

Os ciclos de reutilização foram avaliados nas condições otimizadas. Ao final de cada ciclo de reutilização das esferas essas eram lavadas 3 vezes com solução salina estéril e transferidas para um novo meio de fermentação e incubadas para um próximo ciclo

2.6 Determinações analíticas

2.6.1 Biomassa imobilizada (X_i), biomassa livre (X_f) e eficiência de imobilização (Y_i)

Na interrupção das fermentações as esferas com células imobilizadas foram coletadas com peneira e submetidas a dissolução com citrato de sódio 0,5 mol/L por 30 minutos. Após a dissolução a suspensão foi centrifugada a 8000 rpm 4 °C por 10 minutos, lavada com salina (3x), quantificadas por gravimetria e denominada de biomassa imobilizada (X_i). Após a coleta das esferas com células imobilizadas, o meio de fermentação foi centrifugado a 8000 rpm 4 °C por 10 minutos, lavada com salina (3x), quantificadas por gravimetria e denominada de biomassa livre (X_f) (Pereira et al., 2014). A eficiência de imobilização - Y_i (%) é calculada pela razão da biomassa imobilizada (X_i em g/L) pela biomassa total ($X_i + X_f$ em g/L) X 100 (Vucurovic and Razmovski, 2012).

2.6.2. Extração e quantificação dos soforolipídeos produzidos (P_{sof})

Os soforolipídeos presentes no meio de fermentação foram submetido a três extrações consecutivas com acetato de etila (proporção 1:1) em funil de separação. A fase orgânica foi rotaevaporada sob pressão reduzida de 510 mmHg a 50 °C, e ao conteúdo obtido foi adicionado 25 mL de metanol:H₂O (4:1 v/v) e 25 mL de hexano. A fase metanol:H₂O foi extraída, seca a 60 °C até peso constante e o teor de soforolipídeos determinado por gravimetria g/L (P_{sof}) (Langer et al., 2006; Palme et al., 2010).

2.7 Caracterização estrutural dos soforolipídeos

Os soforolipídeos foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas. As análises por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier foram realizadas no espectrômetro IR Prestige 21 (Shimadzu), as

leituras foram conduzidas em transmitância, com sistema de resolução de 2 cm^{-1} , faixa de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ com 500 scans (Chandran and Das, 2011). As análises por Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas no Espectrômetro de RMN Bruker Mod. Avance III operando a 400 MHz para ^1H equipado com sonda multinuclear inversa (BBI) de 5 mm. O sistema de solvente foi $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (Clorofórmio deuterado/Metanol deuterado) (Smyth et al., 2010). As análises por Espectrometria de Massas foram realizadas no Espectrômetro de Massas com Analisador Híbrido Quadrupolo-Tempo de Voo – Bruker (Cologne Alemanha) – Modelo Compact Triple-Quadrupole ESI-OTFO II. O sistema solvente utilizado foi o metanol e as amostras analisadas por injeção direta. Os parâmetros da análise foram: ionização negativa por eletrospray, faixa de relação massa/carga (m/z) de 50 a 2000 Da, voltagem de 4,5 kV, temperatura capilar de $250\text{ }^\circ\text{C}$ e o fluxo do gás de dessolvatação de 50 L/h e nebulizador a 2 bar (Ribeiro et al., 2012; Smyth et al., 2010).

2.8 Caracterização das esferas com células imobilizadas de *Candida bombicola* por microscopia eletrônica de varredura

As esferas com células imobilizadas de *Candida bombicola* em alginato de cálcio nos tempos 0 (início da fermentação) e 96 horas (final da fermentação), foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. As esferas com células imobilizadas de *Candida bombicola* em alginato de cálcio foram fixadas com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0% e tampão cacodilato de sódio a 0,2 mol/L. Pós fixadas com tetróxido de ósmio 1%, desidratadas consecutivamente com álcool etílico (30 a 100% (v/v)), secas por ponto crítico (equipamento BAL-TEC CPD 030), metalizadas com ouro por vaporização (equipamento Bal-Tec SCD 050) e microfotografadas (FEI Quanta 200) (Najafpour et al., 2004; Singh and Satyanarayana, 2008; Yang et al., 2012).

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação dos parâmetros de imobilização

3.1.1 Avaliação da concentração de extrato de levedura – [EXT]

Embora ocorra em todos os sistemas imobilizados, o crescimento celular descontrolado na matriz de imobilização provoca um aumento da pressão mecânica interna,

causando deformação, desestabilização, liberação de células e até a descaracterização completa do sistema de imobilização (Willaert, 2010). O crescimento da *Candida bombicola* nas esferas de alginato de cálcio pode ser controlado através da concentração de extrato de levedura (fonte de nitrogênio). Neste ensaio foram avaliados os efeitos das concentrações de extrato de levedura ([EXT] 0; 0,1; 0,5 e 1 g/L) sobre a eficiência de imobilização (Y_i) e produção de soforolipídeos (P_{SOF}).

Os resultados (Figura 1A) mostraram que o aumento na [EXT], reduz a Y_i e aumenta a P_{SOF} . Para o ensaio [EXT] = 0,0 g/L observou-se a maior Y_i promovida pelo baixo crescimento celular e a menor P_{SOF} . Embora o extrato de levedura seja essencial para o crescimento celular, a baixa produção deve-se a ausência de vitaminas, cofatores enzimáticos e oligoelementos ou elementos traços como zinco, magnésio e ferro essenciais para a produção que estão presentes no extrato de levedura (Casas and García-Ochoa, 1999; Cooper and Paddock, 1984).

A alta concentração de extrato de levedura no ensaio [EXT]=1,0 promoveu o crescimento excessivo da biomassa imobilizada, aumentando a pressão interna sobre a matriz de imobilização levando a sua total destruição com a liberação total de biomassa para o meio de fermentação ($Y_i = 0,000\%$). O ensaio [EXT] = 0,5 g/L apresentou a maior produção pelas ECI, mas uma baixa Y_i , promovida pelo maior crescimento da biomassa livre. Para o ensaio [EXT]=0,1 observamos um alto valor de Y_i e para uma produção P_{SOF} significativa promovida pelas células imobilizadas e não pelas células livres no meio. Sendo assim a [EXT]=0,1 g/L foi fixada para os próximos ensaios.

3.1.2 Concentração de células imobilizadas – [CEL]

Nos processos fermentativos uma alta concentração celular proporciona um aumento na produção e rendimento para um determinado metabólito em um menor tempo (Rathore et al., 2013). Na avaliação da concentração de células imobilizadas [CEL], observou-se que no ensaio [CEL]=25 (Figura 1B) a baixa P_{SOF} (0,7644 g/L) e baixa Y_i (54,1986 %) é provocada pela alta proporção de gel que separa as células, que dificulta a formação de poros e difusão de nutrientes (Cheetham et al., 1985; Nikolić et al., 2010). A alta concentração de células imobilizadas [CEL]=75 apresenta também uma baixa P_{SOF} (0,5417 g/L), uma alta concentração de células imobilizadas, provoca uma alta pressão mecânica interna dificultando

a difusão de nutrientes pelos poros presentes na matriz (Bisht et al., 2013).

Para o ensaio [CEL]=50 a Y_i (74,7787 %) e a P_{SO_2} (2,3103 g/L) mostrou ser a melhor a condição em que a matriz permite a retenção de células juntamente com a difusão de nutrientes, portanto a concentração de células imobilizadas fixada em 50g/L para os próximos ensaios.

Nos processos fermentativos que envolvem células livres, existe uma relação cinética entre o crescimento, disponibilidade de nutrientes e formação de produtos. Para células imobilizadas, o comportamento, a cinética e o metabolismo de cada organismo imobilizado devem ser analisados e considerados caso a caso, pois também dependem das características do suporte utilizado (Cassidy et al., 1996; Güneşer et al., 2016).

3.1.3 Concentração de alginato de sódio [ALG]

A concentração de alginato de cálcio determina a rigidez, resistência mecânica e a capacidade de retenção da matriz de imobilização (Hubert et al., 2012). Na análise dos resultados da avaliação da concentração de alginato de sódio (Figura 1C), verificou-se que nos ensaios [ALG]=10 e [ALG]=20, a concentração de alginato utilizada foi baixa e as esferas com células imobilizadas apresentaram uma baixa resistência mecânica, para [ALG]=10 durante a fermentação ocorreu a despolimerização completa das esferas com células imobilizadas, para [ALG]=20 apresentou uma baixa resistência mecânica permitindo um maior crescimento da biomassa imobilizada e liberação de biomassa para o meio ($Y_i = 51,0893\%$).

Em baixas concentrações de alginato a malha formada apresenta baixa rigidez e os poros formados são grandes o suficiente para permitir o escape de células (Ahmedi et al., 2015). Um baixo valor de Y_i significa uma alta concentração de células livres o que leva a uma alta P_{SO_2} [ALG]=10 ($P_{SO_2} = 9,5954$ g/L) e [ALG]=20 ($P_{SO_2} = 5,412$ g/L).

Para os ensaios com maiores concentrações de alginato [ALG]=40 e [ALG]=50 observou-se respectivamente uma alta Y_i ($Y_i = 91,5671$ e $93,2269\%$) e uma baixa P_{SO_2} ($P_{SO_2} = 0,3561$ g/L e $0,4166$ g/L). Altas concentrações de alginato de sódio aumentam a resistência mecânica e rigidez das ECI, a ponto de provocar estrangulamento dos poros e causar problemas difusionais e limitação de transferência de massa (Cheetham et al., 1985; Penolazzi et al., 2009).

O ensaio [ALG]=30 apresentou uma $Y_i = 82,8956 \%$ e uma P_{SOF} de 2,5807 g/L. Esta [ALG] permite uma correta difusão de gases, nutrientes e metabólitos, com uma resistência mecânica e rigidez adequada que não permite o escape de células e nem a dissolução da esfera (Idris and Suzana, 2006; Penolazzi et al., 2009), sendo esta concentração fixada para os próximos ensaios.

3.1.4 Concentração de cloreto de cálcio [Ca^{+2}]

O cloreto de cálcio promove a geleificação do alginato de sódio através da substituição de cátions monovalentes (sódio) por divalentes (cálcio). Esta troca forma ligações iônicas intercadeias, a rede formada permite o aprisionamento de células em seu interior. A concentração do cloreto de cálcio é um dos fatores responsáveis pela resistência mecânica e rigidez da matriz de imobilização. O ensaio [Ca^{+2}]=0,050 (Figura 1D) apresentou um baixo valor de Y_i (52,6767 %) provocado pelo crescimento celular interno da ECI e também liberação de células para o meio, assim a quantidade de CaCl_2 utilizada não foi suficiente para promover a geleificação completa das ECI (Blandino et al., 1999). O ensaio [Ca^{+2}] = 0,100 mostrou Y_i de 86,8603 % e uma $P_{\text{SOF}} = 2,7190$ g/L, o aumento da concentração de CaCl_2 acima de 0,1 mol/L nos outros ensaios não influenciou os valores de Y_i e P_{SOF} . Portanto a concentração de CaCl_2 utilizado no processo de geleificação foi fixado em 0,1 mol/L.

3.1.5 Tempo de cura (TC)

O processo de geleificação do alginato de sódio é um processo tempo dependente e é conhecido como tempo de cura. A geleificação inicia-se da periferia para o interior da esfera, em uma velocidade elevada pois todos os sítios de ligações dos íons cálcio estão desocupados. Com o passar do tempo a espessura da camada de geleificação aumenta dificultando a difusão do CaCl_2 para o interior da esfera, o processo de geleificação é considerado completo com a geleificação do centro da esfera (Blandino et al., 1999).

Observa-se (Figura 1E) que para as ECI com TC de 1h, ao final da fermentação as ECI encontravam-se totalmente despolimerizadas ($Y_i = 0,000\%$). Para o TC de 6 h, o baixo valor de Y_i (67,9393 %) e alto de P_{SOF} (4,3820 g/L), deve-se a geleificação incompleta da ECI. Para os TC de 12 h e 24 h foram encontrados valores muito próximos de Y_i (83,1826 e 83,5930 %) e P_{SOF} (3,2373 e 3,2054 g/L), portanto, optou-se pelo menor TC (12 h).

3.1.6 Cinética de Produção de Soforolipídeos por Células de *Candida bombicola* imobilizadas em alginato de cálcio

Após definidos os parâmetros iniciais: 0,1g de extrato de levedura; concentração de células imobilizadas de 50 g/L; concentração de alginato de sódio de 30 g/L; concentração de CaCl₂ de 0,1 mol/L e tempo de cura de 12 horas. Realizou-se uma cinética de fermentação por 192 horas. Os resultados mostraram que após 96 horas a Y_i se estabiliza em torno de 82,0000 % com uma P_{SOF} média de 3,0500 g/L. Portanto, o tempo de fermentação de 96 horas foi fixado para os próximos ensaios.

3.2 Otimização do Meio de Produção de Soforolipídeos por Células Imobilizadas de *Candida bombicola* em alginato de cálcio.

Quatro variáveis foram otimizadas pelo delineamento fatorial fracionado do tipo 3⁴⁻¹ com três repetições no ponto central, Concentração de Glicose – X₁, Concentração de Óleo de Girassol - X₂, K₂HPO₄ - X₃ e CaCl₂ - X₄) e três níveis de variação. A Tabela 1 mostra o planejamento fatorial com as variáveis independentes e os valores resposta para Y_i e P_{SOF}. Para as variáveis X₁ e X₂ os níveis avaliados foram baseados na literatura, a maioria dos autores destacam que concentrações superiores a 100 g/L dessas fontes de carbono possuem um efeito negativo na P_{SOF} (Daverey and Pakshirajan, 2009; Gao et al., 2013; Minucelli et al., 2017). Para a variável X₃ e X₄ os níveis foram escolhidos através de um delineamento prévio (dados não publicados).

Foi observado na Tabela 1 que a maior Y_i = 91,9211 % (Ensaio 4) ocorreu no ensaio com a concentração superior de CaCl₂ (4,50 g/L) e as maiores Y_i (Ensaio 2, 9, 10 15 17 21, 23, 25 e 3) também ocorreram na concentração de 4,50 g/L. Nos níveis inferiores de CaCl₂ observamos as menores Y_i. Na análise estatística para a resposta Y_i (Tabela 2 a e b), o coeficiente de determinação (R²) foi de 0,9702 e a falta de ajuste não foi significativa (p=0,4433) validando o modelo para fins preditivos. O CaCl₂ (X₄) foi a única variável significativa na Y_i (p=0,0015) e apresentou um efeito positivo sobre a Y_i (p=0,001523). A Y_i foi modelada pela equação quadrática:

$$\hat{Y}_{(Y)} = 85,652940 - 0,0524074*(x_3) - 0,075819*(x_3^2) + 3,1893*(x_4) + 1,895415*(x_4^2) + 0,036631*(x_1*x_3) - 0,160978*(x_1*x_4) - 0,0406395*(x_2*x_3) - 0,191555*(x_2*x_4) + 0,252975*(x_3*x_4) + 0,575395$$

O aumento da concentração de cloreto de cálcio aumenta a Y_i e como um dos principais objetivos da imobilização celular é a reutilização das esferas com células imobilizadas, a adição de CaCl_2 ao meio de fermentação aumenta a estabilidade das esferas durante o processo fermentativo.

Analisando a variável resposta P_{SOF} foi observado que a maior P_{SOF} (9,2563 g/L) (Ensaio 3) ocorreu na concentração superior de K_2HPO_4 . Os maiores valores da P_{SOF} (Ensaio 6, 12, 15, 18, 21, 24 e 27) ocorreram no nível superior de K_2HPO_4 , em níveis inferiores K_2HPO_4 foi observado a menores P_{SOF} (Tabela1).

Na análise estatística para a produção de P_{SOF} (Tabela 2 c e d), a análise de variância as variáveis glicose (X_1), óleo de girassol (X_2) e K_2HPO_4 (X_3) e interação entre glicose e K_2HPO_4 foram significativas, com um coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9675 e a falta de ajuste não foi significativa ($p=0,1241$).

Os efeitos estimados (Tabela 2 d) para a P_{SOF} foram positivos para K_2HPO_4 (efeito=+3,6119, $p=0,0004$) e para a interação entre a glicose e o K_2HPO_4 (efeito=0,4646, $p=0,0410$) e negativos para a glicose (efeito=-0,8511, $p=0,0081$), óleo de girassol (efeito=-0,6204, $p=0,0150$) e a interação entre o K_2HPO_4 e CaCl_2 (efeito = -0,1748, $p=0,0337$). A produção de sofrorolipídeos foi modelada pela equação quadrática:

$$\hat{Y}_{(P)} = 7,331794 + 1,805966*(x_3) - 0,537602*(x_3^2) + 0,069433*(x_4) - 0,140635*(x_4^2) + 0,232349*(x_1*x_3) + 0,088649*(x_1*x_4) + 0,022229*(x_2*x_3) + 0,086262*(x_2*x_4) - 0,172642*(x_3*x_4) + 0,757694$$

A presença de duas fontes de carbono (hidrofóbica e hidrofílica) levam a maiores produções de sofrorolipídeos, porém concentrações elevadas inibem a produção explicando os efeitos negativos aqui apresentados pela glicose e óleo de girassol. Para um aumento na produção, estas fontes de carbono devem ser adicionadas de forma controlada e gradativa ou serem utilizadas em menores concentrações (Daverey and Pakshirajan, 2010; Vedaraman and Venkatesh, 2010).

O K_2HPO_4 é uma fonte de fósforo na forma de íons fosfato e está relacionado principalmente ao metabolismo energético. Em células livres o K_2HPO_4 influencia positivamente a produção de sofrorolipídeos, onde o metabolismo energético é muito ativo (Casas and García-Ochoa, 1999; Rispoli et al., 2010). Como ficou aqui demonstrado para células imobilizadas o K_2HPO_4 também estimula a P_{SOF} .

A Figura 2 mostra os valores de otimização conjunta da eficiência de

imobilização (Y_i) e produção de sofrorolipídeos (P_{SOF}). A condição otimizada foi predita com os níveis das variáveis glicose 30 g/L (-1); óleo de girassol 30 g/L (-1), K_2HPO_4 4,5 g/L (1) e $CaCl_2$ 4,5 g/L (1) e com valores para a Y_i de 91,7955% (intervalo de confiança de 90,417% a 93,174%) e para a P_{SOF} de 8,6649 g/L (intervalo de confiança de 8,0342 g e 9,2956 g). O modelo foi validado com cinco repetições na condição definida pela otimização conjunta. Os valores médios obtidos na validação foram para $Y_i = 90,9221\%$ e para a P_{SOF} 8,4580 g/L, valores estes que estão dentro do intervalo de confiança, não diferindo significativamente entre os valores preditos e observados. Os sofrorolipídeos produzidos nesta condição otimizada foram utilizados para a avaliação dos ciclos de reutilização das esferas de alginato de cálcio com células de *Candida bombicola* imobilizadas, para a análise estrutural por espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas e para a avaliação do processo de imobilização celular por microscopia eletrônica de varredura.

3.3 Ciclos de reutilização das esferas com células imobilizadas de Candida bombicola em alginato de cálcio para a produção de sofrorolipídeos

Uma das principais vantagens da imobilização celular é a reutilização das células imobilizadas por vários ciclos de produção do metabólito de interesse. Na reutilização o suporte deve manter sua resistência mecânica evitando deformações e ou rupturas das ECI. Os ciclos de reutilização foram fixados em 96 horas (96, 192, 288 e 384 h) e ao final de cada ciclo foi avaliada P_{SOF} . Para cada ciclo (Figura 1F) o valor da P_{SOF} foi de 9,0577, 8,8049, 7,246 e 1,5828 g/L respectivamente. A Y_i ao final do 3º ciclo foi de 70,7490 %, ao final do 4º ciclo, as ECI apresentavam sinais de deformação, fragilidade e fragmentação.

3.4 Caracterização Estrutural dos Sofrorolipídeos

3.4.1 Espectroscopia De Infravermelho Com Transformada De Fourier

Os sofrorolipídeos produzidos por células imobilizadas de *Candida bombicola* em alginato de cálcio nas condições otimizadas foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Figura 3). A banda apresentada em 3433 cm^{-1} corresponde ao estiramento O-H presentes tanto na cadeia dos ácidos graxos e na sefarse.

A banda 2926 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} mostra o estiramento simétrico (νsCH_2) e assimétrico (νasCH_2) dos grupamentos metileno. A banda de estiramento em 1744 cm^{-1} , indica a presença de lactonas C=O em grupamentos ésteres e ácidos carboxílicos dos SOF. A banda em 1447 cm^{-1} mostra a torção do grupamento C-O-H dos ácidos carboxílicos (-COOH), o que pode significar a presença de SOF na forma acídica. A banda de estiramento em 1247 cm^{-1} de grupamento C-O mostra a presença de acetil ésteres C(-O)- $^{\circ}\text{C}$, referente a presença de grupamentos acetilados na sefarose. A banda em 1157 cm^{-1} mostra o estiramento do grupamento C-O em do C(=O)-O-C das lactonas. A banda em 1048 cm^{-1} mostra o estiramento do C-O do grupamento C-O-H presente nos açúcares (sefarose) (Bajaj and Annapure, 2015; Hu and Ju, 2001).

3.4.2 Espectrometria de Massas

A Figura 4 apresenta o espectro de massas dos soforolipídeos produzidos por células de *Candida bombicola* immobilizadas em alginato de cálcio e a Tabela 4 mostra os tipos e as proporção estruturais da mistura de SOF produzidas. O espectro de massas a presença de de 11 íons moleculares (M^+H^+) com relação massa/carga de (m/z) de 621, 645, 661, 665, 677, 679, 685, 687, 689, 703, 705 e 707 Da. A maior intensidade do sinal ocorreu em 705 demonstrando a presença da estrutura acídica, $\text{C}_{18:1}$, diacetilada que corresponde a 30,21% da mistura de soforolipídeos. A proporção dos soforolipídeos produzidos por células immobilizadas das foi de 72,21% de formas acídicas e 27,79% de formas lactônicas, com relação ao grau de acetilação 88,82 % dos SOF são diacetilados, 9,37 % monoacetilados e 1,81 % desacetilados.

