



NATALIA DE ANDRADE TEIXEIRA FERNANDES

**USES OF GLICOLIPIDIC BIOSURFACTANT PRODUCED BY
THE YEAST *Whickerhamomyces anomalus* CCMA 0358**

**LAVRAS – MG
2018**

NATALIA DE ANDRADE TEIXEIRA FERNANDES

USES OF GLICOLIPIDIC BIOSURFACTANT PRODUCED BY THE YEAST

***Whickerhamomyces anomalus* CCMA 0358**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

Orientador

Prof. Dra. Rosane Freitas Schwan

Dra. Angélica Cristina de Souza

Co-orientadoras

LAVRAS-MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Fernandes, Natalia de Andrade Teixeira.

Uses of Glicolipidic Biosurfactant Produced by the Yeast
Whickerhamomyces anomalus CCMA 0358 / Natalia de Andrade
Teixeira Fernandes. - 2018.

67 p.

Orientador(a): Disney Ribeiro Dias.

Coorientador(a): Rosane Freitas Schwan, Angélica Cristina de
Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Biossurfactantes. 2. Potencial biotecnológico. 3. Atividade
antimicrobiana. I. Dias, Disney Ribeiro. II. Schwan, Rosane Freitas.
III. Souza, Angélica Cristina de. IV. Título.

NATALIA DE ANDRADE TEIXEIRA FERNANDES

USES OF GLICOLIPIDIC BIOSURFACTANT PRODUCED BY THE YEAST

***Whickerhamomyces anomalus* CCMA 0358**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 13 de março de 2018.

Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dra. Maria Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel	UFLA
Dr. Massaharu Ikegaki	UNIFAL

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias
Orientador
Prof. Dra. Rosane Freitas Schwan
Dra. Angélica Cristina de Souza
Co-orientadoras

LAVRAS-MG

2018

*Dedico este trabalho com muito amor, aos
meus pais, e a minha família.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as oportunidades maravilhosas que surgiram na minha vida e por todo o apoio e consolo durante essa jornada de dois anos.

Aos meus pais, Hélio e Marisa, e ao meu irmão Pedro, que lutaram junto comigo para que esse sonho tornasse realidade, acreditando cada segundo no meu potencial, me apoiando em todos os momentos e muitas vezes se sacrificando para que isso se tornasse realidade. Amo vocês.

Aos meus avós, Zizinho, Zizinha e Mirtes, hoje nenhum comigo na terra, mas estão comigo a todo momento em pensamento e no meu coração. Obrigada por toda a ajuda e apoio que me deram na minha criação e educação.

Ao meu orientador, Professor Disney, que aceitou me orientar e me ajudou muito nesse trabalho.

À Luara, Angélica e Karla, pela disponibilidade de me ajudar quando precisei em laboratório e na escrita desse trabalho.

Aos meus amigos, Bruna, Jober, Luana, Natália e Rogério, que agora, mesmo distantes, continuam me apoiando nessa jornada.

Às minhas amigas de Lambari, que sempre estiveram presentes.

Aos membros da banca, que disponibilizaram seu tempo para ler este trabalho e para estarem presentes no dia da defesa.

Às meninas da República Desatino, por todo apoio e amizade nesse tempo.

Aos meninos da República Pirambeira pela amizade e os dias de almoço quando precisei.

Aos meus colegas de laboratório, por toda descontração em momentos de tensão, obrigada Fusão.

À UFLA e ao departamento de Biologia, pelo acolhimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, em especial à secretária Rose, por fazer tudo com tanto carinho e cuidado.

À Fapemig pela concessão da bolsa de estudos.

MUITO OBRIGADA!

Resumo Geral

Os biossurfactantes são metabólitos secundários produzidos na fase estacionária de crescimento microbiano, de natureza anfifílica e têm o potencial para ser aplicado em várias indústrias, como detergentes, de petróleo, produtos farmacêuticos, cosméticos e indústria de alimentos. As bactérias são o principal grupo de microrganismos produtores de biossurfactantes, mas também são produzidos por fungos filamentosos e leveduras. Uma das maiores vantagens do uso de leveduras na produção de biossurfactantes é que a maioria possui o status GRAS (*generally recognized as safe*), que permite a aplicação de seus produtos na indústria farmacêutica e de alimentos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de um glicolípido produzido pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* (CCMA 0358) utilizando diferentes substratos, tais como azeite de oliva, óleo de soja usado e azeite de dendê. A atividade antibacteriana e antiadesiva do biossurfactante bruto foram determinadas utilizando o método de microdiluição em placas contra as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* avaliadas em diferentes concentrações. A atividade antifúngica foi realizada, contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cercospora sorghi*, *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium solani*. Os resultados demonstraram que a levedura *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 é capaz de produzir biossurfactante em diferentes substratos, o qual foi capaz de inibir o crescimento e a adesão de todas as bactérias avaliadas, demonstrando a capacidade antibacteriana de até 100% e antiadesiva, atingindo 31% de inibição. Além disso, inibiu o crescimento de todos os fungos fitopatógenos e contaminantes de alimentos utilizados em até 95% em relação ao controle. Além de mostrar resultados promissores antimicrobianos contra bactérias e fungos contaminantes de alimentos e fungos fitopatogênicos, a levedura *W. anomalus* é capaz de produzir o biossurfactante a partir de um substrato barato, como o óleo de soja usado, o que permite uma maior possibilidade de aplicações industriais devido ao seu baixo custo.

Palavras-chave: Biossurfactante, potencial biotecnológico, atividade antimicrobiana, antiadesivo, antifúngico.

Abstract

Biosurfactants are secondary metabolites produced in the stationary phase of microbial growth, of an amphiphilic nature and have the potential to be applied in various industries, such as detergents, petroleum, pharmaceuticals, cosmetics and food industry. Bacteria are the main group of microorganisms that produce biosurfactants, but are also produced by filamentous fungi and yeasts. One of the major advantages of the use of yeasts in the production of biosurfactants is that most have the status GRAS (generally recognized as safe), which allows the application of their products in the pharmaceutical and food industry. The objective of this work was to evaluate the biotechnological potential of a glycolipid produced by yeast *Wickerhamomyces anomalus* (CCMA 0358) using different substrates, such as olive oil, used soybean oil and palm oil. The antibacterial and antiadhesive activity of the crude biosurfactant were determined using the microdilution method in plaques against the bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* evaluated at different concentrations. The antifungal activity was performed against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cercospora sorghi*, *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium verticillioides* and *Fusarium solani*. The results showed that the yeast *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 is able to produce biosurfactant in different substrates, which was able to inhibit the growth and adhesion of all evaluated bacteria, demonstrating antibacterial capacity of up to 100% and antiadhesive, reaching 31% of inhibition. In addition, it inhibited the growth of all phytopathogenic fungi and food contaminants used by up to 95% over the control. In addition to showing promising antimicrobial results against bacteria and fungi contaminating food and phytopathogenic fungi, the yeast *W. anomalus* is able to produce the biosurfactant from an inexpensive substrate, such as soybean oil used, which allows a greater possibility of applications due to its low cost.