3.5 Avaliação das Esferas com Células Immobilizadas de *Candida bombicola* em Alginato de Cálcio por Microscopia Eletrônica de Varredura

A caracterização estrutural das esferas com células immobilizadas de *Candida bombicola* em alginato de cálcio nos tempos 0 e 96 h (Figura 5) inicialmente a superfície regular e homogênea das esfera (imagem A) e após 96h de fermentação a superfície apresenta irregularidades característicos da perda de rigidez da matriz de alginato de cálcio (imagem B). A imagem C mostra as células aprisionadas na matriz de alginato de cálcio e distribuídas de

maneira homogênea e não apresentam células livres na superfície, porém na imagem D após 96 h de fermentação notasse pequenos pontos refringentes mostrando a secreção de soforolipídeos, algumas células soltas da matriz de alginato sobre a superfície das esferas com células imobilizadas de *Candida bombicola* e a matriz de imobilização mostrando a perda de estabilidade. Essas células da superfície podem ser eliminadas por lavagens, não interferindo nos ciclos de reutilização (Covarrubias et al., 2012). A imagem E mostra o interior da esfera fraturada mostrando o aprisionamento homogênea das células de *Candida bombicola* e presença de poros, que facilitam a entrada de substrato e saída de produtos durante a fermentação (Razmovski and Vučurović, 2012). Na imagem F após 96 horas de fermentação observa-se que as células de *Candida bombicola* permaneceram firmemente aderidas e aprisionadas ao suporte de alginato e a secreção de soforolipídeos é observada. Esse aprisionamento permaneceu estável por três ciclos de reutilização.

4. Conclusão

O processo de imobilização de células de *Candida bombicola* em alginato de cálcio foi padronizado com relação a concentração de células imobilizadas (50 g/L), alginato de sódio (30 g/L) e cloreto de cálcio (0,1 mol/L), com tempo de cura das esferas de 12 horas e tempo de fermentação de 96 horas. Na otimização conjunta (Y_i/P_{SOF}) a eficiência de imobilização foi de 90,9220% e a produção de 8,4581 g/L no meio com glicose (30 g/L), óleo de girassol (30 g/L), extrato de levedura (0,1 g/L), K_2HPO_4 e $CaCl_2$ (4,5 g/L). A caracterização estrutural mostrou que aproximadamente 30,21 % dos soforolipídeos produzidos foram acídicos, $C_{18:1}$, diacetilados e na mistura 72,21 % dos soforolipídeos eram acídicos e 27,79 % lactônicos. A matriz de imobilização foi eficiente por três ciclos de reutilização com uma produção média por ciclo de 8,369 g/L de SOF.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES(PNPD), FINEP e Fundação Araucária pelo suporte financeiro, ao Laboratório de Espectroscopia (ESPEC), Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas e Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise (LMEM) pelas análises estruturais e microscopia eletrônica de varredura.

Referências

- Ahmedi, A., Abouseoud, M., Abdeltif, A., Annabelle, C., 2015. Effect of diffusion on discoloration of congo red by alginate entrapped turnip (*Brassica rapa*) peroxidase. *Enzyme Res.* 2015. doi:10.1155/2015/575618
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., 2010. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. *Biotechnol. Lett.* 32, 1429–1437. doi:10.1007/s10529-010-0310-0
- Baccile, N., Cuvier, A., Prévost, S., Stevens, C. V, Delbeke, E., Berton, J., Soetaert, W., Van Bogaert, I.N.A., Roelants, S., 2016. Self-Assembly Mechanism of pH-Responsive Glycolipids: Micelles, Fibers, Vesicles, and Bilayers. *Langmuir* acs.langmuir.6b02337. doi:10.1021/acs.langmuir.6b02337
- Bajaj, V.K., Annapure, U.S., 2015. Castor Oil as Secondary Carbon Source for Production of Sophorolipids Using *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069. *J. Oleo Sci.* 323, 315–323.
- Bisht, D., Yadav, S.K., Darmwal, N.S., 2013. Optimization of immobilization conditions by conventional and statistical strategies for alkaline lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* mutant cells: Scale-up at bench-scale bioreactor level. *Turkish J. Biol.* 37, 392–404. doi:10.3906/biy-1209-19
- Blandino, a N. a, Macias, M., Canter, D., 1999. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules : Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics. *J. Biosci.* 88, 686–689. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87103-0
- Casas, J.A., García-Ochoa, F., 1999. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 488–494.
- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J.T., 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *J. Ind. Microbiol.* 16, 79–101. doi:10.1007/BF01570068
- Chandran, P., Das, N., 2012. Role of Sophorolipid Biosurfactant in Degradation of Diesel Oil by *Candida tropicalis*. *Bioremediat. J.* 16, 19–30. doi:10.1080/10889868.2011.628351
- Chandran, P., Das, N., 2011. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. *Int. J. Sci. Nat.* 2, 63–71.
- Cheetham, P.S.J., Garrett, C., Clark, J., 1985. Isomaltulose production using immobilized cells. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 471–481.
- Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., Comitini, F., Vita, S., 2015. Sequential fermentation using non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine, in: *BIOWeb of Conferences* 3. pp. 2014–2016. doi:10.1051/bioconf/20140302015
- Cooper, D.G., Paddock, D.A., 1984. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 173–176.
- Covarrubias, S.A., De-Bashan, L.E., Moreno, M., Bashan, Y., 2012. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2669–2680. doi:10.1007/s00253-011-3585-8
- Daverey, A., Pakshirajan, K., 2010. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 79, 246–253. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.002
- Daverey, A., Pakshirajan, K., 2009. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media (a). *Food Res. Int.* 42, 499–504.

- doi:10.1016/j.foodres.2009.01.014
- Duarte, J.C., Rodrigues, J.A., Moran, P.J., Valenca, G.P., Nunhez, J.R., 2013. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express* 3, 31. doi:10.1186/2191-0855-3-31
- Elshafie, A.E., Joshi, S.J., Al-Wahaibi, Y.M., Al-Bemani, A.S., Al-Bahry, S.N., Al-Maqbali, D., Banat, I.M., 2015. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Potential Application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01324
- Ernenwein, C., Reynaud, R., Guilleret, A., Podevin, L., Rannou, A., Lafosse, F., 2015. Biosolubilizer. US Pat. 2015/0150251A1 14.
- Gao, R., Falkeborg, M., Xu, X., Guo, Z., 2013. Production of sophorolipids with enhanced volumetric productivity by means of high cell density fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1103–1111. doi:10.1007/s00253-012-4399-z
- Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T., Tulloch, A.P., 1961. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. *Can. J. Chem.* 39, 846–855.
- Güneşer, O., Karagül-Yüceer, Y., Wilkowska, A., Kregiel, D., 2016. Volatile metabolites produced from agro-industrial wastes by Na-alginate entrapped *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian J. Microbiol.* 47, 965–972. doi:10.1016/j.bjm.2016.07.018
- Hirata, Y., Ryu, M., Igarashi, K., Nagatsuka, A., Furuta, T., Kanaya, S., Sugiura, M., 2009. Natural synergism of acid and lactone type mixed sophorolipids in interfacial activities and cytotoxicities (a). *J. Oleo Sci.* 58, 565–572.
- Hu, Y., Ju, L.-K., 2001. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *J. Biotechnol.* 87, 263–272. doi:10.1016/S0168-1656(01)00248-6
- Hubert, J., Plé, K., Hamzaoui, M., Nuissier, G., Hadeif, I., Reynaud, R., Guilleret, A., Renault, J.-H., 2012. New perspectives for microbial glycolipid fractionation and purification processes. *Comptes Rendus Chim.* 15, 18–28. doi:10.1016/j.crci.2011.11.002
- Idris, A., Suzana, W., 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem.* 41, 1117–1123. doi:10.1016/j.procbio.2005.12.002
- Ishii, N., Kobayashi, T., Matsumiya, K., Ryu, M., Hirata, Y., Matsumura, Y., Suzuki, Y.A., 2012. Transdermal administration of lactoferrin with sophorolipid. *Biochem. Cell Biol.* 90, 504–512. doi:10.1139/o11-065
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A., 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiol.* 21, 377–397. doi:10.1016/j.fm.2003.10.005
- Langer, O., Palme, O., Wray, V., Tokuda, H., Lang, S., 2006. Production and modification of bioactive biosurfactants. *Process Biochem.* 41, 2138–2145. doi:10.1016/j.procbio.2006.07.036
- Li, H., Ma, X.-J., Shao, L.-J., Shen, J., Song, X., 2012. Enhancement of sophorolipid production of *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576 by low-energy ion beam implantation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 510–523. doi:10.1007/s12010-012-9664-1
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1, 19. doi:10.1186/2191-0855-1-5
- 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., 2017. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC

- 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. *Waste and Biomass Valorization* 8, 743–753. doi:10.1007/s12649-016-9592-3
- Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A., 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Equip.* 29, 205–220. doi:10.1080/13102818.2015.1008192
- Najafpour, G., Younesi, H., Syahidah Ku Ismail, K., 2004. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 92, 251–260. doi:10.1016/j.biortech.2003.09.009
- Nikolić, S., Mojović, L., Pejin, D., Rakin, M., Vukašinović, M., 2010. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biomass and Bioenergy* 34, 1449–1456. doi:10.1016/j.biombioe.2010.04.008
- Nitschke, M., Ferraz, C., Pastore, G.M., 2004. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian J. Microbiol.* 35, 81–85.
- Pakshirajan, K., Sumalatha, S., 2010. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. *Clean Technol. Environ. Policy* 13, 481–488. doi:10.1007/s10098-010-0330-4
- Palme, O., Comanescu, G., Stoineva, I., Radel, S., Benes, E., Develter, D.W.G., Wray, V., Lang, S., 2010. Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 663–673. doi:10.1002/ejlt.200900163
- Penolazzi, L., Ph, D., Tavanti, E., Vecchiatini, R., Lambertini, E., Vesce, F., Gambari, R., Mazzitelli, S., Mancuso, F., Luca, G., Nastruzzi, C., Piva, R., 2009. Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells from Wharton ' s Jelly in Alginate Microbeads. *Methods* 15. doi:DOI 10.1089/ten.tec.2008.0582
- Pereira, A.P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J.M., Estevinho, L.M., Mendes-Faia, A., 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *LWT - Food Sci. Technol.* 56, 21–30. doi:10.1016/j.lwt.2013.11.005
- 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? *Int. J. Pharm.* 513, 697–708. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.09.074
- Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng, P.W.S., 2013. Microencapsulation of microbial cells. *J. Food Eng.* 116, 369–381. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022
- Razmovski, R., Vučurović, V., 2012. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. *Fuel* 92, 1–8. doi:10.1016/j.fuel.2011.07.046
- Ribeiro, I.A., Bronze, M.R., Castro, M.F., Ribeiro, M.H.L., 2012. Sophorolipids: improvement of the selective production by *Starmerella bombicola* through the design of nutritional requirements (a). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1875–1887. doi:10.1007/s00253-012-4437-x
- Rispoli, F.J., Badia, D., Shah, V., 2010. Optimization of the fermentation media for sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design. *Biotechnol. Prog.* 26, 938–44. doi:10.1002/btpr.399
- Shao, L., Song, X., Ma, X.-J., Li, H., Qu, Y., 2012. Bioactivities of sophorolipid with different structures against human esophageal cancer cells. *J. Surg. Res.* 173, 286–91. doi:10.1016/j.jss.2010.09.013
- Singh, B., Satyanarayana, T., 2008. Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum*

- thermophile in solid state fermentation and its potential applications. *Bioresour. Technol.* 99, 2824–2830. doi:10.1016/j.biortech.2007.06.010
- Smyth, T.J.P., Perfumo, A., Marchant, R., Banat, I.M., 2010. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (b), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-77587-4
- Vedaraman, N., Venkatesh, N., 2010. The effect of medium composition on the production of sophorolipids and the tensiometric properties by *Starmerella bombicola* MTCC 1910. *Polish J. Chem. Technol.* 12, 9–13. doi:10.2478/v10026-010-0011-4
- Vilela, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Côrte-Real, M., 2013. Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4991–5000. doi:10.1007/s00253-013-4719-y
- Vucurovovic, V.M., Razmovski, R.N., 2012. Sugar beet pulp as support for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* 39, 128–134. doi:10.1016/j.indcrop.2012.02.002
- Willaert, R., 2010. Cell Immobilization: Engineering Aspects. *Encycl. Ind. Biotechnol.*
- Yang, X., Zhu, L., Xue, C., Chen, Y., Qu, L., Lu, W., 2012. Recovery of purified lactonic sophorolipids by spontaneous crystallization during the fermentation of sugarcane molasses with *Candida albicans* O-13-1. *Enzyme Microb. Technol.* 51, 348–353. doi:10.1016/j.enzmictec.2012.08.002
- 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. doi:10.1016/j.foodcont.2015.07.026
- Zhao, J., Xia, L., 2010. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. *Biochem. Eng. J.* 49, 28–32. doi:10.1016/j.bej.2009.11.007
- Zhou, L.C., Li, Y.F., Bai, X., Zhao, G.H., 2009. Use of microorganisms immobilized on composite polyurethane foam to remove Cu(II) from aqueous solution. *J. Hazard. Mater.* 167, 1106–1113. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.118

Figura 1 – Avaliação dos parâmetros [EXT], [CEL], [ALG], [Ca²⁺], TC E CR na imobilização de células de *Candida bombicola* em alginato de cálcio para a produção de sofrorolipídeos

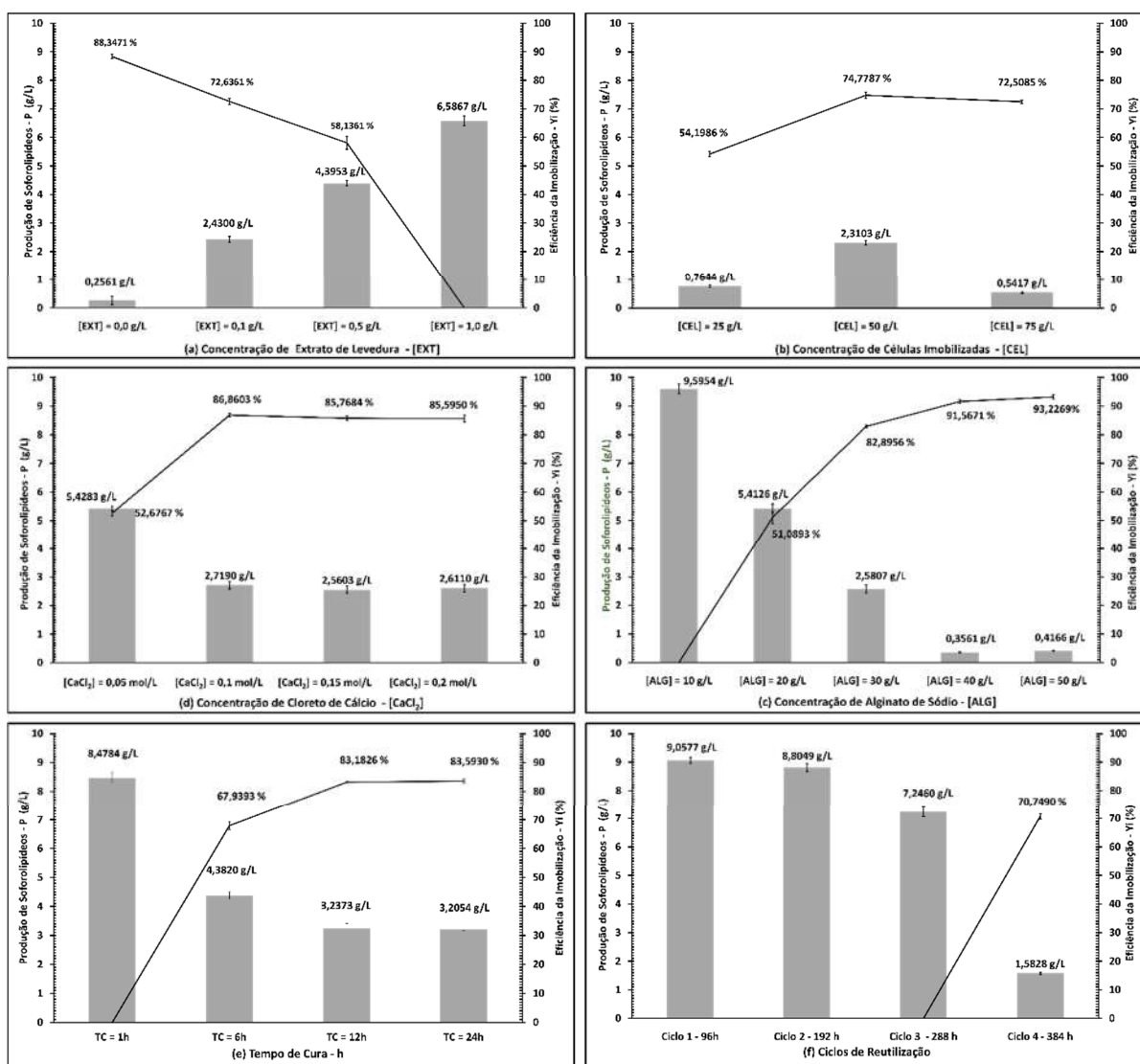


Figura 2 - Otimização conjunta da eficiência de imobilização (Y_i) e produção de soforolipídeos (P_{SOF}) por *Candida bombicola* imobilizada em alginato de cálcio

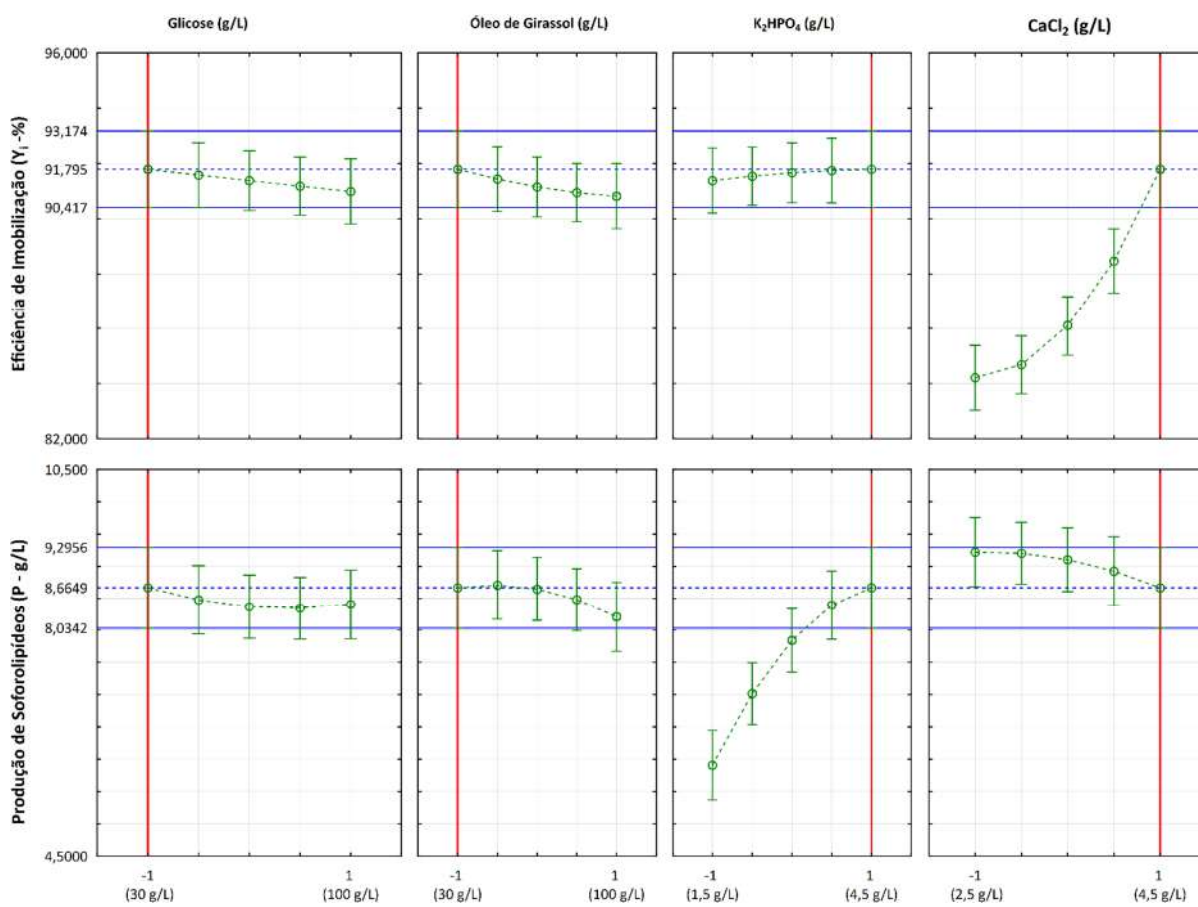


Figura 3 – Espectro de FTIR dos sofrorolípídeos produzidos por *Candida bombicola* imobilizada em alginato de cálcio

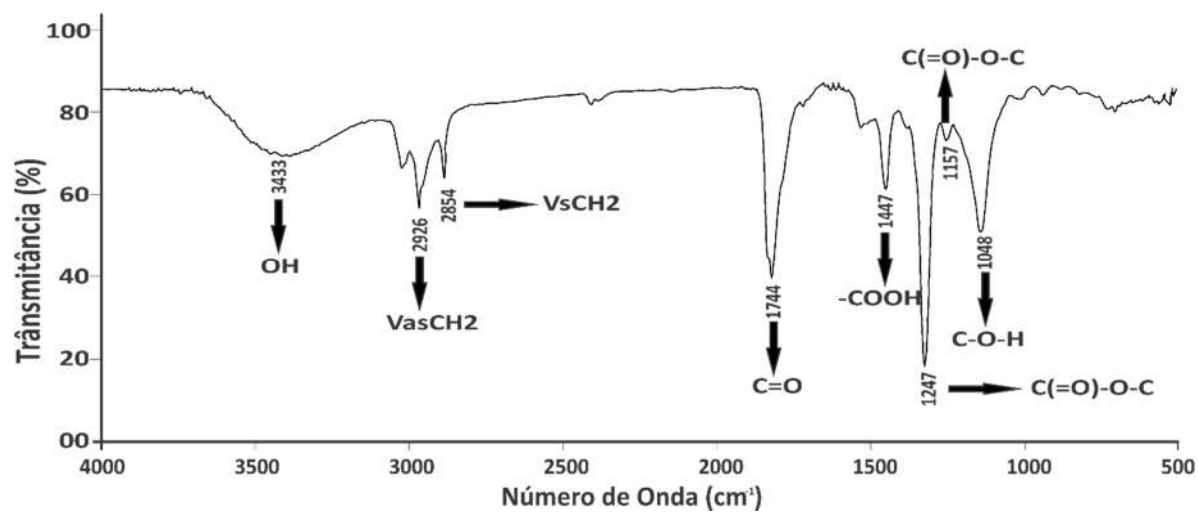


Figura 4 – Espectro de massas dos sofrorolípídeos produzidos por *Candida bombicola* imobilizada em alginato de cálcio