Key words: Biosurfactant, biotechnological potential, antimicrobial activity, antiadhesive, antifungal.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura dos glicolipídeos	17
Figura 2 - Estrutura da principal isoforma da surfactina	18
Figura 3 - Growth inhibitory percentages against <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 8702) obtained with crude biosurfactant isolated from <i>W. anomalus</i> CCMA 0358 on different substrates at different concentrations	47
Figura 4 - Growth inhibitory percentages against <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579) obtained with crude biosurfactant isolated from <i>W. anomalus</i> CCMA 0358 on different substrates at different concentrations	48
Figura 5 - Growth inhibitory percentages against <i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 564) obtained with crude biosurfactant isolated from <i>W. anomalus</i> CCMA 0358 on different substrates at different concentrations.	48
Figura 6 - Growth inhibitory percentages against <i>Escherichia coli</i> (EPEC 055) obtained with crude biosurfactant isolated from <i>W. anomalus</i> CCMA 0358 on different substrates at different concentrations	49
Figura 7 - Reduction of mycelial growth in relation to the control.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Number of cells/mL in three different substrates for the production of biosurfactant (0h and 12h of fermentation).....	46
Tabela 2 – Statistical difference between the substrates and the concentrations used for the <i>B.cereus</i> , <i>S. entriritidis</i> , <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i> bacteria, in which the averages and concentrations of the substrates are in percentage.....	51
Tabela 3 – Growth inhibitory percentages against <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 8702) obtained with crude biosurfactant isolated from <i>W. anomalus</i> CCMA 0358 on different substrates at different concentrations	54
Tabela 4 – Statistical difference between the substrates and the concentrations used for the <i>A. flavus</i> , <i>F. verticioides</i> and <i>C. sorghi</i> fungi, in which the averages and concentrations of the substrates are in percentage	55

Sumário

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Biossurfactantes	12
2.1.1 Classificação dos biossurfactantes	15
2.1.2 Aplicações biotecnológicas dos biossurfactantes	18
2.1.4 Microrganismos Produtores de Biossurfactantes	21
2.1.5 Aplicações industriais	24
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

Capítulo 2

Abstract	41
1. INTRODUCTION	42
2 MATERIAL AND METHODS	43
2.1 Culture conditions	43
2.2 Biosurfactant production	43
2.3 Recovery of Biosurfactant	44
2.4 Antibacterial activity	44
2.5 Antiadhesive Activity	45
2.6 Antifungal activity	46
2.7 Statistical Analyzes	47
3 RESULTS AND DISCUSSION	47
3.1 Biosurfactant production	47
3.2 Antibacterial activity	47
3.3 Antiadhesive Activity	50
3.3 Antifungal activity	54
4 CONCLUSION	59
REFERÊNCIAS	60

CAPÍTULO 1 REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas de natureza anfifílica com frações hidrofílicas e hidrofóbicas que atuam na interface entre fases com diferentes polaridades e ligações de hidrogênio. Os biossurfactantes são metabólitos secundários produzidos em fase estacionária de crescimento microbiano. Os microrganismos produtores de biossurfactante habitam a água, solo e, também podem habitar ambientes extremos tais como, locais hipersalinos e reservatórios de óleo. Os microrganismos produzem biossurfactantes para solubilizar substratos hidrofóbicos presentes no seu ambiente, mas poucos microrganismos produzem biossurfactantes em substratos solúveis em água. A presença de biossurfactantes na superfície da célula microbiana aumenta sua hidrofobicidade e ajuda a sobreviver no ambiente hidrofóbico.

O principal grupo de microrganismos produtores de biossurfactantes são as bactérias, também podem ser produzidos por espécies de fungos filamentosos e leveduras. Uma das grandes vantagens do uso de leveduras na produção de biossurfactantes é reconhecida, pois se refere à a maior parte dessas espécies como GRAS (*generally recognized as safe*), o que permite a aplicação de seus produtos na indústria farmacêutica e de alimentos.

Há um interesse crescente em biossurfactantes, especialmente os produzidos por microrganismos por muitas razões, entre elas: são considerados compatíveis com o ambiente, uma vez que possuem baixa toxicidade e são biodegradáveis; possuem propriedades estruturais únicas, importantes para a suas aplicações industriais, que vão desde a biotecnologia até a limpeza do ambiente, têm maior capacidade espumante, alta seletividade e atividade específica em condições ambientais extremas de temperatura, pH, salinidade e capacidade de ser sintetizado a partir de matérias-primas renováveis.

A capacidade de aplicação de compostos de superfície ativa, produzidos a partir de microrganismos, é fundamentada em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Além disso, os biossurfactantes têm sido explorados na recuperação de áreas contaminadas com petróleo, na inibição de bactérias

e fungos e, também quanto a propriedades antiadesivas. Essas propriedades são aplicadas em campos diversos da agricultura, construção, indústrias de alimentos, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêuticas, cosméticos e em biorremediação de poluentes. Possuem também grande aceitabilidade ecológica e capacidade de ser produzido a partir de substratos renováveis e mais baratos.

Diferentes grupos de biossurfactantes exibem propriedades diversas e uma variedade de funções fisiológicas em diferentes microrganismos produtores. Os biossurfactantes tornaram-se um ponto de interesse não só devido à sua produção baseada em recursos renováveis, mas também devido à grande variedade de moléculas de superfície ativa produzidas e aplicações especiais que delas surgem.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de biossurfactante produzido pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 em diferentes meios de cultivo, utilizando como substrato azeite de oliva, óleo de soja usado e azeite de dendê, avaliando suas propriedades antibacterianas, antiadesivas e antifúngicas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos anfifílicos produzidos por microrganismos, tanto em sua superfície celular quanto secretada extracelularmente (SAMBANTHAMOORTHY, et. al., 2014). Estes compostos microbianos compreendem uma variedade de estruturas químicas, tais como glicolipídios, fosfolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos e lipídios neutros (AHIMOU, et. al., 2001). Duas classes de biossurfactantes são atualmente consideradas de relevância industrial e econômica: glicolipídios e lipopeptídios, ambos tensoativos de baixo peso molecular (HENKEL, et. al., 2012).

As moléculas de surfactante se agregam para formar micelas. As micelas podem ser definidas como partículas coloidais onde as "caudas" hidrofóbicas do surfactante estão posicionadas dentro da micela e as "cabeças" hidrofóbicas voltadas para a fase aquosa (PACWA-PLOCINICZAK et. al., 2011). A formação de micelas permite que o biossurfactante reduza a tensão superficial e interfacial, o que aumenta a solubilidade e a disponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos (VARJANI & UPASANI, 2016). Os biossurfactantes se acumulam na interface entre dois fluidos imiscíveis ou entre um fluido e um sólido. Ao reduzir a tensão superficial (líquido - ar) e a tensão interfacial (líquido -

líquido), reduzem as forças repulsivas entre duas fases diferentes e permitem que estas duas fases se misturem e interajam mais facilmente (VARJANI et al., 2014).

As vantagens dos biossurfactantes sobre os surfactantes químicos são a maior ação específica, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, aplicabilidade generalizada, bom desempenho em temperaturas extremas, pH e salinidade e, além disso, suas estruturas únicas que podem mostrar novas propriedades e aplicações futuras (DÍAZ DE RIENZO, et al. 2015). Diferentes tipos de biossurfactantes têm propriedades diferentes e mostram uma variedade de funções fisiológicas dependendo dos microrganismos que os produzem. Sendo relevante entre todos esses atributos é a solubilização de compostos hidrofóbicos, ligação de metais pesados, fatores de virulência, sinalização celular (*quórum sensing*) e formação de biofilmes (DE RIENZO et al.2015).

Os biossurfactantes têm diferentes papéis naturais no crescimento dos organismos nos quais são produzidos, como aumentarem a área superficial e a disponibilidade de substratos hidrofóbicos insolúveis em água, a ligação de metais pesados, a patogênese bacteriana, a detecção de quórum e a formação de biofilmes (SINGH & CAMEOTRA, 2004). Com várias vantagens, tais como baixa toxicidade, biodegradabilidade e eficácia em diferentes faixas de condições físicas, os biossurfactantes estão sendo usados para diversas aplicações nas indústrias farmacêutica, biomédica e de processamento de alimentos (SHARMA, et. al., 2014).

Além disso, os biossurfactantes também influenciam a hidrofobicidade da superfície das células bacterianas causando alterações estruturais na superfície das células bacterianas (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). A atividade superficial torna os agentes tensoativos excelentes agentes emulsionantes, espumantes e dispersantes (HOSKOVA et al., 2013).

Um problema importante na produção de biossurfactantes é o custo envolvido no processo. A fonte de carbono é responsável por parte considerável dos custos de produção de biossurfactantes (LI et al., 2016). No entanto, isso pode ser significativamente reduzido usando fontes alternativas de nutrientes, que são facilmente disponíveis e de baixo custo. O uso de resíduos industriais como fonte de energia para a produção de biossurfactantes é uma alternativa atrativa para diminuir os custos de produção, tornando o processo viável (AL-BAHRY et al., 2013). Os resíduos agroindustriais com alto conteúdo de carboidratos, lipídios e proteínas são atraentes para serem usados como substrato, eles geralmente têm os nutrientes necessários para sua produção (NITSCHKE & PASTORE, 2006). Resíduos como o glicerol (SOUZA, VESSONI-PRNNA & OLIVEIRA, 2014), lodo de petróleo (IBRAHIM et al., 2013), bagaço de cana-de-açúcar (RAKESHKUMAR et al., 2013) e lixo (AGUIAR,

LIMBERGER & SILVEIRA, 2014) podem ser utilizadas como fonte de carbono no processo fermentativo.

Atualmente, muitas indústrias estão cada vez mais direcionadas para biotecnologia e bioeconomia circular. O interesse mundial em biossurfactantes (considerados produtos de "tecnologia verde") cresceu significativamente nos últimos anos devido às suas propriedades mais favoráveis ao meio ambiente em comparação com os surfactantes químicos (PARASZKIEWICZ, 2016). Espera-se que a produção mundial de biossurfactantes atinja 476,512,2 toneladas em 2018, com o mercado global de surfactantes no valor de mais de US \$ 41 bilhões (KAPADIA & YAGNIK, 2013, DHANARAJAN & SEN, 2014).

A produção comercial de biossurfactante é discutida frequentemente na literatura, debatendo a grande diferença nos insumos monetários versus ganhos financeiros reais. O desenvolvimento de processos mais baratos de produção de biossurfactantes e o uso de matérias-primas de baixo custo são fatores importantes que representam 10% do custo total (KOSARIC & VARDAR-SUKAN, 2015). Os resíduos agroindustriais são considerados como um substrato promissor para a síntese microbiana de biossurfactantes e podem resolver vários problemas de gerenciamento de resíduos industriais (MAKKAR, CAMEOTRA & BANAT, 2011).

Consequentemente, a pesquisa se concentrou no uso de vários recursos naturais renováveis efetivos para superar os obstáculos financeiros na indústria de produção de biossurfactantes. Atualmente, substratos como palha de trigo, palha de arroz, mandioca, farinha de mandioca, melão de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar, melão de beterraba, farelo e milho estão sendo testados para a produção de biossurfactantes a nível comercial (BANAT et al., 2014; MNIF, ELLOUZE-CHAABOUNI & GHRIBI. 2013).

Satpute, Plaza e Banpurkar (2017), discutem uma maneira inovadora e eficiente de usar resíduos agroindustriais, lácteos e de processamento de alimentos para a produção de biossurfactantes. Sendo muito importante reciclar e reutilizar substratos renováveis como ingredientes para recuperar produtos de escala industrial (KOSARIC & VARDAR-SUKAN, 2015). Ao mesmo tempo, é importante escolher substratos de alta qualidade em termos de valor nutricional que possa permitir o crescimento de microrganismos desejados, juntamente com a produção abundante de agentes ativos de superfície microbiana. Portanto, estudar as relações entre os rendimentos e as estruturas moleculares dos biossurfactantes sintetizados e o tipo de resíduos, subprodutos utilizados como componentes de meios de crescimento é considerado importante para o desenvolvimento de tecnologias rentáveis que permitam a

produção de novos produtos bioquímicos com diferentes propriedades e seu potencial uso em aplicações industriais (PARASZKIEWICZ, 2018).