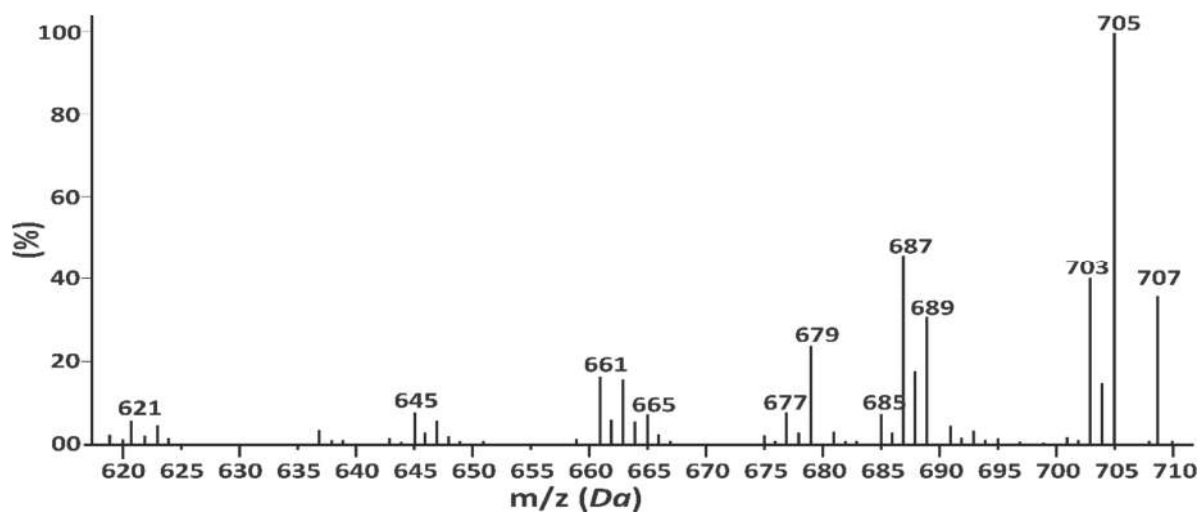


Figura 5 – Caracterização por microscopia eletrônica de varredura das esferas de alginato de cálcio com células de *Candida bombicola*, nos tempos 0 horas e 96 horas de fermentação

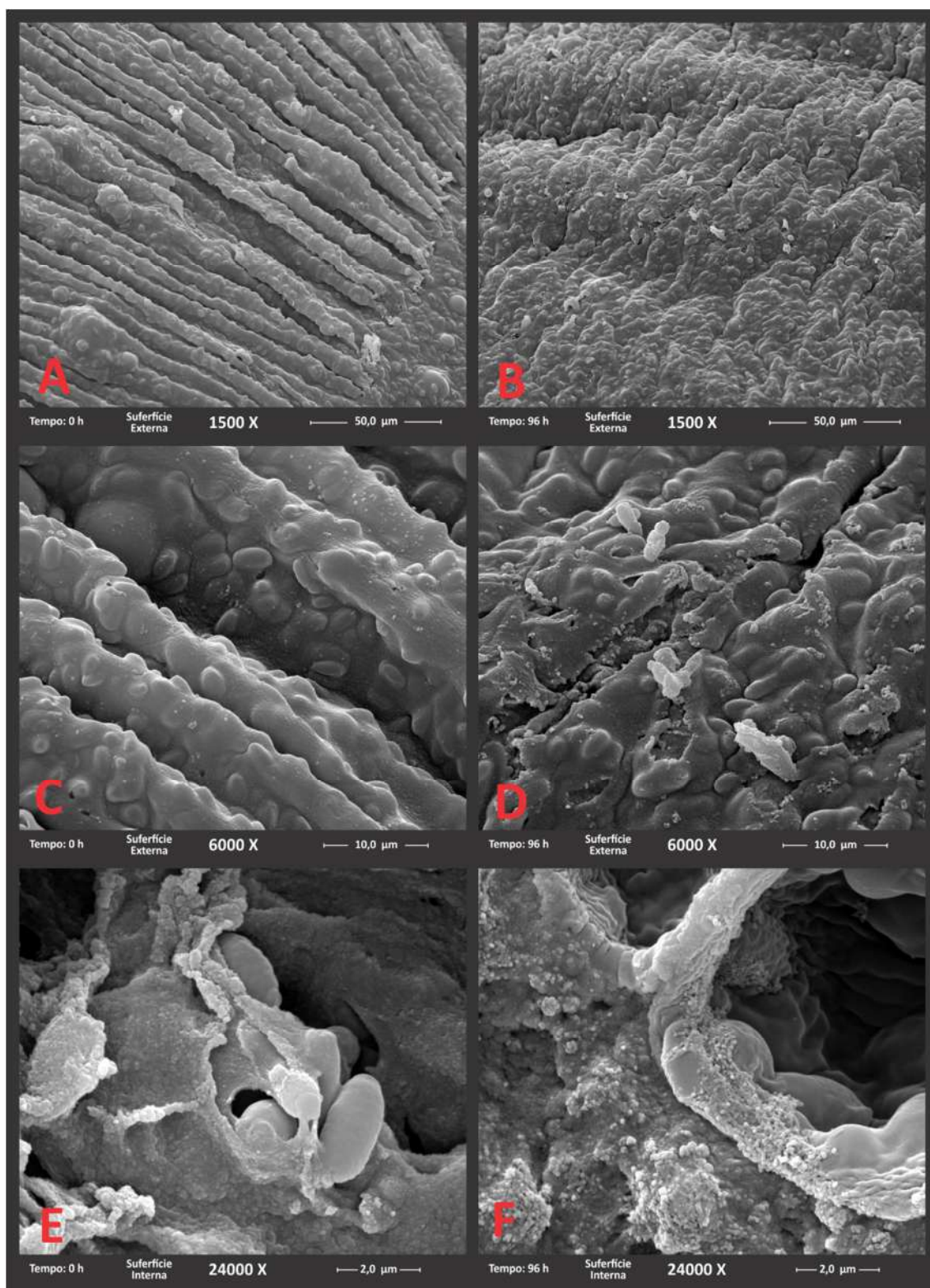


Tabela 1 – Resultados da eficiência de imobilização (Y_i) e produção de soforolipídeos (P_{SOF}) obtidos pelo delineamento fatorial fracionado do tipo 3^{4-1} .

Ensaio	Variáveis Codificadas				Respostas	
	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_i (%)	P_{SOF} (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	84,8488	5,8301
2	-1	-1	0	1	91,6513	7,9941
3	-1	-1	1	0	86,5148	9,2563
4	-1	0	-1	1	91,9211	5,8298
5	-1	0	0	0	85,4561	7,6495
6	-1	0	1	-1	83,6441	8,7934
7	-1	1	-1	0	84,9231	5,5692
8	-1	1	0	-1	84,9746	7,5716
9	-1	1	1	1	90,3014	7,7844
10	0	-1	-1	1	90,2108	4,9799
11	0	-1	0	0	85,1375	7,2941
12	0	-1	1	-1	84,4171	8,6615
13	0	0	-1	0	85,6377	4,8282
14	0	0	0	-1	84,0278	7,2503
15	0	0	1	1	90,624	8,5997
16	0	1	-1	-1	84,9793	3,2541
17	0	1	0	1	90,9950	7,0136
18	0	1	1	0	86,2945	8,5698
19	1	-1	-1	0	86,1614	4,6447
20	1	-1	0	-1	84,2963	6,9015
21	1	-1	1	1	91,2192	8,5598
22	1	0	-1	-1	84,5887	4,5885
23	1	0	0	1	90,4942	6,8332
24	1	0	1	0	85,0804	8,3142
25	1	1	-1	1	89,7218	4,5035
26	1	1	0	0	85,7981	6,2757
27	1	1	1	-1	83,9538	7,9967
28	0	0	0	0	86,1249	7,5843
29	0	0	0	0	85,1686	7,2653
30	0	0	0	0	86,0377	7,4831

		Variáveis Decodificadas		
Variáveis		-1	0	+1
x_1	Glicose (g/L)	30,0	65,0	100,0
x_2	Óleo de Girassol (g/L)	30,0	65,0	100,0
x_3	K_2HPO_4 (g/L)	1,50	3,00	4,50
x_4	$CaCl_2$ (g/L)	2,50	3,50	4,50

Tabela 2 - Análise de variância e efeitos estimados para a variáveis resposta – Y_i e P_{SOF}

(a) Análise de Variância - Y_i (%)					
$R^2 = 0,97029$; $R^2_{ajustado} = 0,94257$					
Fatores	Soma quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Fcal	p
CaCl ₂ (L)	183,0941	1	183,0941	654,9011	0,0015 *
CaCl ₂ (Q)	24,2500	1	24,2500	86,7388	0,0113 *
Falta de Ajuste	5,9294	13	0,4561	1,6314	0,4433
Erro Puro	0,5592	2	0,2796		
Soma Total	218,4233	29			

(b) Efeitos Estimados – Y_i (%)					
Fatores	Efeito	Desvio Padrão	t	p	Intervalo de Confiança
Intercepto	86,9720	0,09889	879,4759	0,0000	86,7122 87,2311 *
CaCl ₂ (L)	6,3786	0,2492	25,5910	0,0015	5,7218 7,0355 *
CaCl ₂ (Q)	-1,8954	0,2035	-9,3133	0,0113	- 2,4279 -1,3649 *

(c) Análise de Variância P_{SOF} (g/L)					
$R^2 = 0,96754$; $R^2_{ajustado} = 0,93725$					
Fatores	Soma quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Fcal	p*
Glicose (L)	3,2598	1	3,2598	122,6380	0,0080*
Óleo (L)	1,7320	1	1,7320	65,1630	0,0150*
K ₂ HPO ₄ (L)	58,7073	1	58,7072	2208,6180	0,0004*
K ₂ HPO ₄ (Q)	1,9508	1	1,9508	73,3930	0,0133*
Glicose (L) x K ₂ HPO ₄ (L)	0,6073	1	0,6073	22,8490	0,0411*
Falta de Ajuste	2,2962	13	0,1766	4,4020	0,1242
Erro Puro	0,1204	3	0,0401		
Soma Total	70,6340	30			

(d) Efeitos Estimados (P) (g/L)					
Fatores	Efeito	Desvio Padrão	t	p*	Intervalo de Confiança*
Intercepto	6,8771	0,0305	225,5369	0,0000	6,9185 7,5206 *
K ₂ HPO ₄ (L)	3,6119	0,0769	46,9959	0,0004	1,6819 1,9190 *
Glicose (L)	-0,8511	0,0769	-11,0742	0,0081	-0,5387 -0,3015 *
Óleo (L)	-0,6204	0,0769	-8,0724	0,0150	-0,4232 -0,1861 *
K ₂ HPO ₄ (Q)	0,5376	0,0627	8,5670	0,0133	-0,7167 -0,2953 *
Glicose (L) x K ₂ HPO ₄ (L)	0,4647	0,09721	4,7800	0,0411	0,0946 0,3877 *
K ₂ HPO ₄ (L) x CaCl ₂ (L)	-0,1748	0,0602	-2,9014	0,0337	-0,3297 -0,0199 *
Óleo (Q)	0,2163	0,08183	2,6436	0,0457	0,0059 0,4267 *

*Significante ao nível de $p < 0,05$ para um intervalo de confiança de 95%

Tabela 3 – Análise por espectrometria de massas da estrutura e proporção estrutural dos sofrorolipídeos produzidos por células de *Candida bombicola* imobilizadas em alginato de cálcio

Massa [M ⁺ H]	Estrutura	Abundância Relativa (%)	Proporção estrutural %
621	Acídica, C18:1, Desacetilada	6	1,81%
645	Lactônica, C18:1, Monoacetilada	8	2,42%
661	Acídica, C18:2, Monoacetilada	16	4,83%
665	Acídica, C18:1, Monoacetilada	7	2,11%
677	Acídica, C16:1, Diacetilada	8	2,42%
679	Acídica, C16:0, Diacetilada	24	7,25%
685	Lactônica, C18:2, Diacetilada	7	2,11%
687	Lactônica, C18:1, Diacetilada	46	13,90%
689	Lactônica, C18:0, Diacetilada	31	9,37%
703	Acídica, C _{18:2} , Diacetilada	40	12,08%
705	Acídica, C _{18:1} , Diacetilada	100	30,21%
707	Acídica, C _{18:0} , Diacetilada	38	11,48%

5.4 DEPÓSITO DE PATENTE - MICROENCAPSULAÇÃO CELULAR POR ALGINATO DE SÓDIO DE LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA PARA A PRODUÇÃO DE SOFOROLÍPÍDEOS PRODUÇÃO DE SOFOROLÍPÍDEOS POR CÉLULAS IMOBILIZADAS

Solicitado depósito em 07 de julho de 2017 pelo Escritório de Propriedade Intelectual da Agência de Inovação da Universidade Estadual de Londrina, intitulada: “Microencapsulação celular por alginato de sódio de leveduras do gênero Candida para a produção de sofrorolípídeos” a patente esta sendo depositada pelo Escritório de Propriedade Intelectual da Agência de Inovação da Universidade Estadual de Londrina”.

<https://jas.uel.br/Protocolo-war/>

The screenshot displays the 'Resultado da Pesquisa' (Search Results) page of the UEL protocol system. The header includes the UEL logo and 'SISTEMAS UEL'. The search results section shows the following details:

- Número do Protocolo: 14555.2017.64
- Data de Abertura: 07/07/2017
- Interessado: MARIA ANTONIA PEDRINE COLABONE CELLIGOI
- Assunto: PARECER PARA DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE
- Onde está: AINTEC em 15/08/2017 Telefone: Não disponível

Below the details is a 'Histórico de Tramitação' (Tramitation History) table with the following data:

Sequência	Data	Local De	Local Para	Tramitação
9	15/08/2017	AINTEC	AINTEC	RETIDO EM
8	14/08/2017	GR	AINTEC	ENVIADO PARA
7	14/08/2017	GR	GR	PROVIDENCIADO EM
6	11/08/2017	AINTEC	GR	RETIDO EM
5	10/08/2017	GR	AINTEC	PROVIDENCIADO EM

At the bottom of the screenshot, there is a yellow document image with the following text:

Universidade Estadual de Londrina
Divisão de Comunicação e Arquivo

Processo: 14555.2017.64

Data Abertura: 07/07/2017 - 10:37:28

Interessado:
MARIA ANTONIA PEDRINE COLABONE CELLIGOI

Título:
PARECER PARA DEPOSITO DE PEDIDO DE PATENTE

Para informações, guarde este comprovante.



Escritório de Propriedade Intelectual

FORMULÁRIO DE DECLARAÇÃO DE INVENÇÃO

O Formulário de Declaração de Invenção (FDI) deve ser usado por professores, funcionários e alunos da UEL e pelas empresas da Intuel/Aintec para declarar a criação de uma invenção e solicitar sua propriedade intelectual.

Após o preenchimento do FDI coloque-o em envelope fechado, protocole na UEL (na ASUEL) endereçando-o para:

AINTEC/UEL

Escritório de Propriedade Intelectual – EPI

Com isto sua Declaração de Invenção fica oficialmente registrada e será enviados ao Escritório de Propriedade Intelectual (EPI) da Aintec para análise, parecer e outras providências.

Os inventores devem ler os documentos sobre a Política de Propriedade Intelectual da UEL, no endereço www.aintec.uel.br/aintec/legislação.

Havendo dúvidas no preenchimento da FDI contate o EPI da Aintec pelo e-mail: aintecepi@uel.br



Escritório de Propriedade Intelectual

1. INFORMAÇÃO PESSOAL	
Nome para contato: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi	
Depto. na UEL./Empresa: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE	
Tel: (43) 3371-4270	e-mail: macelligoi@uel.br

2. TÍTULO PROPOSTO PARA A INVENÇÃO: Microencapsulação celular por alginato de sódio de leveduras do gênero <i>Candida</i> para a produção de soforolipídeos
Palavras-chave: Soforolipídeos, <i>Candida</i> , imobilização, microencapsulação, alginato

3. ÁREA/SUB-ÁREA/ESPECIALIDADE DA INVENÇÃO (SE SOUBER): Biotecnologia
--

4. CAMPO DA INVENÇÃO. ESTA INVENÇÃO DIZ RESPEITO FUNDAMENTALMENTE A: A presente invenção refere-se ao processo de imobilização celular por microencapsulação com alginato de sódio de leveduras do gênero <i>Candida</i> para a produção de soforolipídeos que se destaca pela ampla aplicação industrial.

5. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO
5.1. Descreva o problema ou desafio técnico que a presente invenção se propõe a solucionar:
Os surfactantes são compostos anfipáticos ou anfifílicos constituídos de uma porção hidrofóbica/apolar e uma porção hidrofílica/polar, que permite que compostos apolares sejam solubilizados em solventes polares ou vice-versa (óleo/água ou água/óleo). Sua estrutura anfipática confere aos surfactantes diversas propriedades como detergentes, dispersantes, umectantes, espumantes, estabilizantes, emulsificantes, solubilizantes e lubrificantes (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2002; GAUTAM; TYAGI, 2006).
Estes compostos podem ser utilizados em diversos setores como químico, têxtil, papel e celulose, cosméticos, farmacêutico, higiene pessoal, agrícola e alimentos. O mercado global de surfactantes é um dos maiores e de grande importância dentro da classe dos compostos químicos industriais (ABOULHASSAN et al., 2006; REZNIK et al., 2010). Esse mercado foi avaliado em US\$30,65 bilhões em 2015, com um crescimento constante de



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



AINTEC
AGÊNCIA DE INOVAÇÃO - UEL

Escritório de Propriedade Intelectual

4,4% estimando chegar em 2024 ao valor de US\$45,16 bilhões (ACMITE MARKET INTELLIGENCE, 2016; GRAND VIEW RESEARCH, 2016).

Os surfactantes são produzidos pela indústria petroquímica e são produtos derivados da cadeia da produção do petróleo. Devido a grande utilização uma considerável quantidade de surfactantes é liberada no meio ambiente levando a problemas de poluição ambiental, devido a uma baixa taxa de biodegradação e uma alta toxicidade aquática (MANN; BIDWELL, 2001). Contudo, existe uma tendência mundial em substituir os surfactantes de origem petroquímica por surfactantes naturais, denominados como biossurfactantes. Esta tendência deve-se principalmente : (a) superioridade dos biosurfactantes devido as suas propriedades; (b) crescente preocupação ambiental, (c) leis ambientais mais severas e (d) utilização da recursos renováveis para a produção (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2003; BOGAERT, VAN et al., 2007).

Os biossurfactantes são surfactantes naturais produzidos por microrganismos, que possuem propriedades muito semelhantes aos surfactantes de origem petroquímica e são superiores, especialmente, pela sua natureza ecológica e sustentável (NGUYEN et al., 2010; PENFOLD et al., 2011). Dentre os biossurfactantes os soforolipídeos são compostos por um dissacarídeo sefarose (2'-O-β-D-glicopiranosil-1-β-D-glicopiranosose) unidos por ligação β-glicosídica a uma longa cadeia de ácido graxo (GORIN et al., 1961).

Os soforolipídeos são um dos mais promissores biossurfactantes conhecidos e oferecem diversas vantagens sobre os surfactantes sintéticos ou de origem petroquímica como: estabilidade em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade (CHANDRAN; DAS, 2012), baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica (BAEK et al., 2003; LI et al., 2012), podem ser produzidos em grandes quantidades (PEKIN et al., 2005), possuem baixa capacidade de formação de espuma e alta detergência que facilita a sua aplicação em diversas áreas (HIRATA et al., 2009) e podem ser produzidos a partir de recursos renováveis (ZHOU; KOSARIC, 1995) ou resíduos industriais (ASHBY et al., 2005).

Encontram aplicações em diversas áreas como: Agricultura (YOO et al., 2005); Alimentos (YUAN et al., 2012); Biomédica (HARDIN et al., 2007); Biorremediação (KANG et al., 2010), Cosméticos (NGUYEN; SABATINI, 2011) e Indústria Petrolífera (ELSHAFIE et al., 2013).

Apesar das inúmeras vantagens e aplicações que os soforolipídeos possuem sobre os surfactantes sintéticos, a produção em larga escala e o processo de

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário - CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina -

Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



AINTEC
AGÊNCIA DE INOVAÇÃO - UEL

Escritório de Propriedade Intelectual

separação/purificação são fatores que elevam os custos e são um grande obstáculo para os soforolipídeos tornarem-se competitivos economicamente perante os surfactantes (SAHARAN et al., 2011). Para diminuir os custos da produção em larga escala e da separação/purificação (downstream) diversas estratégias podem ser adotadas: (a) desenvolvimento de novos bioprocessos mais eficientes na produção, como a imobilização celular; (b) otimização do meio e condições de cultivo e (c) desenvolvimento de processos que otimizem a extração e purificação dos soforolipídeos, como é possível através da imobilização celular (NITSCHKE et al., 2004; MAKKAR et al., 2011; SAHARAN et al., 2011).

5.2. Descreva as conhecidas soluções já existentes ao problema ou desafio, seus limites e deficiências

Os bioprocessos para a produção desse biossurfactante vem como uma solução para transpor essas dificuldades. O processo de fermentação microbiana pode gerar o produto em composição e quantidade desejada. Assim os processos fermentativos tipo batelada, batelada alimentada e contínua podem ser propostos para uma eficiente produção de soforolipídeos. A produção em batelada em frascos agitados (shake flasks) vem sendo utilizada para a produção em pequena escala, ideal para estudos iniciais de produção (DAVEREY et al., 2009; KIM et al., 2009).

Após os estudos iniciais de produção, maiores volumes são utilizados assim os biorreatores de bancada e de maiores volumes são testados (OTTO et al., 1999; SHAH et al., 2007). Existem produções descritas na literatura em biorreator de bancada e trabalhando na forma de batelada alimentada (RAU et al., 2001; KIM et al., 2009), onde ocorre adição controlada de substratos que previne o efeito inibitório dos substratos no crescimento celular e na produção dos soforolipídeos (RAU et al., 1996).

Para a produção de soforolipídeos, alguns fatores são limitantes para a redução de custos: (a) necessidade da obtenção de uma alta concentração de células para o inóculo do processo fermentativo (CASAS et al., 1997); (b) a produção utilizando células livres aumenta os custos de manutenção de dos equipamentos (reatores) devido a adesão de células em eletrodos/sensores e normalmente ocorrem obstrução de dutos nestes equipamentos (KITAMOTO et al., 1992, 2002; IMURA et al., 2013); (c) os processos de produção e separação dos soforolipídeos não são integrados (PALME et al., 2010); (d) o acúmulo de soforolipídeos e outros metabólitos no meio de fermentação, durante a produção promove um efeito inibitório e tóxico para os microrganismos (PALME et al., 2010).