Os biossurfactantes são caracterizados por altos custos de produção em comparação com os surfactantes sintéticos (RUFINO, et al. 2014). Por isso, a escolha de matérias-primas baratas é importante para a economia global do processo, porque muitas vezes, a quantidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção (MUKHERJEE, DAS & SEN, 2006). Existem poucos relatórios sobre a produção de biossurfactantes utilizando matérias-primas baratas como substratos (TAZDAIT, et al. 2018).

Trabalhos mostraram que, entre todos os substratos de carbono examinados (manose, sacarose, óleo de milho, óleo de canola, sorbitol, etc.), os óleos vegetais foram os mais eficazes na produção de biossurfactantes. (FERHAT, et al. 2011; SILVA, et al. 2014; EL-SHESHTAWY, 2015; VARJANI, 2017; GUDIÑA et al. 2016). A natureza da fonte de carbono é essencial para alcançar uma produção significativa de biossurfactante (ABBASI, et al. 2012). A ligação biossintética entre fontes de carbono convencionais, como glicose ou frutose e biossurfactante de tipo glicolípido, está bem estabelecida. No entanto, as vias metabólicas exatas da biossíntese de biossurfactante usando fontes de carbono complexas mais eficientes, como óleos vegetais, ainda não são elucidadas (ABDEL, et al. 2011).

2.1.1 Classificação dos biossurfactantes

2.1.1.1 Glicolipídeos

Os glicolipídios consistem em açúcar e lipídios em que a porção de hidrato de carbono está ligada a uma porção de ácido graxo (ácidos alifáticos ou ácidos hidroxilalifáticos) (ZHAO et al., 2016). Normalmente, os glicolipídios são conhecidos por sua boa estabilidade em condições extremas de pH, salinidade e temperatura (MNIF & GHRIBI, 2016).

Os biossurfactantes glicolipídicos mais conhecidos são ramnolipídios, soforolipídios, trealolipídios (Figura 1). Os ramnolipídios são formados por uma ou duas moléculas de ramnose (hidrofílicas) ligadas a um ou dois ácidos graxos (hidrofóbicos), que são cadeias alquila saturadas ou insaturadas (LOTFABAD et al., 2010). O comprimento da cadeia de ácidos graxos varia de oito a quatorze moléculas de carbono (VARJANI & UPASANI, 2016). Os soforolipídios consistem em uma molécula de soforose dimérica ligada a um ácido graxo hidroxilado de cadeia longa (DESAI & BANAT, 1997). Os trealolipídios consistem em uma molécula do dissacarídeo trealose ligado a dois ácidos graxos ramificados (BANAT et al., 2010).

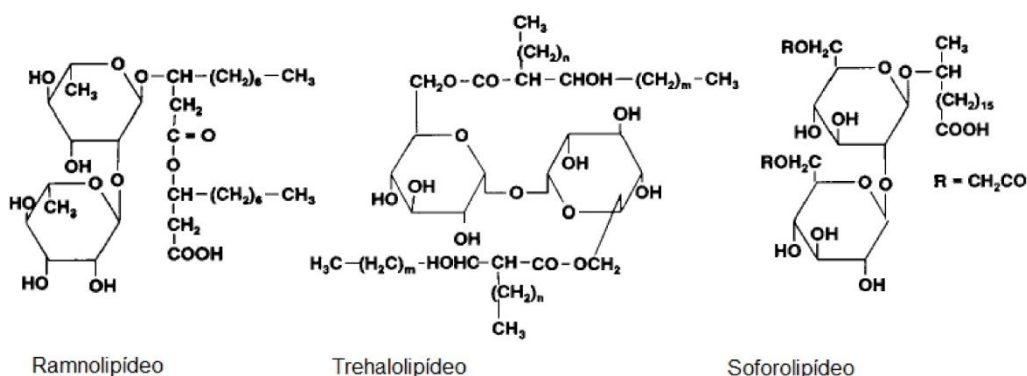
Biossurfactantes da classe rhamnolipídios, proveniente da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* SB30 foram aplicados para a remoção de óleo de cascalhos no derrame do navio “Exxon Valdez”, no Alaska. Os resultados demonstraram que o bioemulsificante é de duas a três vezes mais eficaz na remoção do óleo do que a água. Além da melhoria na remoção, o bioemulsificante não apresentou toxicidade e apresentou maior biodegradabilidade (HARVEY et. al., 1990).

A retirada de metais, pode ser executada pela ação de biossurfactantes. Os rhamnolipídios e os soforolipídios são eficientes na remoção de cobre e zinco de solos contaminados com hidrocarbonetos, em razão ao caráter aniônico desses surfactantes (MULLIGAN, YOUNG & GIBBS, 2001). Os biossurfactantes também podem ser utilizados no processo de biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos com quatro ou mais anéis aromáticos, uma vez que a maior dificuldade na técnica de biodegradação desses compostos está em sua alta hidrofobicidade, baixa solubilidade em água e grande capacidade de adsorção em solos (BANAT, MAKKAR & CAMEOTRA, 2000).

Nos últimos anos, o interesse nas propriedades dos rhamnolípideos produzidos por *P. aeruginosa* levou-os a se tornar um alvo para a produção em escala comercial. O uso de rhamnolípideos é considerado seguro em uma variedade de diferentes aplicações industriais. As aplicações destes foram estudadas principalmente nos campos de biorremediação (BANAT et al., 2010) e remoção de metais (DÍAZ DE RIENZO et al. 2015), mas as informações sobre seu uso como agentes antimicrobianos e como disruptores do biofilme ainda são bastante esboçados (IN et al., 2013).

Biossurfactantes, como os soforolípideos, também são relatados por possuir habilidades de interrupção do biofilme (DÍAZ DE RIENZO et al., 2015). Independente do seu potencial, existem poucos estudos sobre biossurfactantes e sua interação com células bacterianas (RIVARDO et al., 2009). Estudos anteriores também demonstraram que os rhamnolípideos podem perturbar os biofilmes formados por *B. pumilus* (DUSANE et al., 2010) e a surfactina produzida por *B. subtilis* também demonstrou inibir a formação de biofilmes por *Salmonella enterica*, *E. coli* e *Proteus mirabilis* (MIRELES, TOGUCHI & HARSHEY, 2001).

Figura 1 – Estrutura dos glicolipídeos



Fonte: DESAI & BANAT, 1997.

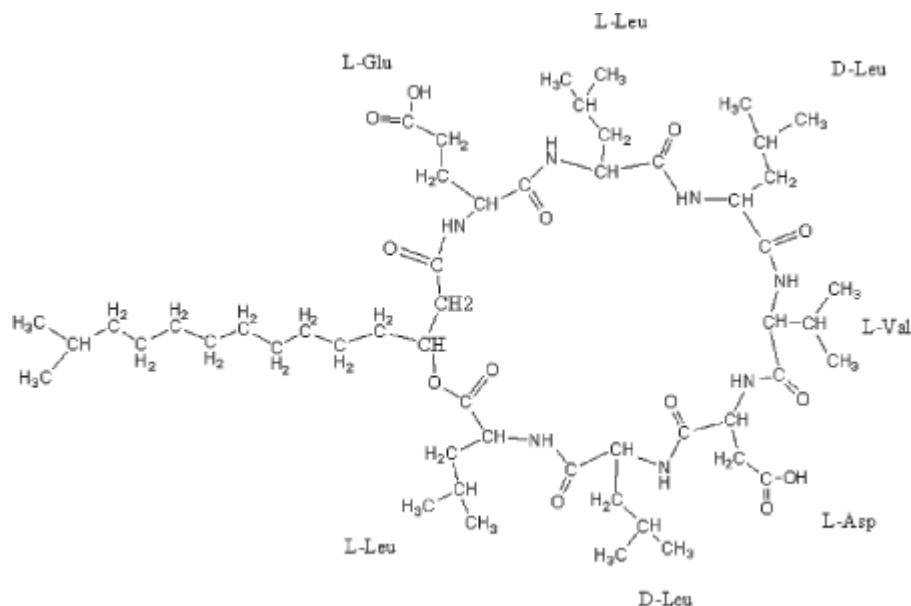
2.1.1.2 Fosfolipídios, lipídeos neutros e ácidos graxos

Os fosfolipídios, os lipídios neutros e alguns ácidos graxos são componentes das estruturas celulares e têm atividade superficial (SATPUTE et al., 2010). Alguns exemplos deste tipo de biossurfactantes são a gramicidina e a polimixina (DESAI & BANAT, 1997). São biopolímeros constituídos por um esqueleto de polissacarídico ao qual as cadeias laterais de ácidos graxos estão ligadas covalentemente (SATPUTE et al., 2010). Fungos, leveduras e bactérias possuem a capacidade de crescer em substratos hidrofóbicos como alcanos, e secretar grandes quantidades de fosfolipídios, ácidos graxos ou lipídeos neutros para facilitar a absorção da fonte de carbono (SHEKHAR, SUNDARAMANICKAM & BALASUBRAMANIAM, 2015).

2.1.1.3 Lipopeptídios

Os lipopeptídeos são compostos por uma cadeia de aminoácidos (peptídeo) ligada a ácidos graxos. O peptídeo é linear ou cíclico. O comprimento e a estrutura dos ácidos graxos também podem ser diferentes. Geralmente, o ácido graxo consiste entre 13 e 16 átomos de carbono e pode ser ramificado (KIM et al., 1997). No caso dos lipopeptídios, a surfactina (Figura 2) é o mais bem estudado. Geralmente os lipopeptídios são produzidos por microrganismos aeróbicos como: bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos. Os surfactantes lipopeptídeos são produzidos naturalmente como mistura de várias macromoléculas pertencentes à mesma família ou classe (INÈS & DHOUHA, 2015).

Figura 2 – Estrutura da principal isoforma da surfactina



Fonte: BARROS, et al 2007.

2.1.2 Aplicações biotecnológicas dos biossurfactantes

2.1.2.1 Atividade Antimicrobiana

Vários biossurfactantes exibem atividades antibacterianas, antifúngicas e antiadesivas, que as tornam moléculas relevantes para aplicações no combate a muitas doenças e infecções. Biossurfactantes com atividade antimicrobiana conhecida incluem surfactina e iturina produzidas por estirpes de *Bacillus subtilis* (AHIMOU et al., 2001), lipídeo manosileritritol (MEL) de *Candida antarctica* (ARUTCHEL et al., 2008), ramípolídeos de *Pseudomonas aeruginosa* (BENINCASA et al., 2004) e biossurfactantes isolados de *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* (RODRIGUES et al., 2006).

2.1.2.1.1 Atividade antibacteriana

Devido atividade superficial dos biossurfactantes e sua potência permeabilizadora da membrana, estudos anteriores demonstraram a atividade antibacteriana dos ramípolídeos. Benincasa et al., 2004 relataram um bom comportamento antibacteriano de ramípolídeos contra diversas bactérias, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus fecal* e *Pseudomonas aeruginosa*. As surfactinas também isoladas de *Bacillus circulans* foram ativas contra bactérias resistentes a múltiplos fármacos tais como *Alcaligenes*

faecalis, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (DAS, MUKHEJEE & SEN, 2008).

Os lipídios de manosileritritol produzidos por estirpes de *C. antarctica* também têm sido descritos exibindo ação antimicrobiana contra bactérias Gram positivas (KIM, et al., 2002). Além disso, um novo biossurfactante xilolipídico derivado de *Lactococcus lactis* mostrou ampla gama de atividade antibacteriana contra *E. coli* patogênica e *Staphylococcus aureus* (SARAVANAKUMARI & MANI, 2010).

2.1.2.1.2 Antiadesivos

Outra aplicação dos biossurfactantes é a sua utilização como agentes antiadesivos contra agentes patogênicos. A adsorção de biossurfactantes a uma superfície de substrato modifica sua hidrofobicidade, interferindo nos processos de adesão e dessorção microbiana (RODRIGUES et al., 2006). A adsorção prévia de biossurfactantes pode ser utilizada como uma estratégia preventiva para retardar o aparecimento do crescimento de biofilme patogênico em cateteres e outros materiais médicos de inserção, reduzindo o uso de drogas sintéticas e produtos químicos (FALAGAS & MAKRIS, 2009).