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário - CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina -

Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



Escritório de Propriedade Intelectual

5.3. Descreva como sua invenção supera estes limites e deficiências, destacando suas vantagens e ganhos:

Considerando as dificuldades de produção de soforolipídios com células livres a imobilização celular ou microencapsulação surge como uma alternativa viável para otimizar a produção. A imobilização celular compreende o confinamento de células microbianas (por exemplo leveduras do gênero *Candida*) dentro de uma determinada matriz (alginato de cálcio) preservando suas atividades metabólicas e capacidade fermentativa (KAREL et al., 1985).

Esta técnica oferece diversas vantagens sobre a fermentação com células livres como: (a) aumento da produtividade, uma vez que a maior concentração de células microbianas imobilizadas permite uma maior eficiência na síntese de metabólitos; (b) redução de custos de manutenção dos equipamentos (reatores) pois não ocorrem os problemas de adesão de células aos eletrodos/sensores e obstrução de sensores; (c) simplifica e reduz os custos no processo de separação dos soforolipídeos ("downstream"), pois as esferas contendo as células imobilizadas são separadas por processos mais simples e de baixo custo; (d) as esferas com as células imobilizadas podem ser reutilizadas (ciclos de reutilização) diminuindo os custos com relação a obtenção de novas células (inóculo) que é necessário no processo de produção por células livres; (f) as células imobilizadas estão protegidas em um microambiente contra metabólitos tóxicos, inibição pelo produtos formados e as altas concentrações de substrato presentes no meio necessários para a síntese de soforolipídeos (DEVI; SRIDHAR, 2000; KOURKOUTAS et al., 2004; ZHOU et al., 2009; ZHAO; XIA, 2010).

Portanto os fatores que impedem a redução de custos de produção de soforolipídeos (obtenção de altas concentrações de células para a obtenção de inóculo, custos de manutenção mais elevados de equipamentos provocados pelas células livres e efeito inibitório na produção por metabólitos, altas concentração de substratos e inibição pelo produtos sintetizados) podem ser contornados e ou superados com a utilização do bioprocessamento de imobilização de células por microencapsulação em alginato de sódio.

6. DESCRIÇÃO DETALHADA

6.1. Descreva detalhadamente a invenção de forma que um técnico ou pessoa com conhecimento técnico no assunto consiga reproduzi-la:

O referido invento consiste na microencapsulação de leveduras do gênero

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário - CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina -

Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



Escritório de Propriedade Intelectual

Candida em matriz de alginato de cálcio. A etapa inicial do invento consiste na dissolução do alginato de sódio nas concentração de 2 a 3% (massa/volume), após a dissolução a solução deve ser autoclavada por 10 minutos e deixada em repouso por 24 horas a 4°C. A células de leveduras do gênero *Cândida* utilizadas no processo de imobilização são obtidas por fermentação em frascos agitados em meio contendo em g/L: 100 de glicose, 100 de óleo de girassol e 5 de extrato de levedura, incubadas a 30° C por 48 horas. Ao final a biomassa obtida deve ser centrifugada e lavada com solução de cloreto de sódio (0,9%) por três vezes (CIANI et al., 2015).

A biomassa lavada em uma concentração entre 2 a 5% (biomassa/volume de alginato) é misturada com a solução alginato de sódio. A suspensão obtida é gotejada em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) na concentração entre 0,1 e 0,3 mol/L. As células imobilizadas foram utilizadas para a produção de soforolipídeos no meio de fermentação g/L: 100 de glicose, 100 de óleo de girassol, 0,1 de extrato de levedura e uma combinação de sais. Os parâmetros avaliados foram produção de soforolipídeos (P) e eficiência de imobilização (Y_i). Para a produção a incubação foi realizada com temperatura mantida a 30°C em incubadora orbital a 200 rpm por um período de 120 horas.

Ao final de 120 horas o processo foi interrompido através da separação das esferas com células imobilizadas por tamização (estas esferas foram reutilizadas por até 4 vezes em novas fermentações). Através da dissolução das esferas com citrato de sódio 5% e quantificação das células contidas nas esferas pode ser calculado a eficiência de imobilização (Y_i), que representa, a porcentagem de células que se encontram retidas no suporte, quanto maior o valor, mais eficiente é o processo de microencapsulação (RAZMOVSKI; VUČUROVIĆ, 2012).

O sobrenadante é adicionado a um funil de separação com acetato de etila na proporção de (1:1). A fase do acetato de etila que contém os soforolipídeos é coletada em balão e rotaevaporada. Na fração retida no balão após a rotaevaporação é adicionada uma mistura de hexano/metanol:água (4:1). A fase do metanol:água onde os soforolipídeos encontram-se dissolvidos é coletada e seca em estufa a 80o C até que o peso fique constante. Por gravimetria a produção de soforolipídeos (P) é quantificada em g/L (LANGER et al., 2006; PALME et al., 2010).

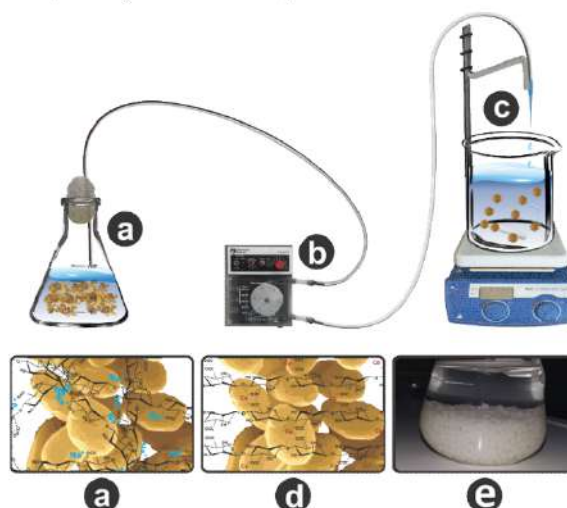
Escritório de Propriedade Intelectual

7. DESENHOS E ESQUEMAS

7.1 Havendo desenhos e esquema que auxiliem na interpretação da invenção anexe-os abaixo, com comentários e explicações para cada um dele

A Figura 1 ilustra as etapas do processo de microencapsulação de acordo com a presente invenção. Uma suspensão contendo alginato de sódio e as células de *Candida* (figura 1a) e bombeada por uma bomba peristáltica (figura 1b) e gotejada sobre uma solução de cloreto de cálcio (c). A suspensão de células com alginato de sódio (figura 1a) é polimerizada pela troca dos íons sódio pelos íons cálcio (figura 1d), as esferas permanecem 24 horas na solução de CaCl_2 até completa polimerização (figura 1e).

Figura 1 - Processo de imobilização celular por microencapsulação de leveduras do gênero *Candida* para a produção de soforolipídeos



A Figura 2 ilustra o processo de fermentação para a produção de soforolipídeos no meio de fermentação e as esferas com a células de *Candida* imobilizadas (microcapsulas. Os frascos Erlenmeyers contendo o meio de fermentação e as células microencapsuladas (figura 2a) foram colocadas em um shaker orbital a 30 °C, 200 rpm por 120 horas (figura 2b) para que ocorra o processo de fermentação.

Escritório de Propriedade Intelectual

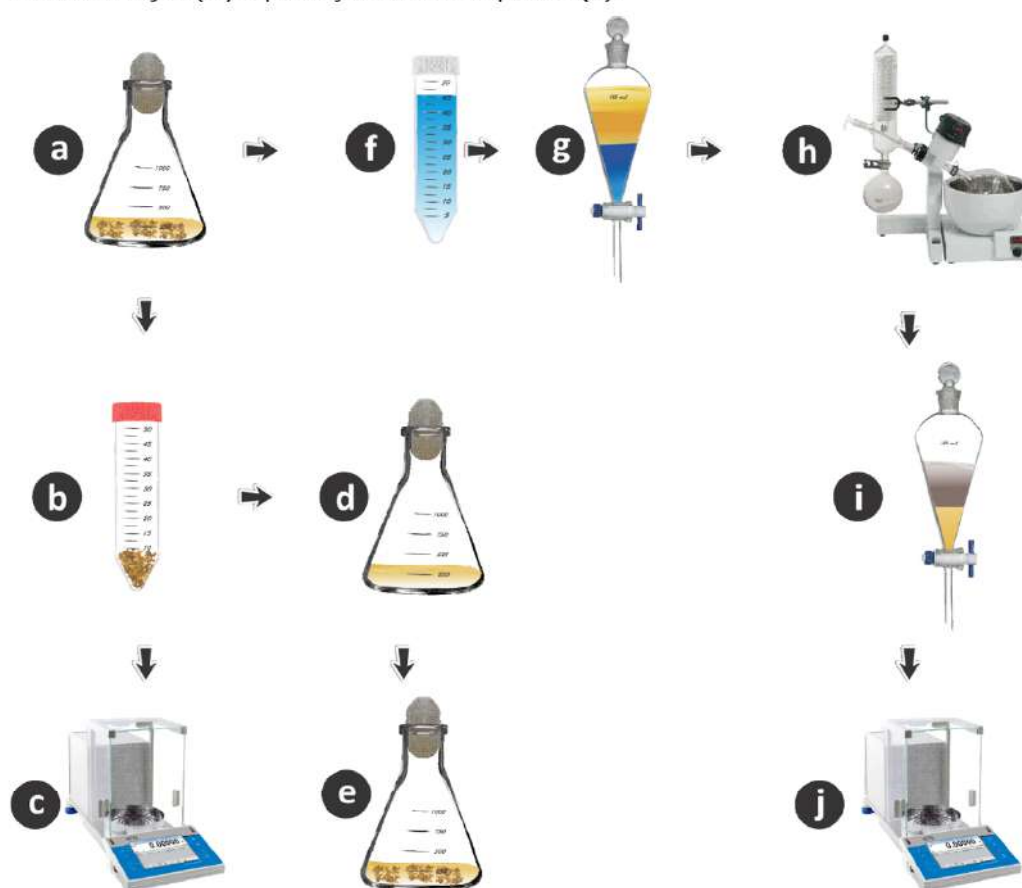
Figura 2 - Processo de fermentação por células imobilizadas em alginato de cálcio (figura 1a) em shaker orbital a 30 °C, 200 rpm por 120 horas (figura 2b)



A Figura 3 ilustra o processo de interrupção do cultivo e extração dos sofrorolipídeos, quantificação da eficiência de imobilização (Y_i) e produção de sofrorolipídeos (P). Após o término da fermentação (figura 3a) as esferas com células imobilizadas são separadas (figura 3b), e se necessário as esferas são dissolvidas com citrato de sódio (5%) para quantificação por gravimetria da eficiência de imobilização (Y_i) (figura 3c). Estas esferas também podem ser transferidas para um novo meio de fermentação (figura 3d) e serem reutilizadas em um novo processo fermentativo (figura 3e) (a reutilização pode ser realizada por até 4 ciclos). O sobrenadante do meio de fermentação (figura 3f) é adicionado ao um funil de separação com acetato de etila na proporção de (1:1) (figura 3g) para extração do sofrorolipídeo. A fase apolar do funil (que contém o sofrorolipídeos extraídos) é submetido a rotaevaporação (figura 3h). A fração retida no processo de rotaevaporação é dissolvida com uma mistura de hexano e metanol:H₂O e adicionada a um funil de separação (figura 3i). A fração do metanol:H₂O contendo os sofrorolipídeos é evaporado em estufa a 80 °C e os sofrorolipídeos obtidos (produção de sofrorolipídeos (P)) são quantificados por gravimetria (figura 3j).

Escritório de Propriedade Intelectual

Figura 3 - Processo de reutilização das células imobilizadas, quantificação da eficiência de imobilização (Y_i) e produção de sofrorlipídeos (P).



Na avaliação da influência da suplementação de sais ao meio de fermentação para a produção de sofrorlipídeos por células imobilizadas, foram utilizados os sais K_2HPO_4 , $CaCl_2$, $MgSO_4$ e $ZnSO_4$. O processo de produção de sofrorlipídeos foi realizado de acordo com o planejamento fatorial com quatro variáveis e dois níveis (fatorial 2^4) totalizando 16 ensaios (BOX et al., 2005). A Tabela 1 mostra o delineamento fatorial com os níveis das variáveis com seus valores decodificados e os resultados obtidos na eficiência de imobilização (Y_i) e produção de sofrorlipídeos (P).

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário - CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina -
Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



Escritório de Propriedade Intelectual

Os parâmetros fermentativos utilizados foram: (a) meio de fermentação contendo em g/L: 100 de glicose, 100 de óleo de girassol e 0,1 de extrato de levedura, (b) inóculo de 10% (volume do meio/volume de esferas), incubadora tipo Skaker a 200 rpm, com temperatura de 30 °C e tempo de fermentação de 120 h.

Tabela 1 - Avaliação da influência dos sais K_2HPO_4 , $CaCl_2$, $MgSO_4$ e $ZnSO_4$ sobre a eficiência de imobilização (Y_i) e produção de soforolípídeos (P) por células de *Candida*.

Ensaio	Variáveis Decodificadas				Respostas	
	K_2HPO_4 (g/L)	$CaCl_2$ (g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	$ZnSO_4$ (g/L)	Y_i (%)	P (g/L)
1	0,00	0,00	0,00	0,00	87,060	3,5867
2	1,50	0,00	0,00	0,00	88,509	6,1782
3	0,00	2,50	0,00	0,00	91,608	4,1624
4	1,50	2,50	0,00	0,00	92,802	6,0765
5	0,00	0,00	0,25	0,00	88,613	3,9736
6	1,50	0,00	0,25	0,00	88,808	5,7807
7	0,00	2,50	0,25	0,00	91,282	4,2097
8	1,50	2,50	0,25	0,00	92,706	6,2053
9	0,00	0,00	0,00	3,50	89,498	3,8492
10	1,50	0,00	0,00	3,50	89,281	5,9853
11	0,00	2,50	0,00	3,50	93,039	3,8357
12	1,50	2,50	0,00	3,50	92,868	6,3748
13	0,00	0,00	0,25	3,50	88,683	4,5514
14	1,50	0,00	0,25	3,50	87,898	5,8590
15	0,00	2,50	0,25	3,50	92,082	4,3502
16	1,50	2,50	0,25	3,50	93,139	6,0874

Para a variável eficiência de imobilização (Y_i %), a análise de variância (Tabela 2) mostra que para um nível de confiança de 95% somente o fator $CaCl_2$ foi significativo para a eficiência de imobilização. ativa. O coeficiente de determinação para a eficiência de imobilização (R^2) foi de 0,9735997, indicando que 97,36% da variância obtida pode ser explicada pelo modelo utilizado. Para a variável produção de soforolípídeos (P) a análise de variância (Tabela 3) mostra que para um nível de confiança de 95%, somente o fator K_2HPO_4 foi significativa. Os sais testado não apresentaram interações significativas. O coeficiente de determinação calculado R^2 foi de 0,98367, indicando que 98,347% da variação pode ser explicada pelo modelo utilizado.

Escritório de Propriedade Intelectual

Tabela 2 – Análise de variância para a influência de sais na variável eficiência de imobilização (Y_i)

$R^2 = 0,97359$; R^2 ajustado = $0,92077$; Resíduo= $0,33608$					
Fatores	Soma quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p
K_2HPO_4	1,074164	1	1,074164	2,977120	0,145043
CaCl₂	60,744686	1	60,744686	168,358146	0,000048
$MgSO_4$	0,132597	1	0,132597	0,367501	0,570836
$ZnSO_4$	1,625001	1	1,625001	4,503804	0,087260
K_2HPO_4 x $CaCl_2$	0,512729	1	0,512729	1,421065	0,286716
K_2HPO_4 x $MgSO_4$	0,008259	1	0,008259	0,022889	0,885660
K_2HPO_4 x $ZnSO_4$	1,197940	1	1,197940	3,320173	0,128057
$CaCl_2$ x $MgSO_4$	0,036094	1	0,036094	0,100038	0,764562
$CaCl_2$ x $ZnSO_4$	0,008098	1	0,008098	0,022444	0,886767
$MgSO_4$ x $ZnSO_4$	1,162542	1	1,162542	3,222066	0,132607
Erro Puro	1,804032	5	0,360806		
Soma Total	68,306141	15			

Tabela 3 – Análise de variância para a influência de sais na produção de sofrorolipídeos (P)

$R^2 = 0,98367$; R^2 ajustado = $0,95101$; Resíduo= $0,557037$					
Fatores	Soma quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p
K_2HPO_4	16,094940	1	16,094940	288,938300	0,000013
$CaCl_2$	0,151450	1	0,151450	2,718800	0,160085
$MgSO_4$	0,060920	1	0,060920	1,093700	0,343555
$ZnSO_4$	0,034100	1	0,034100	0,612300	0,469358
K_2HPO_4 x $CaCl_2$	0,006590	1	0,006590	0,118400	0,744825
K_2HPO_4 x $MgSO_4$	0,345800	1	0,345800	6,207800	0,055057
K_2HPO_4 x $ZnSO_4$	0,023040	1	0,023040	0,413600	0,548480
$CaCl_2$ x $MgSO_4$	0,002050	1	0,002050	0,036800	0,855501
$CaCl_2$ x $ZnSO_4$	0,035190	1	0,035190	0,631700	0,462761
$MgSO_4$ x $ZnSO_4$	0,023910	1	0,023910	0,429200	0,541326
Erro Puro	0,278520	5	0,055700		
Soma Total	17,056510	15			

Com as esferas de alginato foi realizada o MEV (Microscopia eletrônica de varredura) apresentada na Figura 4 que mostra a imagem das esferas com células de leveduras imobilizadas na matriz de alginato de cálcio, e na figura 4a (aumento de 200 vezes) observamos a integridade e o aspecto externo das esferas, e na figura 4b (aumento de 24000 vezes) observamos a presença de grânulos dos sofrorolipídeos que estão sendo

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário - CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina -

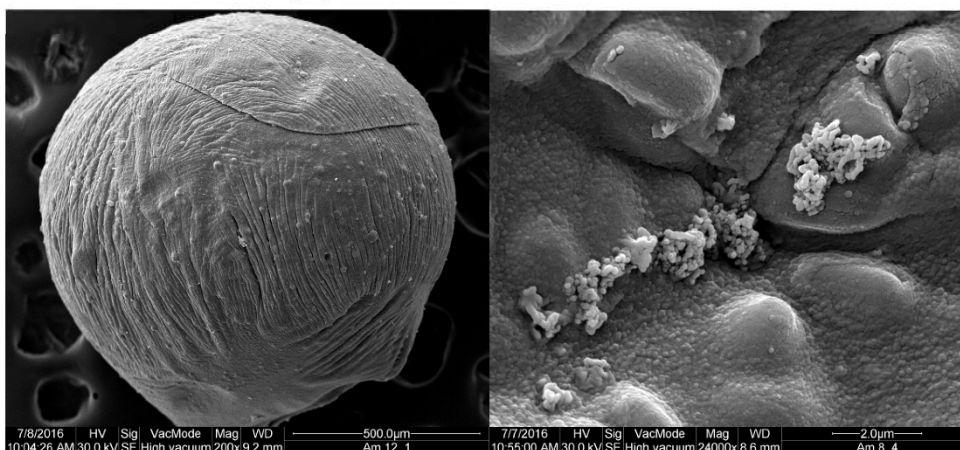
Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br

Escritório de Propriedade Intelectual

produzidos e secretados para o meio exterior. A partir desses resultados verificou-se que a metodologia aplicada foi eficaz na produção das esferas e na imobilização da *Candida*.

Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura mostrando as esferas de alginato de cálcio com as leveduras aprisionadas (4a) e a secreção de sofrorolípídeos produzidas por estas células imobilizadas (4b)



Podemos concluir que no processo de imobilização de leveduras do gênero *Candida* por microencapsulação por gel de alginato de cálcio o meio com a eve conter em sua composição glicose, óleo de girassol, CaCl_2 e K_2HPO_4 . A glicose e óleo de girassol são os componentes principais para a produção de sofrorolípídeos (GARCÍA-OCHOA; CASAS, 1999) e o CaCl_2 tem a função de manter a estabilidade das esferas durante o processo de imobilização (BLANDINO et al., 1999) e o K_2HPO_4 fornece grupamento fosfatos essencial no metabolismo energético na síntese de sofrorolípídeos (GARCÍA-OCHOA; CASAS, 1999; RISPOLI et al., 2010). As esferas com células de *Candida* mostrou eficiência para serem reutilizadas por até quatro ciclos no processo de fermentação para a produção de sofrorolípídeos.



Escritório de Propriedade Intelectual

8.1. INVENTOR 1	
Nome completo: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE	
Endereço residencial completo: Av. Gil de Abreu e Souza, 1501 – Londrina/PR	
Tel: (43) 999957993	e-mail: macelligoi@uel.br
Atividade na UEL: Docente	
Percentual da participação na invenção: 40% Tempo de participação: 5 anos	

8.2. INVENTOR 2	
Nome completo: Marcos Roberto de Oliveira	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE	
Endereço residencial completo: Rua Hypolicoscínio Lucio Soares, 286 – Londrina/PR	
Tel: (43) 996069090	e-mail: marcosrobertodeoliveira@gmail.com
Atividade na UEL: Doutorando	
Percentual da participação na invenção: 30% Tempo de participação: 4 anos	

8.3. INVENTOR 3	
Nome completo: Cristiani Baldo Rocha	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE	
Endereço residencial completo: Rua Elizio Turino, 400, casa 8- Londrina/PR	
Tel: (43) 996905212	e-mail: cristianibaldo@uel.br
Atividade na UEL: Docente	
Percentual da participação na invenção: 10% Tempo de participação: 4 anos	

8.4. INVENTOR 4	
Nome completo: Gabrielly Terassi Bersaneti	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE	
Endereço residencial completo: Rua Uruguai nº 1402 Ap. 301 Londrina/PR	
Tel: (043) 9168 3085	e-mail: gaby_terassi@hotmail.com
Atividade na UEL: Doutoranda	
Percentual da participação na invenção: 10 % Tempo de participação: 3 anos	

8.5. INVENTOR 5	
Nome completo: Isadora Cernach Carneiro da Fontoura	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE	
Endereço residencial completo: Rua Maria Lúcia da Paz, 400 – Londrina/PR	
Tel: (43) 998521207	e-mail: isaacernach1@gmail.com
Atividade na UEL: Mestranda	
Percentual da participação na invenção: 10% Tempo de participação: 3 anos	

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário – CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina -
Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



Escritório de Propriedade Intelectual

13. COMUNICAÇÕES

13.1. Foram realizadas comunicações orais (palestras, aulas), no qual um dos inventores aparece com como autor, contendo informações suficientes para que uma pessoa com conhecimentos na área possa reproduzir a invenção?