Biossurfactantes inibem a adesão bacteriana através do biocondicionamento de superfícies ou interagindo com células bacterianas e modificando as suas propriedades (MONTEIRO et al., 2011). O envolvimento de biossurfactantes na adesão e na dessorção microbianas tem sido amplamente descrito e a adsorção de biossurfactantes em superfícies sólidas pode ser uma estratégia eficaz para reduzir a adesão microbiana e prevenir a colonização por microrganismos indesejáveis (BANNAT et al., 2014).

Os microrganismos nos biofilmes são caracterizados por diferenciação fisiológica e genética. A expressão de genes variados e diferentes caminhos de degradação metabólica exibidos por bactérias em biofilmes permitem a biodegradação, transformação, imobilização ou desintoxicação uma variedade de poluentes, por exemplo, antibióticos, metais pesados, petróleo ou pesticidas (EDWARDS & KJELLERUP, 2013). Além disso, a matriz de biofilme, particularmente os compostos de EPS (substâncias extracelulares), protege contra condições ambientais severas, agentes antimicrobianos, forças de cisalhamento, acidificação, predação ou dano UV (SINGH, et al. 2008). Simultaneamente, os microrganismos nos biofilmes têm acesso limitado ao oxigênio e aos nutrientes principalmente devido à limitação da transferência de massa, o que resulta na formação de microambientes alterados dentro da matriz do biofilme (JALOWIECKI, et al. 2018).

Os biofilmes são a fonte de infecções persistentes de muitos microrganismos patogênicos. Eles são responsáveis por cáries dentárias e infecções nosocomiais, bem como por uma variedade de outras infecções e doenças. No plano industrial, os biofilmes também são prejudiciais em muitos casos, por exemplo: os biofilmes naturais podem reduzir a transferência de calor em trocas de calor e torres de resfriamento, decompor as membranas de osmose reversa, corroer as superfícies metálicas e contaminar equipamentos de processamento de alimentos (SATPUTEVA, et al. 2010).

As propriedades de dispersão dos biossurfactantes demonstraram que competem com os agentes inibidores convencionais contra biofilmes bacterianos. Isso os torna candidatos adequados para uso em novas gerações de agentes de dispersão microbiana e para uso como adjuvantes para a supressão microbiana existente ou estratégias de erradicação (BANAT, et al. 2014). Novos *insights* sobre a fisiologia do biofilme agora permitiram aos pesquisadores projetar estratégias de inibição / dispersão bacteriana mais eficazes. Existem duas principais estratégias inibitórias, uma com base na formulação de novos compostos de antibiofilmes e outra na construção de superfícies resistentes ao biofilme (VILLA, 2013). Alguns dos candidatos mais promissores para a inibição de biofilmes bacterianos provêm de agentes biológicos ativos de superfície (biossurfactantes), uma vez que são caracterizados por fortes propriedades antiadesivas, antimicrobianas e biodegradáveis (MULLIGAN, et al. 2014).

2.1.2.1.3 Antifúngicos

As perdas de alimentos são uma grande preocupação em todo o mundo, aproximadamente um terço de todos os alimentos produzidos para o consumo humano é perdido ou desperdiçado (GUSTAVSSON et al. 2011). A razão para esta enorme perda global de alimentos é diversa, mas a deterioração microbiana, que afeta a qualidade organoléptica dos produtos (aspecto, textura, sabor e aroma), desempenha um papel relevante. Entre os microrganismos deteriorantes, os fungos são a principal preocupação em qualquer fase da cadeia alimentar devido à sua capacidade de crescer em diferentes ambientes e até mesmo em ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes (SANZANI et al., 2017).

Além do seu impacto negativo na qualidade dos alimentos, alguns gêneros de fungos, tais como, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium* têm a capacidade de produzir metabólitos secundários, denominados micotoxinas, que podem ter um efeito tóxico em humanos e animais. Além disso, essas micotoxinas são capazes de suportar várias etapas de processamento de alimentos, portanto, o controle dos fungos é fundamental para assegurar um alimento seguro (SANZANI et al., 2017). As espécies fúngicas são os principais agentes

causadores de doenças de plantas que resultam na redução drástica do rendimento das culturas, levando a perdas econômicas para os agricultores (GORDILLO & MALDONADO, 2012). Está bem documentado também que os lipopeptídeos, o grupo predominante de compostos biossurfactantes, estão entre os metabólitos mais poderosos no combate e tratamento da infecção por doenças fúngicas *in vitro* e *in vivo* (CAO et al. 2012).

Como consequência da recente procura de gestão ecológica de doenças, produtos que possuem atividade antifúngica têm recebido grande atenção em todos ramos da indústria (MNIF, et. al., 2016). Os glicolipídeos permitem ainda a preservação de plantas e previnem invasão de pragas (MNIF & GHRIBI, 2016). A atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos tem sido demonstrada para glicolipídios, como celobiose lipídeos e ramnolipídeos e lipopeptídeos cíclicos, incluindo surfactina, iturina e fengicina (KULAKOVSKAYA, et. al., 2010; GROVER, et. al., 2010).

Agentes tensoativos parecem ser uma solução viável para os problemas ambientais causados por pesticidas sintéticos, e vários pesquisadores tentaram identificar os surfactantes eficazes para substituir esses pesticidas (BASSYOUNI et al., 2012). A atividade antimicrobiana do composto surfactante contra fungos foi avaliada nos trabalhos anteriores. Os surfactantes absorvem facilmente em interfaces líquido – sólido, cobrem as superfícies e as protegem contra a aderência de microrganismos (NEGM & TAWFIK, 2012; ZAKI & TAWFIK, 2014).

2.1.4 Microrganismos Produtores de Biossurfactantes

2.1.4.1 Bactérias

Bactérias são o principal grupo de microrganismos produtores de biossurfactantes, esses microrganismos são capazes de sintetiza-los a partir de hidrocarbonetos, como glicose, sacarose, glicerol ou etanol e podem tanto serem excretados ou permanecerem intracelularmente (DESAI & BANAT, 1997). As bactérias desempenham papel importante na produção de biossurfactante, sendo *Pseudomonas* o gênero predominante (SHEKHAR, SUNDARAMANICKAM & BALASUBRAMANIAM, 2015).

Espécies de *Lactobacillus* sintetizam menor quantidade de biossurfactantes quando comparado a *Pseudomonas aeruginosa*, mas fazem parte de uma fonte segura de biossurfactantes porque são considerados microrganismos seguros e, já são utilizados na fabricação de alguns alimentos (GUDIÑA, TEIXEIRA & RODRIGUES, 2011).