Sim Não

Obs: Se sim, anexe cópias das comunicações.

13.2. Foram realizados comunicados da invenção à imprensa, ou a jornais internos da UEL, de empresas, de agências de fomento ou outro instrumento de divulgação? Não

Obs: Se sim, anexe cópias dos comunicados ou comentários sobre eles

14. TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA (APLICÁVEL ÀS INVENÇÕES DA UEL)

14.1. Se souber, faça uma lista de possíveis empresas nacionais e internacionais que poderiam vir a se interessar pela invenção, após ter sido devidamente protegida: Allied Carbon Solutions Ltd.; Croda; Ecover Belgium; Evonik; Groupe Soliance; Henkel; Kaneka Co.; MG Intobio Co. Ltd.; Saraya Co. Ltd.; Soliance; Synthezyme LLC,

15. DIVULGAÇÕES FORA DA EMPRESA (APLICÁVEL ÀS EMPRESAS)

15.1. Houve alguma divulgação da invenção fora da empresa, nas formas escrita, oral ou expositiva?

Sim Não

Obs.: Se sim, anexe cópias ou forneça detalhes das mesmas.

15.2. As divulgações foram realizadas sob algum instrumento legal de sigilo ou confidencialidade?

Sim Não

16. PATENTES RELACIONADAS

16.1 Se tiver disponível, liste quaisquer publicações ou patentes que descrevam invenções similares a esta, para a qual está sendo solicitada a propriedade:



Escritório de Propriedade Intelectual

17. Declaração

Declaro que as informações acima prestadas são verdadeiras e de minha inteira responsabilidade. Concordo que este é um pedido de proteção intelectual e industrial e isento a UEL, a AINTEC e todo seu pessoal de toda e qualquer responsabilidade, direta ou indireta, se a referida proteção não for concedida integral ou parcialmente pelo INPI ou por outro órgão a que for submetido.

INVENTOR 1

Nome: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi
CPF: 040.984.648-10

INVENTOR 2

Nome: Marcos Roberto de Oliveira
CPF: 555.594.929-49

INVENTOR 3

Nome: Cristiani Baldo Rocha
CPF: 051.992.526/23



Escritório de Propriedade Intelectual

INVENTOR 4

Nome: Gabrielly Terassi Bersaneti
CPF: 086.007.349-16

INVENTOR 5

Nome: Isadora Cernach Carneiro da Fontoura
CPF: 049.188.539-35

Londrina, 07 de julho de 2017.



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



AINTEC
AGÊNCIA DE INOVAÇÃO - UEL

Escritório de Propriedade Intelectual

Referências

- ABOULHASSAN, M. A.; SOUABI, S.; YAACOUBI, A.; BAUDU, M. Removal of surfactant from industrial wastewaters by coagulation flocculation process. **International Journal of Environmental Science Technology**, v. 3, n. 4, p. 327-332, 2006. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/request?st06041>>. .
- ACMITE MARKET INTELLIGENCE. **Global Surfactant Market**. 2016.
- 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. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11746-005-1120-3>>. .
- BAEK, S.-H.; SUN, X.-X.; LEE, Y.-J.; et al. Mitigation of harmful algal blooms by sophorolipid. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 651-659, 2003. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15223859>>. Acesso em: 27/9/2013.
- BLANDINO, A N. A; MACIAS, M.; CANTER, D. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules : Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics. **Journal of Bioscience**, v. 88, n. 6, p. 686-689, 1999.
- BOGAERT, I. N. A. VAN; SAERENS, K. M. J.; MUYNCK, C. DE; et al. Microbial production and application of sophorolipids (a). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23-34, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476500>>. .
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery**. 2a ed ed. Hoboken, NJ : Wiley-Interscience, 2005.
- 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. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022997000380>>. .
- CHANDRAN, P.; DAS, N. Role of Sophorolipid Biosurfactant in Degradation of Diesel Oil by *Candida tropicalis* (b). **Bioremediation Journal**, v. 16, n. 1, p. 19-30, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10889868.2011.628351>>. .

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário - CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina -

Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



AINTEC
AGÊNCIA DE INOVAÇÃO - UEL

Escritório de Propriedade Intelectual

CIANI, M.; CANONICO, L.; ORO, L.; COMITINI, F.; VITA, S. Sequential fermentation using non- *Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *BIOWeb of Conferences* 3. **Anais...** . v. 2015, p.2014–2016, 2015.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K.; SANGEETHA, P. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using synthetic dairy wastewater (c). **International Journal of Environmental Science and Engineering**, v. 1, n. 4, p. 173–175, 2009. Disponível em: <http://www.idc-online.com/technical_references/pdfs/civil_engineering/Sophorolipids.pdf>. .

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232600&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>. .

DEVI, S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 225–231, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959200001941>>. .

ELSHAFIE, A.; AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; et al. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Possible Application in Enhancing Oil Recovery. 4 Th International Symposium on Applied Molecular Microbiology in Oil Systems (ISMOS). **Anais...** . p.1–63, 2013. Rio de Janeiro.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J. A. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 7, p. 613–621, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022999000897>>. .

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155–166, 2006. Disponível em: <<http://japanlinkcenter.org/JST.JSTAGE/jos/55.155?from=Google>>. .

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. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/v61-104>>. .

GRAND VIEW RESEARCH, I. Global surfactants market to be worth \$46.20 bn by 2022: Grand View Research. **Focus on Surfactants**, v. 2016, n. 1, p. 3, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1351421016000123>>. .

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário – CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina - Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



AINTEC
Agência de Inovação - UEL

Escritório de Propriedade Intelectual

HARDIN, R.; PIERRE, J.; SCHULZE, R.; et al. Sophorolipids improve sepsis survival: effects of dosing and derivatives. **The Journal of Surgical Research**, v. 142, n. 2, p. 314–319, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719064>>. .

HIRATA, Y.; RYU, M.; IGARASHI, K.; et al. Natural synergism of acid and lactone type mixed sophorolipids in interfacial activities and cytotoxicities (a). **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 11, p. 565–572, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19844071>>. .

IMURA, T.; KAWAMURA, D.; MORITA, T.; et al. Production of sophorolipids from non-edible jatropha oil by *Stamerella bombicola* NBRC 10243 and evaluation of their interfacial properties. **Journal of oleo science**, v. 62, n. 10, p. 857–64, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24088524>>. .

KANG, S.-W.; KIM, Y.-B.; SHIN, J.-D.; KIM, E.-K. Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 3, p. 780–90, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19253005>>. Acesso em: 12/9/2013.

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. The immobilization of whole cells: Engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, n. 8, p. 1321–1354, 1985. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009250985800749>>. .

KIM, Y.-B.; YUN, H. S.; KIM, E.-K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6028–6032, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19615892>>. .

KITAMOTO, D.; FUZISHIRO, T.; YANAGISHITA, H.; NAKANE, T.; NAKAHARA, T. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 4, p. 305–310, 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01022329>>. .

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants--from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 187–201, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233292>>. .

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário - CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina -

Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



AINTEC
Agência de Inovação - UEL

Escritório de Propriedade Intelectual

LANGER, O.; PALME, O.; WRAY, V.; TOKUDA, H.; LANG, S. Production and modification of bioactive biosurfactants. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2138–2145, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511306003199>>. .

LI, H.; MA, X.-J.; SHAO, L.-J.; SHEN, J.; SONG, X. Enhancement of sophorolipid production of *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576 by low-energy ion beam implantation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 3, p. 510–523, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22562550>>. .

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 19, 2011. Springer Open Ltd. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3159906&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MANN, R. M.; BIDWELL, J. R. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. **Environmental Pollution**, v. 114, n. 2, p. 195–205, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504342>>. .

NGUYEN, T. T. L.; EDELEN, A.; NEIGHBORS, B.; SABATINI, D. A. Biocompatible lecithin-based microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: formulation and potential applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 348, n. 2, p. 498–504, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471022>>. .

NGUYEN, T. T. L.; SABATINI, D. A. Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 2, p. 1232–1244, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3083702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81–85, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822004000100013&script=sci_arttext>. .

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n5/11408.pdf>>. .

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, p. 63–67,

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário – CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina - Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



AINTEC
AGÊNCIA DE INOVAÇÃO - UEL

Escritório de Propriedade Intelectual

2003. Disponível em: <<http://files.engenhariaagronomica.webnode.com/200000062-55ba356b43/bio31%5B1%5D.pdf#page=63>>. .

OTTO, R. T.; DANIEL, H. J.; PEKIN, G.; et al. Production of sophorolipids from whey: II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 495–501, 1999. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002530051551>>. .

PALME, O.; COMANESCU, G.; STOINEVA, I.; et al. Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 6, p. 663–673, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900163>>. .

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. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.200520086>>. .

PENFOLD, J.; CHEN, M.; THOMAS, R. K.; et al. Solution self-assembly of the sophorolipid biosurfactant and its mixture with anionic surfactant sodium dodecyl benzene sulfonate. **Langmuir**, v. 27, n. 14, p. 8867–8877, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21644533>>. .

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. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669000000558>>. .

RAU, U.; MANZKE, C.; WAGNER, F. Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 2, p. 149–154, 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00128670>>. .

RAZMOVSKI, R.; VUČUROVIĆ, V. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. **Fuel**, v. 92, n. 1, p. 1–8, 2012.

REZNIK, G. O.; VISHWANATH, P.; PYNN, M.; et al. Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1387–1397, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094712>>. .

RISPOLI, F. J.; BADIA, D.; SHAH, V. Optimization of the fermentation media for Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Campus Universitário - CP: 6022 - CEP: 86.051-990 - Londrina -

Paraná

Tel/fax: (43) 3371-5812 - www.intuel.org.br - e-mail: intuel@uel.br



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Agência de Inovação - UEL

Escritório de Propriedade Intelectual

sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 4, p. 938–44, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205261>>. Acesso em: 24/9/2013.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, n. 1, p. 1–14, 2011. Disponível em: <<http://astonjournals.com/manuscripts/Accepted/GEBJ-29acc7-11-11.pdf>>. .

SHAH, V.; JURJEVIC, M.; BADIA, D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 512–515, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17286413>>. .

YOO, D.-S.; LEE, B.-S.; KIM, E.-K. Characteristics of Microbial Surfactants as Antifungal Agent Against Plant Pathogenic Fungus. **Journal of Microbiological Methods**, v. 15, n. 6, p. 1164–1169, 2005.

YUAN, B.; YANG, S.; CHEN, J. Antimicrobial Activity of Sophorolipids on Pathogenic Fungi Isolated from Fruits*. **Chinese Journal of Applied Environmental Biology**, v. 17, n. 3, p. 330–333, 2012. Disponível em: <<http://pub.chinasciencejournal.com/article/getArticleRedirect.action?doiCode=10.3724/SP.J.1145.2011.00330>>. Acesso em: 13/9/2013.

ZHAO, J.; XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 28–32, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.007>>. .

ZHOU, L. C.; LI, Y. F.; BAI, X.; ZHAO, G. H. Use of microorganisms immobilized on composite polyurethane foam to remove Cu(II) from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1–3, p. 1106–1113, 2009.

ZHOU, Q. H.; 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. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02635781>>. .

5.5 ELABORAÇÃO DE ARTIGO - COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DOS SOFOROLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR BATELADA CÉLULAS LIVRES, CÉLULAS EM REPOUSO E CÉLULAS IMOBILIZADAS

A partir dos resultados complementares apresentados no Apêndice A, será elaborado o artigo: “Comparação estrutural dos sofrorolipídeos produzidos por batelada células livres, células em repouso e células imobilizadas”

Revista: Bioengineered

<http://www.tandfonline.com/toc/kbie20/current>

Fator de Impacto: 1,87 – Qualis: B2.

6 CONCLUSÃO

- As condições otimizadas para o processo de imobilização foram: concentração de células imobilizadas de 50 g/L, alginato de sódio 30 g/L, concentração de cloreto de cálcio de 0,1 mol/L, tempo de cura de 12 horas e tempo de fermentação de 96 horas;

- O meio otimizado para a produção de soforolipídeos foi em g/L: 30 glicose, 30 de óleo de girassol, 0,1 de extrato de levedura, 4,5 de K_2HPO_4 e 4,5 de $CaCl_2$;

- Nas condições otimizadas a produção de soforolipídeos e a eficiência de imobilização foram O meio otimizada para a produção de soforolipídeos foi em g/L: 30 glicose, 30 de óleo de girassol, 0,1 de extrato de levedura, 4,5 de K_2HPO_4 e 4,5 de $CaCl_2$;

- Na condição otimizada do meio de cultivo, a maior produção foi de $8,458 \pm 0,119$ g/L com uma eficiência de imobilização de $90,922 \pm 0,367\%$;

- As esferas contendo as células imobilizadas puderam ser reutilizadas três vezes com a produção de soforolipídeos para cada ciclo de : $9,058 \pm 0,108$, $8,945 \pm 0,00$ e $7,246 \pm 0,17$ g/L respectivamente, com uma eficiência de imobilização final de $70,749 \pm 0,887\%$;

- A caracterização das esferas com células imobilizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou uma matrix de imobilização com uma distribuição homogênea das células permitindo a troca de nutrientes e metabólitos, após 96 horas de fermentação a estrutura encontrava-se integra mostrando células metabolicamente ativas na produção de soforolipídeos;

- Estruturalmente a mistura de os soforolipídeos produzidos por células imobilizadas é composta por 72,21 % de formas acídicas e 27,79 % de formas lactônicas.

- O processo de imobilização celular mostrou-se um processo viável e promissor para a produção de soforolipídeos.

REFERÊNCIAS

ABOULHASSAN, M. A. *et al.* Removal of surfactant from industrial wastewaters by coagulation flocculation process. **International Journal of Environmental Science Technology**, 2006. v. 3, n. 4, p. 327–332. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/request?st06041>>.

ACMITE MARKET INTELLIGENCE. **Global Surfactant Market. Market Report Acmite**. [S.l.]: [s.n.], 2016.

AHN, C.; MORYA, V. K.; KIM, E.-K. Tuning surface-active properties of bio-surfactant sophorolipids by varying fatty-acid chain lengths. **Korean Journal of Chemical Engineering**, 2016. v. 32, n. 4, p. 1–7. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11814-016-0082-x>>.

AHUEKWE, E. F. *et al.* Evaluation of Hydrocarbon Emulsification and Heavy Metal Detoxification Potentials of Sophorolipid Biosurfactants Produced From Waste Substrates Using Yeast and Mushroom. **Society of Petroleum Engineers**, 2016.

ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. Initial steps of sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, ago. 1996. v. 46, n. 1, p. 67–73. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8987537>>.

ASHBY, R. D. *et al.* Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 2005. v. 82, n. 9, p. 625–630. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11746-005-1120-3>>.

ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. **Biotechnology Letters**, 21 out. 2010. v. 32, n. 10, p. 1429–1437. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490613>>.

ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. Property control of sophorolipids: influence of fatty acid substrate and blending. **Biotechnology Letters**, 2008. v. 30, n. 6, p. 1093–1100. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264681>>.

ASMER, H. J. *et al.* Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of Academic Industrial Research**, 1988. v. 65, n. 9, p. 1460–1466. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02898308>>.

AZIM, A. *et al.* Amino acid conjugated sophorolipids: A new family of biologically active functionalized glycolipids. **Bioconjugate Chemistry**, 2006. v. 17, n. 6, p. 1523–1529. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105232>>.

BACCILE, N. *et al.* Self-Assembly Mechanism of pH-Responsive Glycolipids: Micelles, Fibers, Vesicles, and Bilayers. **Langmuir**, 12 out. 2016. p. acs.langmuir.6b02337. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.langmuir.6b02337>>.

BAEK, S.-H. *et al.* Mitigation of harmful algal blooms by sophorolipid. **Journal Microbiology Biotechnology**, 2003. v. 13, n. 5, p. 651–659. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15223859>>. Acesso em: 27 set. 2013.

BAJAJ, V. K.; ANNAPURE, U. S. Castor Oil as Secondary Carbon Source for Production of Sophorolipids Using *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069. **Journal of Oleo Science**, 2015. v. 323, n. 3, p. 315–323.

BAJAJ, V.; TILAY, A.; ANNAPURE, U. Enhanced production of bioactive Sophorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by design of experiment approach with successive purification and characterization. **Journal of Oleo Science**, 2012. v. 61, n. 7, p. 377–386. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790168>>.

BAVIERE, M.; DEGOUY, D.; LECOURTIER, J. **Process for washing solid particles comprising a sophoroside solution. US Patent 5.326.407.** Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US5326407>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

BEDNARSKI, W. *et al.* Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, 2004. v. 95, n. 1, p. 15–18. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207288>>.

BHADORIYA, S. S.; MADORIYA, N. Biosurfactants: A New Pharmaceutical Additive for Solubility Enhancement and Pharmaceutical Development. **Biochemistry & Pharmacology**, 2013. v. 2, n. 2. Disponível em: <<http://www.omicsgroup.org/journals/2167-0501/2167-0501-2-113.pdf>>.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells: Some Practical Considerations. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Humana Press, 1999, V. 1, p. 1–12.

BLUTH, M. H. *et al.* Sophorolipids Decrease IgE Production in U266 Cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2006. n. February, p. 2006. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Sophorolipids+Decrease+IgE+Production+in+U266+Cells#0>>. Acesso em: 9 out. 2014.

BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.* Microbial production and application of sophorolipids (a). **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007. v. 76, n. 1, p. 23–34. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476500>>.

BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.* Development of a transformation and selection system for the glycolipid-producing yeast *Candida bombicola*. **Yeast**, abr. 2008. v. 25, n. 4, p. 273–278. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.1586/full>>.

BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.* Production of new-to-nature sophorolipids by cultivating the yeast *Candida bombicola* on unconventional hydrophobic substrates (a). **Biotechnology and Bioengineering**, abr. 2011. v. 108, n. 4, p. 734–741. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21404247>>. Acesso em: 12 set. 2013.

_____ *et al.* The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: a biotechnological interesting biosurfactant produced by *Starmerella bombicola*. **Molecular Microbiology**, maio. 2013. v.

88, n. 3, p. 501–509. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516968>>.

BOGAERT, I. N. A. VAN; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, abr. 2011. v. 46, n. 4, p. 821–833. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951131100016X>>.

BOGAERT, I. N. A. VAN *et al.* Importance of the cytochrome P450 monooxygenase CYP52 family for the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. **FEMS Yeast Research**, 2009. v. 9, n. 1, p. 87–94. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054129>>.

_____ *et al.* The role of cytochrome P450 monooxygenases in microbial fatty acid metabolism. **FEBS Journal**, jan. 2011. v. 278, n. 2, p. 206–221. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156025>>.

BOGAERT, I. VAN *et al.* A Lactonase Derived From *Candida Bombicola* And Uses Thereof. **US Patent 2015/0284761A1**, 2015. p. 43.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 1999. v. 152, n. 1–2, p. 41–52. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775798006840>>.

BORZEIX, F. **Sophorolipids as stimulating agent of dermal fibroblast metabolism. US Patent 6.057.302**. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US6057302>>. Acesso em: 26 ago. 2014.

BOURDICHON, F. *et al.* Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, 2012. v. 154, p. 87–97.

BRAKEMEIER, A. *et al.* Novel Sophorose Lipids from Microbial Conversion of 2-Alkanols. **Biotechnology Letters**, 1995. v. 11, n. 11, p. 1183–1188.

_____; WULLBRANDT, D.; LANG, S. Microbial alkyl-sophorosides based on 1-dodecanol or 2-, 3- or 4-dodecanones. **Biotechnology Letters**, 1998. v. 20, n. 3, p. 215–218. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1005309431426>>.

_____; WULLBRANDT, D.; LANG, S. *Candida bombicola* : production of novel alkyl glycosides based on glucose/2-dodecanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 27 ago. 1998. v. 50, n. 2, p. 161–166. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s002530051271>>.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [S.l.]: [s.n.], 2013, V. 1051, p. 15–31.

CALLAGHAN, B. *et al.* Lactonic Sophorolipids Increase Tumor Burden in Apcmin[±] Mice. **PLOS ONE**, 6 jun. 2016. v. 11, n. 6, p. e0156845. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0156845>>.

CAMPBELL, K. B.; WEERS, J. J. **Methods and compositions for decreasing the viscosity of hydrocarbon-based fluids during refining. US Patent 2016/0032161 A1**.

CASAS, J. A.; GARCÍA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 1999. v. 88, n. 5, p. 488–494. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16232650>>.

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**, ago. 1997. v. 21, n. 3, p. 221–229. Disponible em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022997000380>>.

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**, 2003. v. 103, n. 1, p. 31–41. Disponible em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165603000671>>.

CHANDANKERE, R. *et al.* An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. **Biochemical Engineering Journal**, 2013. v. 74, p. 46–53. Disponible em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X13000570>>.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **International Journal of Science and Nature**, 2011. v. 2, n. 1, p. 63–71. Disponible em: <[http://scienceandnature.org/IJSN-Vol2\(1\)M2011/IJSN-VOL2\(1\)-14.pdf](http://scienceandnature.org/IJSN-Vol2(1)M2011/IJSN-VOL2(1)-14.pdf)>.

_____; _____. Role of Sophorolipid Biosurfactant in Degradation of Diesel Oil by *Candida tropicalis*. **Bioremediation Journal**, jan. 2012. v. 16, n. 1, p. 19–30. Disponible em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10889868.2011.628351>>.

CHÁVARRI, M. *et al.* Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, 15 ago. 2010. v. 142, n. 1–2, p. 185–189. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>>.

CHEN, J. *et al.* Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae* (b). **Enzyme and Microbial Technology**, 2006. v. 39, n. 3, p. 501–506. Disponible em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022906001153>>.

CHEN, M. *et al.* Adsorption of sophorolipid biosurfactants on their own and mixed with sodium dodecyl benzene sulfonate, at the air/water interface. **Langmuir**, 2011. v. 27, n. 14, p. 8854–8866. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21657229>>.

CHTIOUI, O. *et al.* Biosurfactants production by immobilized cells of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 and their recovery by pertraction. **Process Biochemistry**, 2010. v. 45, n. 11, p. 1795–1799. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.012>>.

CHUNG, T. P.; TSENG, H. Y.; JUANG, R. S. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. **Process Biochemistry**, 2003. v. 38, n. 10, p. 1497–1507.

CIANI, M. *et al.* Sequential fermentation using non- *Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. [S.l.]: [s.n.], 2015. V. 2015, p. 2014–2016.

CIESIELSKA, K. *et al.* SILAC-Based Proteome Analysis of *Starmerella bombicola* Sophorolipid Production. **Journal of Proteome Research**, 4 out. 2013. v. 12, n. 10, p. 4376–92. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23964782>>.

_____ *et al.* Exoproteome analysis of *Starmerella bombicola* results in the discovery of an esterase required for lactonization of sophorolipids. **Journal of Proteomics**, 26 fev. 2014. v. 98, n. 2014, p. 159–174. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24418522>>. Acesso em: 27 maio 2014.

_____ *et al.* Characterization of a novel enzyme—*Starmerella bombicola* lactone esterase (SBLE)—responsible for sophorolipid lactonization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2 nov. 2016. v. 100, n. 22, p. 9529–9541. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7633-2>>.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1984. v. 47, n. 1, p. 173–176. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239631&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CUVIER, A.-S. *et al.* Nanoscale Platelet Formation by Monounsaturated and Saturated Sophorolipids under Basic pH Conditions. **Chemistry - A European Journal**, 21 dez. 2015. v. 21, n. 52, p. 19265–19277. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/chem.201502933>>.

DANIEL, H.-J.; 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**, 1998. v. 20, n. 12, p. 1153–1156. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005332605003>>.

DANIEL, H. J. *et al.* Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1999. v. 51, p. 40–45.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media (a). **Food Research International**, 2009a. v. 42, n. 4, p. 499–504. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996909000192>>.

_____; _____. Production, Characterization, and Properties of Sophorolipids from the Yeast *Candida bombicola* using a Low-cost Fermentative Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 10 set. 2009b. v. 158, n. 3, p. 663–674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19082764>>.

_____; _____. Kinetics of Growth and Enhanced Sophorolipids Production by *Candida*

bombicola Using a Low-Cost Fermentative Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 16 abr. 2010. v. 160, n. 7, p. 2090–2101. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834651>>.

_____; _____. Pretreatment of Synthetic Dairy Wastewater Using the Sophorolipid-Producing Yeast *Candida bombicola*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 6 mar. 2011. v. 163, n. 6, p. 720–728. Disponível em: <http://www.idc-online.com/technical_references/pdfs/civil_engineering/Sophorolipids.pdf>.

DAVILA, A.-M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.-P. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 28 maio. 1997. v. 47, n. 5, p. 496–501. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002530050962>>.

DAVILA, A. M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.-P. Sophorose lipid production from lipidic precursors: Predictive evaluation of industrial substrates. **Journal of Industrial Microbiology**, jul. 1994. v. 13, n. 4, p. 249–257. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01569757>>.

DELBEKE, E. I. P. *et al.* Petroselinic acid purification and its use for the fermentation of new sophorolipids. **AMB Express**, 2016. v. 6, n. 1, p. 28. Disponível em: <<http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-016-0199-7>>.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, 1997. v. 61, n. 1, p. 47–64. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, 1995. v. 54, n. 1995, p. 143–150. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0960852495001166>>.

DEVELTER, D. W. G.; LAURYSSSEN, L. M. L. Properties and industrial applications of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 19 abr. 2010. v. 112, n. 6, p. 628–638. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900153>>.

DEVI, S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, out. 2000. v. 36, n. 3, p. 225–231. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959200001941>>.

DHAR, S. *et al.* Cytotoxicity of sophorolipid-gellan gum-gold nanoparticle conjugates and their doxorubicin loaded derivatives towards human glioma and human glioma stem cell lines. **Nanoscale**, fev. 2011. v. 3, n. 2, p. 575–580. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=CONR00598C>>. Acesso em: 13 set. 2013.

DIAZ DE RIENZO, M. A. *et al.* Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 29 jan. 2016. p. 2–8. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7310-5>>.

DÍAZ DE RIENZO, M. A. *et al.* Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and -negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, jan. 2016. v. 363, n. 2, p. fnv224. Disponível em:

<<http://femsle.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/femsle/fnv224>>.

DRAGET, K.; SKJAKBRAK, G.; SMIDSRØD, O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, 1994. v. 25, n. 1, p. 31–38. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0144861794901597>>.

DUBEY, P. *et al.* Sophorolipid assisted tunable and rapid gelation of silk fibroin to form porous biomedical scaffolds. **RSC Adv.**, 2015. Disponível em:

<<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2015/RA/C5RA04317D>>.

_____ *et al.* Cetyl Alcohol And Oleic Acid Sophorolipids Exhibit Anticancer Activity. **International Journal of Pharmacy and Biological sciences**, 18 abr. 2016. v. 8, n. 3, p. e0174241.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, 1956. v. 28, n. 3, p. 350–356. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/cgi-bin/doilookup/?10.1021/ac60111a017>>.

ELSHAFIE, A. *et al.* Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Possible Application in Enhancing Oil Recovery. Rio de Janeiro: [s.n.], 2013. p. 1–63.

ELSHAFIE, A. E. *et al.* Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Potential Application in Microbial Enhanced Oil Recovery. **Frontiers in Microbiology**, 26 nov. 2015. v. 6. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01324/abstract>>.

ERNENWEIN, C. *et al.* Biosolubilizer. **US Patent 2015/0150251A1**, 2015. p. 14.

FELSE, A. P. *et al.* Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007. v. 40, n. 2, p. 316–323. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022906002134>>.

FRACCHIA, L. *et al.* Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. *In*: GHISTA, D. N. (Org.). **Biomedical Science, Engineering and Technology**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2011, p. 876.

FREITAS, B. G. *et al.* Formulation of a Commercial Biosurfactant for Application as a Dispersant of Petroleum and By-Products Spilled in Oceans. **Frontiers in Microbiology**, 2016. v. 7, n. October, p. 1–9.

FU, S. L. *et al.* Sophorolipids and their derivatives are lethal against human pancreatic cancer cells. **The Journal of Surgical Research**, 2008. v. 148, n. 1, p. 77–82. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18570934>>.

GARCÍA-MARTÍNEZ, T. *et al.* Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces*

cerevisiae leading to the immobilization of yeast. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2011. v. 86, n. 6, p. 812–817.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J. A. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. **Enzyme and Microbial Technology**, 1999. v. 25, n. 7, p. 613–621. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022999000897>>.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, 2006. v. 55, n. 4, p. 155–166. Disponível em: <<http://japanlinkcenter.org/JST.JSTAGE/jos/55.155?from=Google>>.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; BOGAERT, I. N. A. VAN. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, 1 jul. 2014. v. 30, p. 66–72. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.002>>. Acesso em: 7 jul. 2014.

GLENNS, R. N.; COOPER, D. G. Effect of substrate on sophorolipid properties. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 2006. v. 83, n. 2, p. 137–145. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11746-006-1186-y>>.

GÖBBERT, U.; LANG, S.; WAGNER, F. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, 1984. v. 6, n. 4, p. 225–230. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00140041>>.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T.; TULLOCH, A. P. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Journal of Chemistry**, 1961. v. 39, n. 6, p. 846–855. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/v61-104>>.

GRAND VIEW RESEARCH, I. Global surfactants market to be worth \$46.20 bn by 2022: Grand View Research. **Focus on Surfactants**, 2016. v. 2016, n. 1, p. 3. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1351421016000123>>.

GUILMANOV, V. *et al.* Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, 2002. v. 77, n. 5, p. 489–494. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.10177/full>>.

GUNAWAN, S.; VORDERBRUGGEN, M. A.; ARMSTRONG, C. D. Method of Using Sophorolipids or Mannosylerythritol Lipids as Acid Corrosion Inhibitors in Well Treatment Operations. **US Patent 2015/0299556 A1**, 2015. p. 15.

HAMME, J. D. VAN; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, 2006. v. 24, n. 6, p. 604–620. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16979315>>.

HAQUE, F. Sophorolipid, a biosurfactant, inhibits biofilm formation and interacts synergistically with Amphotericin B and Fluconazole on *Candida albicans*. [S.l.]: [s.n.], 2015. p. 1.

_____ *et al.* Inhibitory Effect of Sophorolipid on *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Growth. **Scientific Reports**, 31 jul. 2016. v. 6, n. 1, p. 23575. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/srep23575>>.

HARDIN, R. *et al.* Sophorolipids improve sepsis survival: effects of dosing and derivatives. **The Journal of Surgical Research**, 2007. v. 142, n. 2, p. 314–319. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719064>>.

HE, L. Y.; ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with the FLO1-derivative gene isolated from the flocculating yeast SPSC01 for constitutive flocculation and fuel ethanol production. **Applied Energy**, 2012. v. 100, p. 33–40. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.03.052>>.

HENKEL, M. *et al.* Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, 2012. v. 47, n. 8, p. 1207–1219. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511312001675>>.

HIRATA, Y.; RYU, M.; IGARASHI, K.; *et al.* Natural synergism of acid and lactone type mixed sophorolipids in interfacial activities and cytotoxicities (a). **Journal of Oleo Science**, 2009. v. 58, n. 11, p. 565–572. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19844071>>.

_____; _____. ODA, Y.; *et al.* Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, ago. 2009. v. 108, n. 2, p. 142–146. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19619862>>.

HOMMEL, R. K. *et al.* Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. **Journal of Biotechnology**, 1994. v. 33, n. 2, p. 147–155. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168165694901074>>.

HOMMEL, R. K. *et al.* The inducible microsomal fatty alcohol oxidase of *Candida (Torulopsis) apicola*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1994. v. 40, p. 729–734.

HOMMEL, R. K.; BAUM, A.; KLEBER, H. P. Petite mutants of sophorolipid-producing *Candida* yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, jan. 1994. v. 34, n. 1, p. 57–59. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8207665>>.

HU, Y.; JU, L.-K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS (a). **Enzyme and Microbial Technology**, 2001a. v. 29, n. 10, p. 593–601. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022901004392>>.

_____; _____. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. **Journal of Biotechnology**, maio. 2001b. v. 87, n. 3, p. 263–272. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334668>>.

IBRAHIM, M. L. *et al.* Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2013. v. 81, p. 28–34. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096483051300053X>>.

INGLIS, G. D.; SIGLER, L.; GOETTE, M. S. Aerobic microorganisms associated with alfalfa

leafcutter bees (*Megachile rotundata*). **Microbial Ecology**, 1993. v. 26, p. 125–143. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00177048>>. Acesso em: 27 set. 2013.

ISHII, N. *et al.* Transdermal administration of lactoferrin with sophorolipid. **Biochemistry and Cell Biology**, 2012. v. 90, n. 3, p. 504–512. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332813>>.

ITO, S.; INOUE, S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. **Applied and Environmental Microbiology**, 1982. v. 43, n. 6, p. 1278–1283. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=244227&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

_____; KINTA, M.; INOUE, S. Growth of Yeasts on n-Alkanes: Inhibition by a Lactonic Sophorolipid Produced by. **Agricultural and Biological Chemistry**, 9 set. 1980. v. 44, n. 9, p. 2221–2223. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00021369.1980.10864301>>.

JAMAL, P.; NAWAWI, W.; ALAM, M. Z. Optimum Medium Components for Biosurfactant Production by *Klebsiella pneumoniae* WMF02 Utilizing Sludge Palm Oil as a Substrate. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 2012. v. 6, n. 1, p. 100–108. Disponível em: <<http://www.ajbasweb.com/ajbas/2012/January/100-108.pdf>>.

JING, C. *et al.* Inhibition of K562 cancer cells by lactonic diacetyl-sophorolipid. **Chin J Appl Environ Biol**, 2015. v. 21, n. 2, p. 377–380.

JOHN, U. S.; JOHN, M. C. Production and Application of Microbial Surfactant from Cassava Wastewater. **American Journal of Engineering, Technology and Society**, 2015. v. 2, n. 4, p. 85–89.

JOSHI-NAVARE, K.; KHANVILKAR, P.; PRABHUNE, A. Jatropha oil derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive. **Biochemistry Research International**, jan. 2013. v. 2013, p. 1–11. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3880730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 jun. 2014.

JOSHI-NAVARE, K.; PRABHUNE, A. A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. **BioMed Research International**, jan. 2013. v. 2013, p. 1–5. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/512495/abs/>>. Acesso em: 4 jun. 2014.

KANG, S.-W. *et al.* Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, mar. 2010. v. 160, n. 3, p. 780–90. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19253005>>. Acesso em: 12 set. 2013.

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. The immobilization of whole cells: Engineering principles. **Chemical Engineering Science**, 1985. v. 40, n. 8, p. 1321–1354. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009250985800749>>.

KASTURE, M. B. *et al.* Multiutility sophorolipids as nanoparticle capping agents: synthesis of stable and water dispersible Co nanoparticles. **Langmuir**, 2007. v. 23, n. 23, p. 11409–11412. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17935370>>.

_____*et al.* Synthesis of silver nanoparticles by sophorolipids: Effect of temperature and sophorolipid structure on the size of particles. **Journal of Chemical Sciences**, 8 nov. 2008. v. 120, n. 6, p. 515–520. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12039-008-0080-6>>. Acesso em: 18 jun. 2014.

KAUR SEKHON, K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant Production and Potential Correlation with Esterase Activity. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, 2012. v. 3, n. 7. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/2157-7463/2157-7463-3-133.digital/2157-7463-3-133.html>>.

KIM, K. *et al.* Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2002. v. 12, n. 2, p. 235–241.

KIM, Y.-B.; YUN, H. S.; KIM, E.-K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. **Bioresource Technology**, 2009. v. 100, n. 23, p. 6028–6032. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19615892>>.

KLEKNER, V.; KOSARIC, N.; ZHOU, Q. H. Sophorose lipids produced from sucrose. **Biotechnology Letters**, 1991. v. 13, n. 5, p. 345–348. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF01027680>>.

KONISHI, M. *et al.* Isolation of yeast candidates for efficient sophorolipids production: their production potentials associate to their lineage. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2016. v. 8451, n. June, p. 1–7. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2016.1191332>>.

KOURKOUTAS, Y. *et al.* Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, 2004. v. 21, n. 4, p. 377–397.

KRIVOBOK, S. *et al.* Production and toxicity assessment of sophorosides from *Torulopsis bombicola*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1994. v. 42, p. 1247–1250. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00041a038>>. Acesso em: 24 set. 2013.

KURTZMAN, C. P. *et al.* Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella* (*Candida*) *bombicola* yeast clade. **FEMS Microbiology Letters**, 2010. v. 311, n. 2, p. 140–146. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20738402>>.

_____; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. *In*: CLETUS KURTZMAN TEUN BOEKHOUT, J. W. F. (Org.). **The Yeasts**. 5 ed. ed. San Diego: Elsevier, 2011, V. 1, p. 3–5.

LACHANCE, M.-A. *Starmerella Rosa & Lachance* (1998) Marc-Andre' Lachance Chapter. **The**

Yeasts, a Taxonomic Study. [S.l.]: Elsevier, 2011, p. 811–815.

LANGER, O. *et al.* Production and modification of bioactive biosurfactants. **Process Biochemistry**, 2006. v. 41, n. 10, p. 2138–2145. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511306003199>>.

LAWNICZAK, L.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013. v. 97, n. 6, p. 2327–2339. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3585901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LI, H. *et al.* In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Sophorolipids to Human Cervical Cancer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 29 out. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-016-2290-6>>.

LI, J.; XIA, C.; *et al.* Identification and characterization of a long-chain fatty acid transporter in the sophorolipid-producing strain *Starmerella bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7580-y>>.

_____; LI, H.; *et al.* Identification and characterization of a flavin-containing monooxygenase MoA and its function in a specific sophorolipid molecule metabolism in *Starmerella bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 28 fev. 2016. v. 100, n. 3, p. 1307–1318. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-7091-2>>.

LIU, X. *et al.* Sophorolipids production from rice straw via SO₃ micro-thermal explosion by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576. **AMB Express**, 2016. v. 6, n. 1, p. 60. Disponível em: <<http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-016-0227-7>>.

LIU, Y. *et al.* Advances in nutritional manipulation rumen functions of surfactants. **African Journal of Microbiology Research**, 2013. v. 7, n. 16, p. 1451–1458. Disponível em: <[http://www.academicjournals.org/AJMR/PDF/pdf2013/16Apr/Liu et al.pdf](http://www.academicjournals.org/AJMR/PDF/pdf2013/16Apr/Liu%20et%20al.pdf)>.

LOH, K.-C.; CHUNG, T.-S.; ANG, W.-F. Immobilized-Cell Membrane Bioreactor for High-Strength Phenol Wastewater. **Journal of Environmental Engineering**, jan. 2000. v. 126, n. 1, p. 75–79. Disponível em: <<http://ascelibrary.org/doi/10.1061/%28ASCE%290733-9372%282000%29126%3A1%2875%29>>.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, 2009. v. 31, n. 4, p. 255–261. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19496839>>.

MA, X. *et al.* Effects of nitrogen sources on production and composition of sophorolipids by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011. v. 91, n. 6, p. 1623–1632. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21590287>>.

MA, X.-J.; LI, H.; SONG, X. Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2012. v. 376, n. 1, p. 165–172. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459028>>.

MAGER, H.; RÖTHLISBERGER, R.; WAGNER, F. **Use of sophoroselipid-lactone for the treatment of dandruffs and body odour. European Patent EP0209783 A1.**

MAINGAULT, M. **Utilization of sophorolipids as therapeutically active substances or cosmetic products, in particular for the treatment of the skin. US Patent 5.981.497.** Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US5981497>>. Acesso em: 26 ago. 2014.

MANET, S. *et al.* Structure of Bolaamphiphile Sophorolipid Micelles Characterized with SAXS, SANS, and MD Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, 15 out. 2015. v. 119, n. 41, p. 13113–13133. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpccb.5b05374>>.

MANN, R. M.; BIDWELL, J. R. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. **Environmental Pollution**, 2001. v. 114, n. 2, p. 195–205. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504342>>.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, 2012. v. 30, n. 11, p. 558–565. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22901730>>.

MASARU, K. *et al.* **Composition for high-density cold storage transportation. Patent JP 21999000345173.**

MCCAFFREY, W. C.; COOPER, D. G. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using self-cycling fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1995. v. 79, n. 2, p. 146–151. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0922338X95940823>>.

MINUCELLI, T. *et al.* Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. **Waste and Biomass Valorization**, 9 abr. 2017. v. 8, n. 3, p. 743–753. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12649-016-9592-3>>.

MITTELBACH, M. *et al.* Nectar sugars and bird visitation define a floral niche for basidiomycetous yeast on the Canary Islands. **BMC Ecology**, 2015. v. 15, n. 1, p. 2. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6785/15/2>>.

MORYA, V. K. *et al.* Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource Technology**, 2013. v. 143C, p. 282–288. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23807367>>.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, 2005. v. 133, n. 2, p. 183–198. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519450>>.

_____; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, jul. 2001. v. 85, n. 1–2, p. 111–125. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463506>>.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; SYAHIDAH KU ISMAIL, K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, maio. 2004. v. 92, n. 3, p. 251–260. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852403002414>>.

NGUYEN, T. T. L. *et al.* Biocompatible lecithin-based microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: formulation and potential applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2010. v. 348, n. 2, p. 498–504. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471022>>.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 2002. v. 25, n. 5, p. 772–776. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n5/11408.pdf>>.

_____; _____. Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 2003. v. 31, p. 63–67. Disponível em: <<http://files.engenhariaagronomica.webnode.com/200000062-55ba356b43/bio31%5B1%5D.pdf#page=63>>.

NUÑEZ, A. *et al.* Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. **Chromatographia**, 2001. v. 53, p. 673–677. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02493019>>.

OGAWA, S.; OTA, Y. Influence of Exogenous Natural Oils on the w-1 and w-2 Hidroxy Fatty Acid Moiety of Sophorose Lipid Produced by *Candida bombicola*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2000. v. 64, n. 11, p. 2466–2468.

OTTO, R. T. *et al.* Production of sophorolipids from whey: II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1999. v. 52, n. 4, p. 495–501. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002530051551>>.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. *et al.* Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, 2011. v. 12, n. 1, p. 633–654. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3039971&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PAKSHIRAJAN, K.; SUMALATHA, S. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. **Clean Technologies and Environmental Policy**, 2010. v. 13, n. 3, p. 481–488. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10098-010-0330-4>>.

PALME, O. *et al.* Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2010. v. 112, n. 6, p. 663–673. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900163>>.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged

citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. **Microbial cell factories**, 2006. v. 5, n. 1, p. 3. Disponível em: <<http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-5-3>>.

PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells- a review. **Biotechnology Advances**, 2000. v. 18, p. 303–319.

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**, 2005. v. 5, n. 4, p. 357–362. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.200520086>>.

PELLECIER, F.; ANDRÉ, P. **Cosmetic use of sophorolipids as subcutaneous adipose cushion regulation agents and slimming application. World patent 2004108063 A2**. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Cosmetic+use+of+sophorolipids+as+subcutaneous+adipose+cushion+regulating+agents+and+slimming+application#0>>. Acesso em: 26 ago. 2014.

PENG, Y.; TOTSINGAN, F.; *et al.* Sophorolipids Expanding structural diversity by ring-opening cross-metathesis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2014. v. 116, p. 1–12.

_____; MUNOZ-PINTO, D. J.; *et al.* Poly(sophorolipid) Structural Variation: Effects on Biomaterial Physical and Biological Properties. **Biomacromolecules**, 10 nov. 2014. v. 15, n. 11, p. 4214–4227. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm501255j>>.

PEREIRA, A. P. *et al.* Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. **LWT - Food Science and Technology**, 2014. v. 56, n. 1, p. 21–30. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.005>>.

PESCE, L. **A biotechnological method for the regeneration of hydrocarbons from dregs and muds, on the base of biosurfactants. World patent 2002062495 A1**. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:A+biotechnological+method+for+the+regeneration+of+hydrocarbons+from+dregs+and+muds,+on+the+base+of+biosurfactants#0>>. Acesso em: 26 ago. 2014.

PIERCE, D.; HEILMAN, T. J. **Germicidal composition. Patent US 6.262.038 B1**. Disponível em: <<http://www.google.com/patents?hl=en&lr=&vid=USPAT4557935&id=is8rAAAABAJ&oi=fnd&dq=Germicidal+Composition&printsec=abstract>>. Acesso em: 20 set. 2013.

PONTES, C. *et al.* Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **International Journal of Pharmaceutics**, nov. 2016. v. 513, n. 1–2, p. 697–708. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731630919X>>.

PRABHUNE, A. A. *et al.* Fluorescent, Spherical Sophorolipid Mesostructures For Imaging And Therapeutic Applications. **US Patent 2015/0139910 A1**, 2015. p. 16.

PRICE, N. P. J. *et al.* Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. **Carbohydrate Research**, 2012. v. 348, p. 33–41. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197069>>.