Bacillus subtilis é um produtor de uma variedade de biossurfactantes cíclicos, dos quais os mais bem caracterizados são compostos de surfactina, iturina e fengicina. Os biossurfactantes cíclicos de *Bacillus* apresentam propriedades fisiológicas, biocidas, físicoquímicas e superficativas interessantes (DIAZ DE RIENZO et al., 2015). As surfactinas são utilizadas principalmente como agentes emulsionantes e espumantes em tecnologias de remediação e os derivados de iturina apresentam uma forte atividade antimicrobiana in vitro e in vivo contra fungos pertencentes a várias famílias (PARASZKIEWICZ, et al. 2018).

2.1.4.2 Leveduras

A avaliação da produção de biossurfactantes por leveduras tem aumentado nos últimos anos, e várias cepas têm sido relatadas como produtores de biossurfactantes promissores, devido aos seus altos rendimentos de produção e suas elevadas taxas de conversão de substrato. Entre eles destacam-se espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Starmerella*, *Pseudozyma* ou *Yarrowia* (FARIA, et. al., 2015 & ELSHAFIE, 2015).

A grande vantagem do uso de leveduras na produção de biossurfactantes é que a maior parte dessas espécies é reconhecida como GRAS (*generally recognized as safe*), como por exemplo, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, o que permite a aplicação de seus produtos na indústria farmacêutica e de alimentos (FONTES, AMARAL & COELHO, 2008).

Um exemplo de biossurfactante produzido por leveduras é o lipídeo manosileritritol (MEL), um glicolipídeo que apresenta excelente propriedade interfacial e exibe alta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Este glicolipídeo é utilizado em indústria de cosméticos, sendo utilizado em hidratantes de pele seca e em produtos para reparação de danos nos cabelos (MORITA, et al., 2013). Os lipídios MEL são produzidos abundantemente a partir de óleos vegetais e sacarídeos por leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e estão entre os biossurfactantes mais promissores conhecidos (KITAMOTO, et al., 2009). As espécies mais comuns de produção de MEL no gênero *Pseudozyma* são *Pseudozyma antarctica*, *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa* e *Pseudozyma parantarctica* (MORITA, et al., 2013).

Quase todos os óleos vegetais foram encontrados como uma boa fonte de carbono para a produção de MELs por várias *Pseudozyma* sp. Óleo de soja, azeite e óleo de cártamo são as melhores fontes de carbono para a bioprodução. *P. rugulosa* e *P. parantarctica* produziram a maior quantidade de MEL com óleo de soja em comparação com outros óleos vegetais (KONISHI, et al., 2007).

2.1.4.2.1 *Wickerhamomyces anomalus*

Wickerhamomyces anomalus (*W. anomalus*) é frequentemente encontrado como um colonizador ambiental que pode ser isolado de substâncias orgânicas, incluindo vegetais, frutas e solo (KAMOSHITA, et al., 2015). *W. anomalus* CCMA 0358 foi identificado como produtor de biosurfactantes e produziu um tipo de biosurfactante de glicolídeos usando um meio de cultura contendo extrato de levedura, sulfato de amônio, glicose e azeite. *W. anomalus* CCMA 0358 reduziu a tensão superficial para valores em torno de 36 mN / m após 24 h. (SOUZA, et al. 2017).

O biosurfactante produzido por *W. anomalus* CCMA 0358 exibiu excelentes propriedades de superfície ativa, como demonstrado pelos baixos valores de tensão superficial alcançados. Além disso, se manteve estável a alta temperatura (121 ° C), salinidade elevada (NaCl 300 g / L) e valores de pH entre 6 e 12. O biosurfactante em estado bruto permitiu a recuperação de 20% de óleo bruto de areia contaminada. A excelente capacidade de redução da tensão superficial exibida por este biosurfactante, juntamente com a sua estabilidade em condições ambientais extremas e sua capacidade de recuperar petróleo bruto de areia contaminada tornam-se um candidato promissor para aplicação em biorremediação ou na indústria do petróleo, como alternativa para os surfactantes químicos tradicionais (SOUZA, et al. 2018).

2.1.4.3 Fungos Filamentosos

Trabalhos mostraram a produção de biosurfactantes também por fungos. Fungos marinhos foram isolados de esponjas do mar, com resultados promissores de todos os isolados de *Aspergillus ustus* para a produção de biosurfactantes (KIRAN, et al., 2009). Os fungos marinhos vivem em um ambiente estressante, sem luz, de alta pressão ou outros tipos de estresse mecânicos. Sua capacidade de sobreviver em diferentes condições ambientais torna-os atraentes para isolar novas moléculas, como exemplo biosurfactantes. Foram isolados compostos com propriedades tensoativas pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* (NICOLETTI & TRINCONE, 2016).

2.1.5 Aplicações industriais

2.1.5.1 Indústria petroquímica

A presença de parafina em petróleo bruto resulta em aumentos no ponto de solidificação e viscosidade do óleo, o que influencia a capacidade de transporte e a segurança operacional das tubulações, dificultando assim a extração de petróleo (SAKTHIPRIYA, DOBLE & SANGWAI, 2015). Os métodos convencionais mecânicos, térmicos e químicos para limpar a parafina depositada da superfície das tubulações têm as desvantagens da alta dificuldade de operação, danos potenciais à formação (ETOUMI, 2007) e o uso de produtos químicos dispendiosos e perigosos. Nas últimas décadas, os métodos microbianos se mostraram eficazes na mitigação e prevenção da deposição de parafina e são considerados uma alternativa para métodos convencionais (ZHANG, et al., 2012).

A remoção de parafina microbiana é uma técnica que usa microrganismos ou seus subprodutos metabólicos (por exemplo, biossurfactantes e solventes de parafina) para o controle e remoção de deposição de parafina de poços de petróleo e instalações de produção. Este método é econômico e ecológico (LAZAR, et al., 1999). Alguns pesquisadores, como Rana et al (2010) e Zhang et al (2012), relataram que o uso de microrganismos e seus produtos metabólicos podem mitigar a deposição de parafina em poços de petróleo e linhas de fluxo superficial. As principais áreas de aplicação incluem os Estados Unidos, Venezuela, Indonésia e China. Nos campos de petróleo Daqing, Jiangnan, Liaohe, Zhongyuan e Jidong na China, o tratamento microbiano resultou em incrementos óbvios na produção de petróleo e é considerado uma abordagem rentável (ZHANG, et al., 2014).