RADIANT INSIGHTS. **Biosurfactants Market Size, Share, Growth, Trend & Research Report 2020: Radiant Insights, Inc. Market Report Radiant Insights**. [S.l.]: [s.n.], 2014.

RATSEP, P.; SHAH, V. Identification and quantification of sophorolipid analogs using ultra-fast liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, 2009. v. 78, n. 3, p. 354–356. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559734>>.

RAU, U. *et al.* Sophorolipids: a source for novel compounds. **Industrial Crops and Products**, 2001. v. 13, n. 2, p. 85–92. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669000000558>>.

_____; MANZKE, C.; WAGNER, F. Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Biotechnology Letters**, fev. 1996. v. 18, n. 2, p. 149–154. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00128670>>.

RAZMOVSKI, R.; MILANOVIC, V. Use of *Saccharomyces Cerevisiae* Cells Immobilized on New Combined Maize Stems Ground Tissue-Alginate. **Zbornik radova Tehnološkog fakulteta u Leskovcu**, 2009. v. 19, p. 52–58.

RAZMOVSKI, R.; PEJIN, D. Immobilization of *Saccharomyces diastaticus* on wood chips for ethanol production. **Folia microbiologica**, 1996. v. 41, n. 2, p. 201–7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9138314>>.

_____; VUČUROVIĆ, V. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate–maize stem ground tissue matrix. **Enzyme and Microbial Technology**, abr. 2011. v. 48, n. 4–5, p. 378–385. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022911000044>>.

RAZMOVSKI, R.; VUČUROVIĆ, V. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. **Fuel**, 2012. v. 92, n. 1, p. 1–8.

REZNIK, G. O. *et al.* Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010. v. 86, n. 5, p. 1387–1397. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094712>>.

RIBEIRO, I. A.; BRONZE, M. R.; *et al.* Sophorolipids: improvement of the selective production by *Starmerella bombicola* through the design of nutritional requirements (a). **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012a. v. 97, n. 5, p. 1875–1887. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064480>>.

RIBEIRO, I. A.; BRONZE, M. R.; *et al.* Design of selective production of sophorolipids by *Rhodotorula bogoriensis* through nutritional requirements. **Journal of Molecular Recognition**, 2012. v. 25, n. 11, p. 630–640.

RIBEIRO, I. A.; BRONZE, M. R.; *et al.* Optimization and correlation of HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS methods for identification and characterization of sophorolipids. **Journal of Chromatography B**, 2012b. v. 899, p. 72–80. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22640901>>.

RIBEIRO, I. A. C. *et al.* Development of novel sophorolipids with improved cytotoxic activity toward MDA-MB-231 breast cancer cells. **Journal of Molecular Recognition**, mar. 2015. v. 28, n. 3, p. 155–165. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmr.2403>>.

RIENZO, M. A. D. De *et al.* Antimicrobial properties of sophorolipids produced by *Candida Bombicola* ATCC 22214 against gram positive and Gram-negative bacteria. **New Biotechnology**, jul. 2014. v. 31, n. July, p. S66–S67. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.05.1764>>. Acesso em: 14 ago. 2014.

RISPOLI, F. J.; BADIA, D.; SHAH, V. Optimization of the fermentation media for sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design. **Biotechnology Progress**, 2010. v. 26, n. 4, p. 938–44. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205261>>. Acesso em: 24 set. 2013.

ROELANTS, S. L. K. W. *et al.* *Candida bombicola* as a Platform Organism for the Production of Tailor-Made Biomolecules. **Biotechnology and Bioengineering**, 2013. v. 110, n. 9, p. 2494–2503. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475585>>.

_____ *et al.* Biosurfactant gene clusters in eukaryotes: regulation and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 15 abr. 2014. v. 98, n. 8, p. 3449–3461. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24531239>>. Acesso em: 23 mar. 2014.

ROELANTS, S. L. K. W. *et al.* Towards the industrialization of new biosurfactants: Biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmerella bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, mar. 2016. v. 113, n. 3, p. 550–559. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.25815>>.

ROSA, C. A. *et al.* Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, 2003. v. 4, n. 3, p. 271–275. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567135603001739>>.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M.-A. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1 out. 1998. v. 48, n. 4, p. 1413–1417. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-48-4-1413>>.

ROUSE, J. D. *et al.* Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 1994. v. 24, n. 4, p. 325–370. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643389409388471>>.

ROWLEY, J. A.; MADLAMBAYAN, G.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. **Biomaterials**, 1999. v. 20, n. 1, p. 45–53.

SAERENS, K. *et al.* Production of glucolipids and specialty fatty acids from sophorolipids by *Penicillium decumbens* naringinase: Optimization and kinetics. **Biotechnology Journal**, 2009. v. 4, n. 4, p. 517–524. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194976>>.

SAERENS, K. M. J. *et al.* Identification of the UDP-glucosyltransferase gene UGT1A1, responsible for the first glucosylation step in the sophorolipid biosynthetic pathway of *Candida bombicola* ATCC 22214. **FEMS Yeast Research**, 2011. v. 11, n. 1, p. 123–132. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073653>>.

SAMAD, A. *et al.* Sophorolipid Production from Biomass Hydrolysates. **Applied biochemistry and biotechnology**, 5 dez. 2014. n. August. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25475889>>. Acesso em: 9 dez. 2014.

SANTOS, D. T. *et al.* Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. **Journal of Food Engineering**, 2008. v. 86, n. 4, p. 542–548.

SANTOS, J. C. *et al.* Immobilized cells cultivated in semi-continuous mode in a fluidized bed reactor for xylitol production from sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2005. v. 21, n. 4, p. 531–535.

SATPUTE, S. K. *et al.* Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, 2010. v. 28, n. 4, p. 436–450. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20172021>>.

SCHIPPERS, C. *et al.* Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. **Journal of Biotechnology**, 2000. v. 83, n. 3, p. 189–198. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051416>>.

SCHOFIELD, M. H.; THAVASI, T. R.; GROSS, R. A. **Modified Sophorolipids For The Inhibition Of Plant Pathogens. Patent US 2013/00850670 A1**. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2013052615>>. Acesso em: 22 set. 2013.

SHAH, S.; PRABHUNE, A. A. Purification by silica gel chromatography using dialysis tubing and characterization of sophorolipids produced from *Candida bombicola* grown on glucose and arachidonic acid. **Biotechnology Letters**, 2007. v. 29, n. 2, p. 267–272. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17091375>>.

SHAH, V. *et al.* Sophorolipids , Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2005. v. 49, n. 10, p. 4093–4100. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1251511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

_____; BADIA, D.; RATSEP, P. Sophorolipids Having Enhanced Antibacterial Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1 jan. 2007. v. 51, n. 1, p. 397–400. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797649&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

_____; JURJEVIC, M.; BADIA, D. Utilization of Restaurant Waste Oil as a Precursor for Sophorolipid Production. **Biotechnology Progress**, 9 abr. 2007. v. 23, n. 2, p. 512–515. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17286413>>.

SHAO, L. *et al.* Bioactivities of sophorolipid with different structures against human

esophageal cancer cells. **The Journal of surgical research**, abr. 2012. v. 173, n. 2, p. 286–91. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21035135>>. Acesso em: 23 maio 2014.

SHETE, A. M. *et al.* Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, 2006. v. 65, n. February, p. 91–115. Disponível em: <<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/4804>>.

SHI, L.-E. *et al.* Encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* in carrageenan-locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure. **LWT - Food Science and Technology**, nov. 2013. v. 54, n. 1, p. 147–151. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.027>>.

SHIN, J.-D. *et al.* Production and characterization of methyl ester sophorolipids with 22-carbon-fatty acids. **Bioresource Technology**, 2010. v. 101, n. 9, p. 3170–3174. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20053555>>.

SILVA, S. S. *et al.* Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* immobilized on porous glass. **Process Biochemistry**, 2003. v. 38, n. 6, p. 903–907.

SINGH, A.; HAMME, J. D. VAN; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, 2007. v. 25, n. 1, p. 99–121. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156965>>.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications. **Bioresource Technology**, 2008. v. 99, n. 8, p. 2824–2830. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681787>>.

SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, 1990. v. 8, n. March, p. 71–78. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167779990901390>>.

SMYTH, T. J. P. *et al.* **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (b)**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.

SOLAIMAN, D. K. Y. *et al.* Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. **Biotechnology Letters**, 2004. v. 26, n. 15, p. 1241–1245. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289681>>.

_____ *et al.* Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology Letters**, 31 jul. 2007. v. 29, n. 9, p. 1341–1347. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17541506>>.

SOLAIMAN, D. K. Y. *et al.* Control-release of antimicrobial sophorolipid employing different biopolymer matrices. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, jul. 2015. v. 4, n. 3, p. 342–348. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187881811500078X>>.

SPENCER, J. F. T.; GORIN, P. A. J.; TULLOCH, A. P. *Torulopsis bombicola* sp.n. **Antonie van Leeuwenhoek**, 1970. v. 36, n. 1, p. 129–133. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5310304>>.

SUGITA, T.; NAKASE, T. Nonuniversal usage of the leucine CUG codon in yeasts: Investigation of basidiomycetous yeast. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 1999. v. 45, n. 4, p. 193–197. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12501377>>.

SUN, M. *et al.* Impact of bioaccessible pyrene on the abundance of antibiotic resistance genes during *Sphingobium* sp.- and sophorolipid-enhanced bioremediation in soil. **Journal of Hazardous Materials**, 2015. v. 300, p. 121–128. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.065>>.

SUN, X.-X. *et al.* Synergistic effect of sophorolipid and loess combination in harmful algal blooms mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, maio. 2004. v. 48, n. 9–10, p. 863–72. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111033>>. Acesso em: 30 ago. 2014.

TULLOCH, A. P.; HILL, A.; SPENCER, J. F. T. Structure and reactions of lactonic and acidic sophorosides of 17-hydroxyoctadecanoic acid. **Canadian Journal of Chemistry**, 1968. v. 46, p. 3337–3351. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/v68-551>>. Acesso em: 28 set. 2013.

_____; SPENCER, J. F. T. Fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis apicola*. IV. Products from esters and hydrocarbons with 14 and 15 carbon atoms and from methyl palmitoleate. **Canadian Journal of Chemistry**, maio. 1968. v. 46, n. 9, p. 1523–1528. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/v68-249>>.

VAUGHN, S. F. *et al.* Utilization of sophorolipids as biosurfactants for postemergence herbicides. **Crop Protection**, maio. 2014. v. 59, p. 29–34. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219414000568>>. Acesso em: 2 abr. 2014.

VERBELEN, P. J. *et al.* Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, 2006. v. 28, n. 19, p. 1515–1525.

VIDHYA, V. *et al.* Utilization of Synthetic Dairy Waste Water and Waste Oil for the Production of Sophorolipid from *Starmerella bombicola* MTCC 1910 and Testing its Antimicrobial Activity. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2015. v. 4, n. 12, p. 555–565.

VILELA, A. *et al.* Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013. v. 97, n. 11, p. 4991–5000.

VUCUROVIC, V. M.; RAZMOVSKI, R. N. Sugar beet pulp as support for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, 2012. v. 39, n. 1, p. 128–134.

WADEKAR, S. D. *et al.* *Jatropha* oil and karanja oil as carbon sources for production of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2012. v. 114, n. 7, p. 823–

832. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201100282>>.

YANG, X. *et al.* Recovery of purified lactonic sophorolipids by spontaneous crystallization during the fermentation of sugarcane molasses with *Candida albicans* O-13-1. **Enzyme and Microbial Technology**, 2012. v. 51, n. 6–7, p. 348–353. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23040390>>.

YE, M. *et al.* Feasibility of lettuce cultivation in sophorolipid-enhanced washed soil originally polluted with Cd, antibiotics, and antibiotic-resistant genes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2016. v. 124, p. 344–350. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651315301627>>.

YOO, D.-S.; LEE, B.-S.; KIM, E.-K. Characteristics of Microbial Surfactants as Antifungal Agent Against Plant Pathogenic Fungus. **Journal of Microbiological Methods**, 2005. v. 15, n. 6, p. 1164–1169.

YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. **Journal of Biotechnology**, 2007. v. 129, n. 3, p. 415–420.

YUAN, B.; YANG, S.; CHEN, J. Antimicrobial Activity of Sophorolipids on Pathogenic Fungi Isolated from Fruits*. **Chinese Journal of Applied Environmental Biology**, 1 fev. 2012. v. 17, n. 3, p. 330–333. Disponível em: <<http://pub.chinasciencejournal.com/article/getArticleRedirect.action?doiCode=10.3724/SP.J.1145.2011.00330>>. Acesso em: 13 set. 2013.

ZHANG, J. *et al.* Investigation of Inhibition Properties of Sophorolipids for X65 Steel Corrosion in Simulated Oilfield Produced Water Saturated with Carbon Dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2015. p. 150428053607004. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie5044055>>.

ZHANG, L. *et al.* Synthesis and interfacial properties of sophorolipid derivatives. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2004. v. 240, n. 1–3, p. 75–82. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777570400127X>>.

ZHANG, X. *et al.* Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on the surface of spinach leaves by biobased antimicrobial surfactants. **Food Control**, fev. 2016. v. 60, p. 158–165. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515301146>>.

ZHANG, Y. *et al.* Continuous acetone-butanol-ethanol production by corn stalk immobilized cells. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2009. v. 36, n. 8, p. 1117–1121.

ZHAO, J.; XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal**, mar. 2010. v. 49, n. 1, p. 28–32. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.007>>.

ZHOU, L. C. *et al.* Use of microorganisms immobilized on composite polyurethane foam to remove Cu(II) from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, 2009. v. 167, n. 1–3, p. 1106–1113.

ZHOU, Q.-H.; KOSARIC, N. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, jan. 1995. v. 72, n. 1, p. 67–71. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02635781>>.

ZHOU, Q. H.; KLEKNER, V.; KOSARIC, N. Production of sophorose lipids by *Torulopsis bombicola* from safflower oil and glucose. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 1992. v. 69, n. 1, p. 89–91. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02635883>>.

_____; KOSARIC, N. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, maio. 1993. v. 15, n. 5, p. 477–482. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00129322>>.

APÊNDICE A – RESULTADOS COMPLEMENTARES

A partir dos resultados complementares será elaborado o artigo “Comparação estrutural dos sofrorolípídeos produzidos por batelada células livres, células em repouso e células imobilizadas”

Cinética da produção de sofrorolípídeos por células livres

Parâmetros									
Ensaio	T	pH _f	X _t	S _a	S _o	S _T	P	Y _{p/s}	Q
1	0	6,00±0,00	0,10±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000
2	24	5,42±0,09	7,32±0,082	19,16±0,541	1,33±0,065	20,49±0,598	1,48±0,236	7,30±1,346	1,48±0,236
3	48	3,96±0,02	13,05±0,439	33,99±0,631	4,47±0,158	38,46±0,689	6,50±0,186	16,94±0,792	3,25±0,093
4	72	3,41±0,05	14,55±0,595	40,13±0,162	9,27±0,239	49,40±0,283	12,17±0,419	24,64±0,834	4,06±0,140
5	96	3,14±0,04	15,38±0,269	44,27±0,777	13,47±0,230	60,39±0,960	17,42±0,215	28,86±0,324	4,36±0,054
6	120	3,12±0,04	14,90±0,255	46,67±0,548	14,33±0,118	61,30±1,033	18,73±0,555	30,60±1,445	3,75±0,111
7	144	3,14±0,05	15,90±0,187	49,54±0,383	14,71±0,217	62,44±0,596	17,43±0,371	27,92±0,416	2,91±0,062
8	168	3,23±0,10	15,54±0,632	51,59±0,691	16,06±0,175	63,51±0,590	17,73±0,451	27,91±0,473	2,53±0,064
9	192	3,36±0,09	14,58±0,361	51,29±0,845	15,86±0,231	64,02±0,310	17,76±0,511	27,74±0,715	2,22±0,064

1) Abreviações: pH_f - pH Final; X_i: Biomassa Imobilizada (g/L); X_f: Biomassa Livre (g/L); X_t: Biomassa Total (g/L); R: Retenção de Células no Suporte (g./g_{AlB}); X_s: Fuga de Células (%); Y_i: Eficiência de Imobilização (%); S_a: Consumo de Glicose (g/L); S_o: Consumo de Óleo de Girassol (g/L); S_T: Consumo Total de Carbono (g/L); P: Produção de Sofrorolípídeos (g/L); Y_{p/s} - Rendimento de Produção (g/g); Q - Produtividade Volumétrica (g/L.d). 2) Os resultados apresentados referem-se ao valor médio das triplicatas ± erro padrão.

Cinética de produção de sofrorolípídeos por células em repouso

Parâmetros									
Ensaio	T	pH _f	X _t	S _a	S _o	S _T	P	Y _{p/s}	Q
1	0	6,00±0,000	5,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000
2	24	3,24±0,037	5,68±0,155	19,86±0,652	6,63±0,477	26,49±0,388	7,55±0,174	28,54±0,975	7,55±0,174
3	48	3,29±0,031	7,23±0,314	29,15±0,300	8,97±0,236	38,12±0,524	11,48±0,241	30,15±1,001	5,74±0,121
4	72	3,45±0,069	8,12±0,084	34,32±1,062	9,54±0,130	43,86±1,017	17,49±0,425	39,93±1,670	5,83±0,142
5	96	3,15±0,049	8,13±0,105	37,57±0,274	12,50±0,048	50,08±0,235	22,25±0,546	44,43±0,882	5,56±0,136
6	120	3,13±0,067	8,37±0,142	34,69±1,114	14,50±0,134	50,80±1,247	22,96±0,501	45,26±1,494	4,59±0,100
7	144	3,06±0,053	8,88±0,403	37,60±0,154	15,15±0,347	52,75±0,258	22,83±0,352	43,28±0,865	3,80±0,059
8	168	3,00±0,012	8,62±0,313	37,07±0,560	16,11±0,213	53,18±0,767	23,72±0,180	44,61±0,614	3,39±0,026
9	192	3,05±0,081	8,39±0,443	36,62±0,409	14,78±0,258	51,40±0,667	23,76±0,105	46,23±0,396	2,97±0,013

1) Abreviações: pH_f - pH Final; X_i: Biomassa Imobilizada (g/L); X_f: Biomassa Livre (g/L); X_t: Biomassa Total (g/L); R: Retenção de Células no Suporte (g./g_{AlB}); X_s: Fuga de Células (%); Y_i: Eficiência de Imobilização (%); S_a: Consumo de Glicose (g/L); S_o: Consumo de Óleo de Girassol (g/L); S_T: Consumo Total de Carbono (g/L); P: Produção de Sofrorolípídeos (g/L); Y_{p/s} - Rendimento de Produção (g/g); Q - Produtividade Volumétrica (g/L.d). 2) Os resultados apresentados referem-se ao valor médio das triplicatas ± erro padrão.

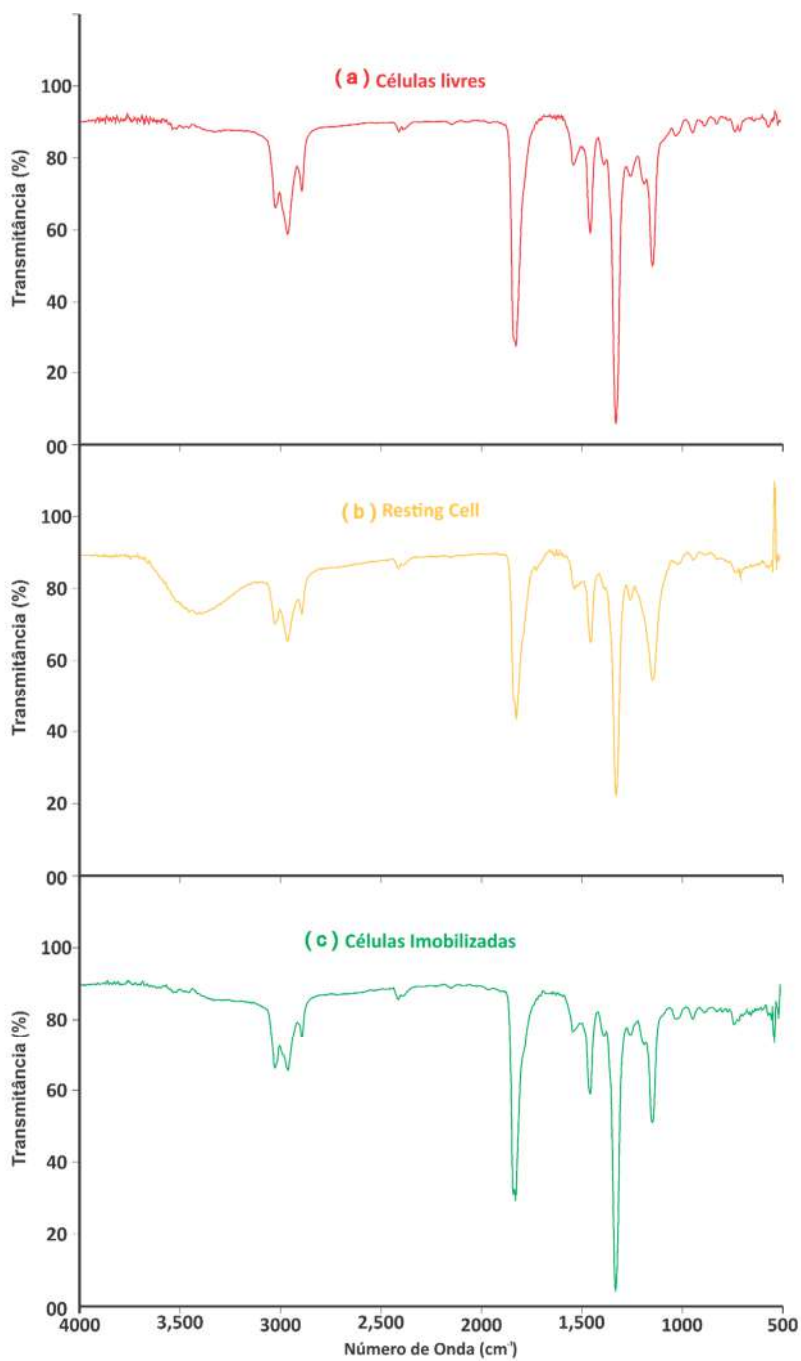
Cinética de produção de soforolipídeos por células imobilizadas

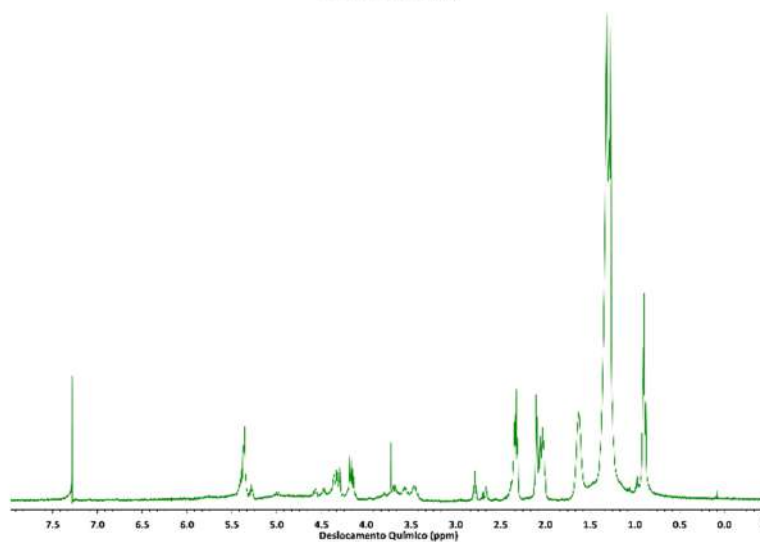
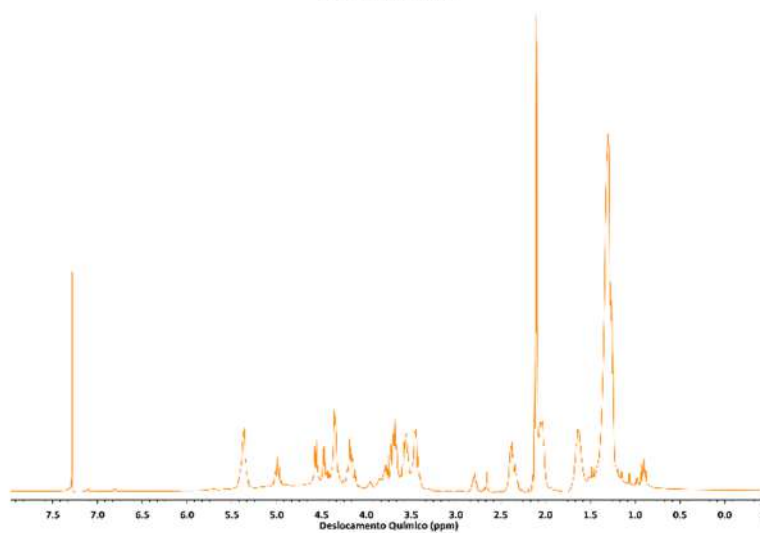
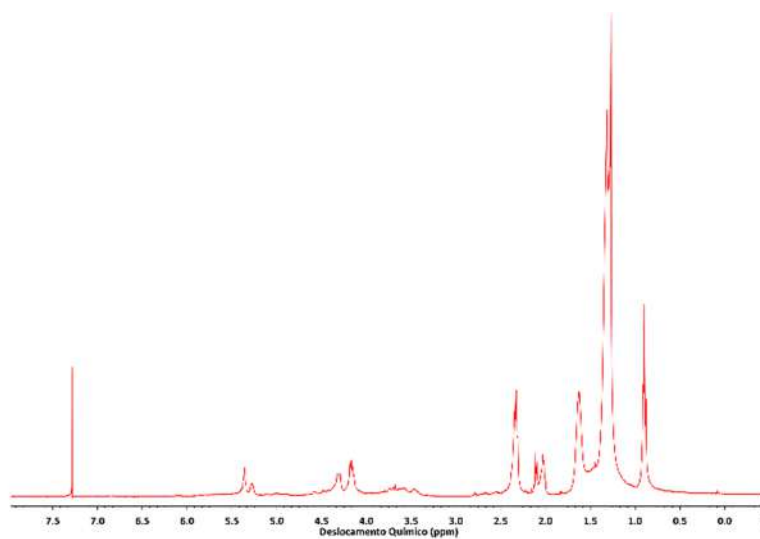
Tempo de fermentação				
Parâmetros	24h	48h	72h	96h
pH _f	4,837±0,024	4,13±0,006	3,797±0,032	3,307±0,022
X _i	5,518±0,081	5,799±0,163	6,088±0,092	6,145±0,075
X _f	0,254±0,013	0,471±0,017	0,954±0,036	1,06±0,039
X _t	5,772±0,094	6,27±0,171	7,042±0,059	7,204±0,04
R	0,184±0,003	0,193±0,005	0,203±0,003	0,205±0,003
X _s	4,396±0,147	7,521±0,241	13,561±0,615	14,715±0,609
Y _i	95,604±0,147	92,479±0,241	86,439±0,615	85,285±0,609
S _a	20,848±0,261	27,363±0,409	32,974±1,059	36,748±1,297
S _o	2,185±0,043	2,947±0,063	3,793±0,127	4,664±0,085
S _T	23,034±0,303	30,31±0,428	36,767±1,124	41,412±1,251
P	0,662±0,031	1,551±0,049	2,778±0,093	3,045±0,085
Y _{p/s}	2,878±0,168	5,117±0,125	7,575±0,398	7,364±0,262
Q	0,662±0,031	0,776±0,024	0,926±0,031	0,761±0,021

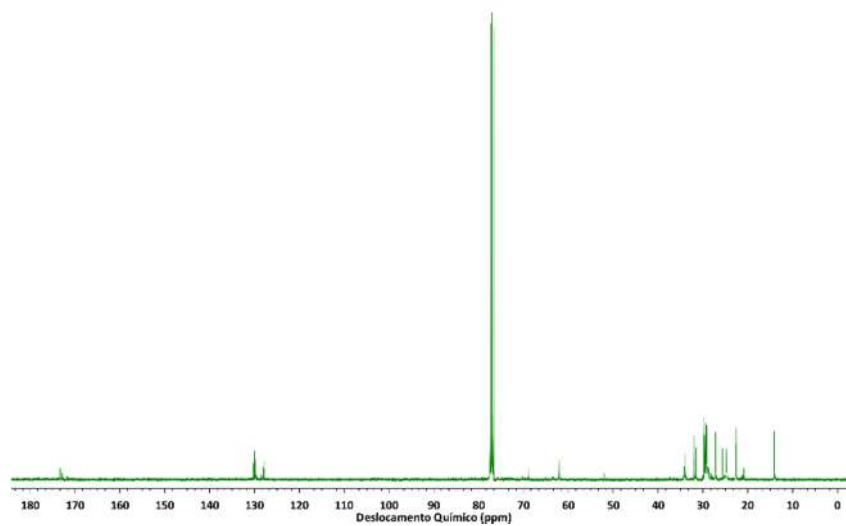
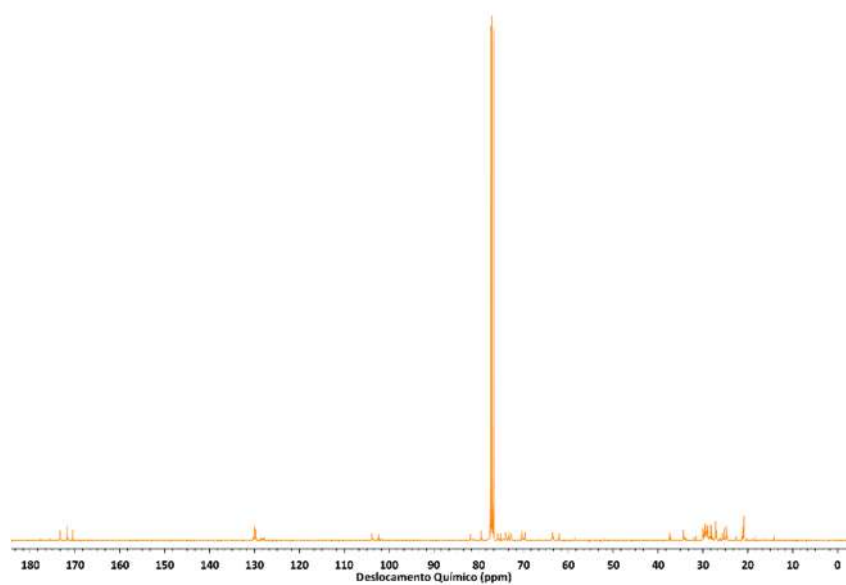
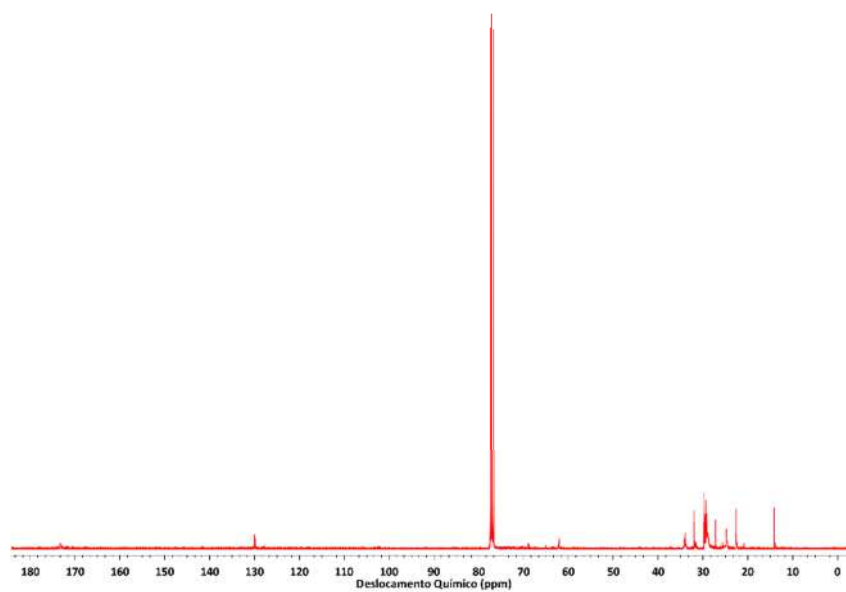
Tempo de fermentação				
Parâmetros	120h	144h	168h	192h
pH _f	3,057±0,033	2,963±0,097	2,803±0,024	2,663±0,018
X _i	6,114±0,067	6,124±0,091	6,162±0,094	6,244±0,124
X _f	1,209±0,044	1,131±0,056	1,201±0,055	1,189±0,009
X _t	7,323±0,037	7,255±0,074	7,364±0,136	7,434±0,121
R	0,204±0,002	0,204±0,003	0,205±0,003	0,208±0,004
X _s	16,517±0,644	15,592±0,786	16,302±0,519	16,009±0,31
Y _i	83,483±0,644	84,408±0,786	83,698±0,519	83,991±0,31
S _a	36,509±0,479	37,49±0,78	40,072±1,057	42,072±0,945
S _o	4,876±0,063	5,505±0,256	5,498±0,169	5,464±0,265
S _T	41,385±0,417	42,995±0,591	45,569±1,181	47,536±0,791
P	3,077±0,08	3,062±0,079	3,18±0,076	3,252±0,048
Y _{p/s}	7,434±0,133	7,125±0,227	6,979±0,06	6,848±0,208
Q	0,615±0,016	0,51±0,013	0,454±0,011	0,407±0,006

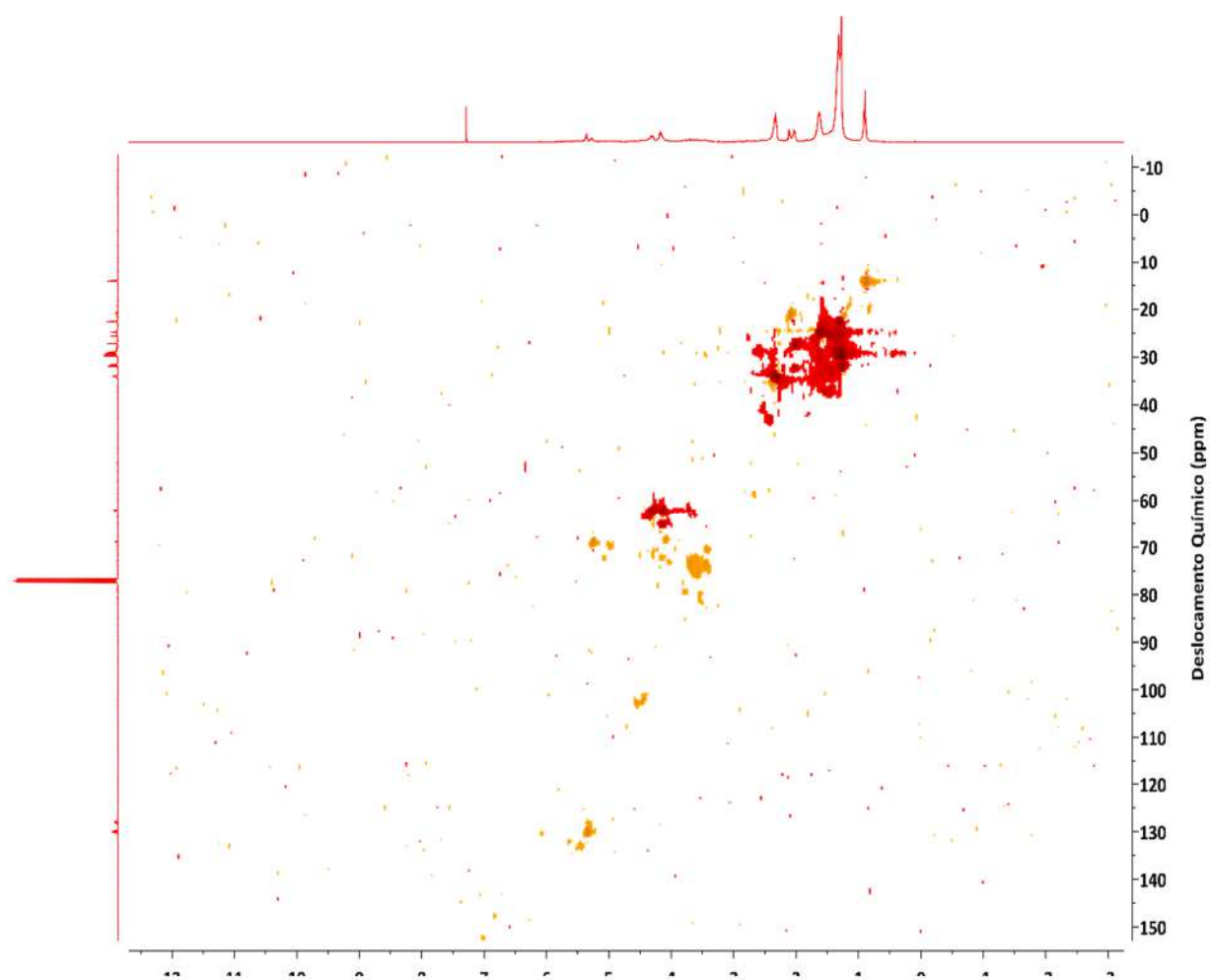
1) Abreviações: pH_f - pH Final; X_i: Biomassa Imobilizada (g/L); X_f: Biomassa Livre (g/L); X_t: Biomassa Total (g/L); R: Retenção de Células no Suporte (g_s/g_{alg}); X_s: Biomassa Livre (%); Y_i: Eficiência de Imobilização (%); S_a: Consumo de Glicose (g/L); S_o: Consumo de Óleo de Girassol (g/L); S_T: Consumo Total de Carbono (g/L); P: Produção de Soforolipídeos (g/L); Y_{p/s} - Rendimento de Produção (g/g); Q - Produtividade Volumétrica (g/L.d). 2) Os resultados apresentados referem-se ao valor médio de triplicatas ± erro padrão.

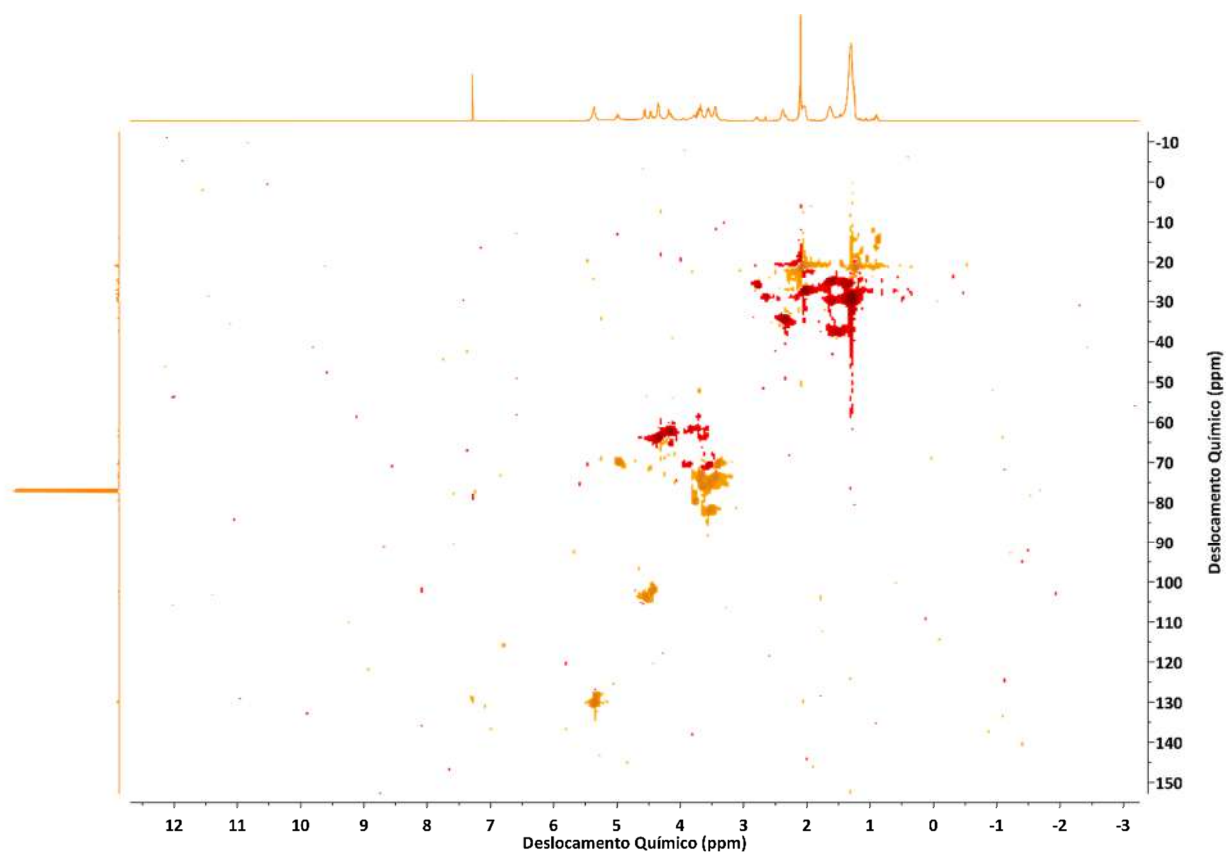
Espectros de FTIR de sofrorolípídeos produzidos por células livres, células em repouso e células imobilizadas

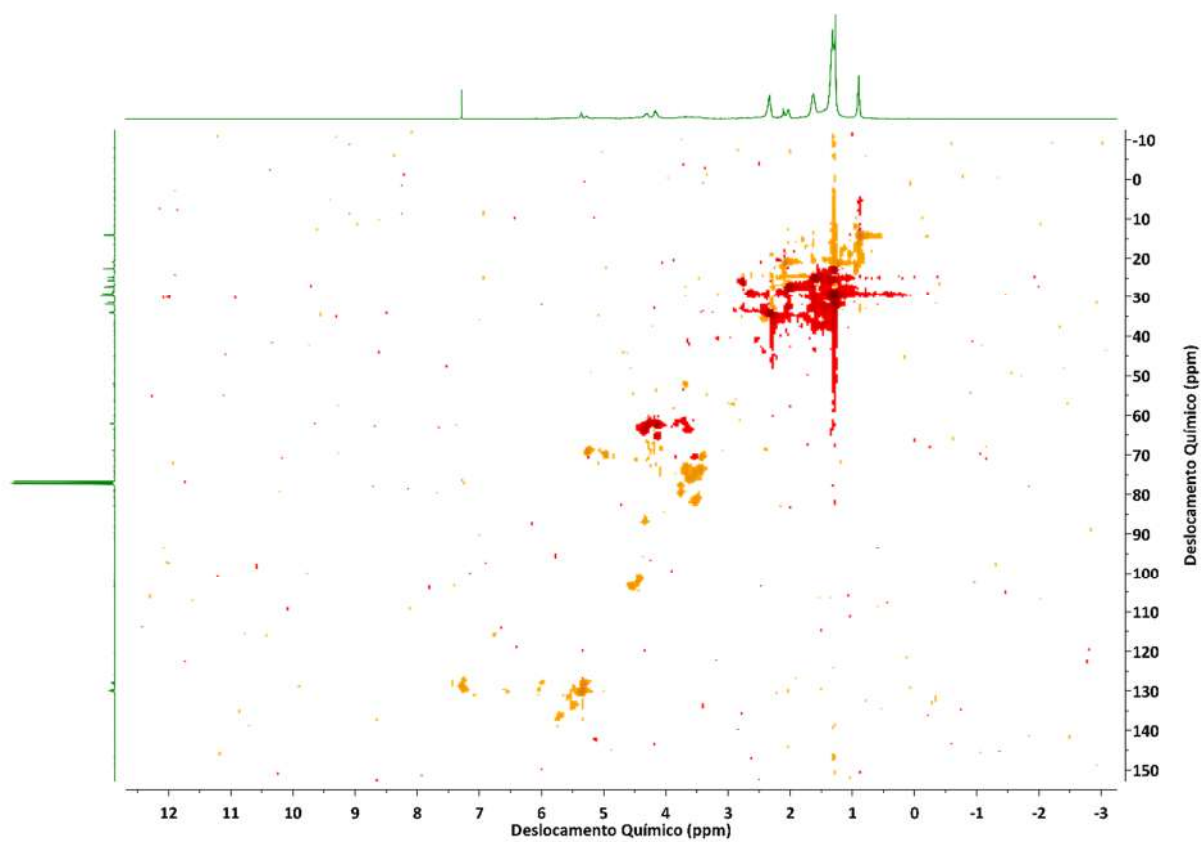


RMN ^1H dos sofrorlipídeos produzidos por células livres, células em repouso e imobilizadas

RMN ^{13}C dos sofrorolídeos produzidos por células livres, células em repouso e imobilizadas

RMN HSQC ou bidimensional dos sofrorolípídeos produzidos por células livres

RMN HSQC ou bidimensional dos sofrorolipídeos produzidos por células em repouso

RMN HSQC ou bidimensional dos soforolipídeos produzidos para células imobilizadas

Espectros de massas dos sofrorolídeos produzidos por células livres, células em repouso e células imobilizadas