Os mecanismos pelos quais as bactérias são capazes de mitigar e remover a deposição de parafina foram descritos por Hao et al (1990): (a) a degradação microbiana de n-alcenos de cadeia longa parafina é convertida em n-alcenos de cadeia curta, o que melhora a solubilidade do óleo parafínico; (b) alteração das propriedades físicas da parafina por produtos microbianos, incluindo ácidos graxos, álcoois, emulsionantes e biossurfactantes; e (c) formação de biofilmes pela adsorção de microrganismos na superfície da parafina, o que impede a cristalização e deposição de parafina. O tratamento microbiano para o controle de depósitos de parafina deve basear-se em produtos bacterianos que são o óleo parafínico, não-patogênico, de ocorrência natural, e os subprodutos dos quais são álcoois, gases, ácidos, emulsionantes e biossurfactantes, que causam mudanças marcantes na propriedades físico-químicas do óleo parafínico e a área do poço-furo (ETOUMI, 2007).

2.1.5.2 Agricultura

O potencial de biossurfactantes para o controle de doenças em plantas tem sido amplamente relatado nos últimos anos (BORAH et al., 2015, LAHKAR et al., 2015). Entre todos os tipos de biossurfactantes relatados até a data, a maioria das pesquisas foram realizadas sobre surfactina produzida por *Bacillus* sp. e rhamnolípido produzidos por *Pseudomonas* sp. (PERFUMO et al., 2006). Os Rhamnolípido são eficazes no controle de fungos patogênicos e foi estabelecido preliminarmente por Stanghellini e Miller (1997), onde a estirpe produtora de rhamnolípido de *P. aeruginosa* pode levar ao efeito lítico de esporos de patógenos de plantas zoosporicas. Foi mencionado que o rhamnolípido em contato com os zoósporos leva à cessação da motilidade, seguido de ruptura da membrana plasmática e lise de todo o esporo.

2.1.5.3 Biorremediação

A biorremediação é um processo pelo qual agentes biológicos como bactérias, fungos ou plantas são usados para remover ou neutralizar contaminantes no solo ou na água. A biorremediação tipicamente envolve aumento de solo ou outros meios, contaminados com poluentes atuam como nutrientes para microrganismos, para melhorar o processo de biodegradação dos contaminantes. A taxa de biodegradação do contaminante no solo depende da sua biodisponibilidade para os organismos metabolizadores, que é influenciada por fatores como dessorção, difusão e dissolução (KARDENA, HELMY & FUNAMIZU, 2014). A adição de biossurfactantes como agentes de redução da tensão superficial tornou-se um método promissor para melhorar a eficácia da biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos (BANAT, 2000).

A maioria dos contaminantes persistentes apresenta baixa solubilidade em água e, portanto, a adição de emulsionante pode aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes para os microrganismos metabolizadores. Ao reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, os biossurfactantes podem dispersar-se facilmente como emulsões para que o processo de ingestão de contaminantes como nutriente para microrganismos possa ser melhorado (BANAT, DIAZ DE RIENZO & QUINN, 2014).

Normalmente o tempo de degradação e o tempo de adaptação para os microrganismos, em particular, foram encurtados pelo uso de biossurfactantes. Muitos locais contaminados no Oriente Médio foram remediados pela adição de biossurfactante ao ambiente contaminado além de outros nutrientes. Estes locais representavam solo e areia contaminados por

hidrocarbonetos pesados, principalmente de origem industrial. Kosaric (2001), demonstrou que a biorremediação acelerou quando os biossurfactantes de glicolípídeos foram adicionados (0,5 kg/tonelada de solo) ao nutriente aplicado ao solo.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É crescente o interesse em biossurfactantes, principalmente os produzidos por microrganismos por serem considerados compatíveis ao ambiente, por possuírem baixa toxicidade e por serem biodegradáveis, também por possuírem propriedades estruturais únicas, importantes para suas aplicações industriais. Os biossurfactantes vem sendo explorados na recuperação de áreas contaminadas com petróleo, na inibição de bactérias e fungos e, também quanto a propriedades antiadesivas. Essas propriedades podem ser aplicadas em campos diversos da agricultura, indústrias de alimentos, de bebidas, farmacêuticas, cosméticos e com biorremediação de poluentes. Tendo em vista que os biossurfactantes possuem altos custos de produção em comparação com os surfactantes sintéticos, a escolha de matérias-primas baratas é importante para a economia do processo, sendo assim, essencial a seleção de substratos de baixo custo para ser rentável a sua produção para as indústrias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, H., HAMED, M. M., LOTFABAD, T. B., ZAHIRI, H. S., SHARAFI, H., MASOOMI, F. & NOGHABI, K. A. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 2, p. 211-219, 2012.

ABDEL-MAWGOUD, A. M., HAUSMANN, R., LÉPINE, F., MÜLLER, M. M., & DÉZIEL, E. Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. **In Biosurfactants**, v. 20, p. 13-55, 2011.

AGUIAR, G.P.S., LIMBERGER, G.M., SILVEIRA, E.L. Technological alternatives for the use of residues from the industrialization of fish. **Revista Eletrônica UNIVAR**, v. 1, p. 219–225, 2014.

AHIMOU F, JACQUES P, DELEU M. SURFACTIN & ITURIN. A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 10, p. 749-754, 2000.

AL-BAHRY, S. N., AL-WAHAIBI, Y. M., ELSHAFIE, A. E., AL-BEMANI, A. S., JOSHI, S. J., AL-MAKHMARI, H. S. & AL-SULAIMANI, H. S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141-146, 2013.

ARUTCHELVI, J.I., BHADURI, S., UPPARA, P.V. AND DOBLE, M. Mannosylerythritol lipids: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1559-1570, 2008.

BANAT I. M., MAKKAR R, AND CAMEOTRA S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BANAT I.M., DÍAZ DE RIENZO M.A., QUINN G.A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9915-9929, 2014.

BANAT, I. M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARTINOTTI, M. G., FRACCHIA, L & MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BANAT, I.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BANAT, I.M., SATPUTE, S.K., CAMEOTRA, S.S., PATIL, R., NYAYANIT, N.V., Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 697, 2014.

BARROS, F. F. C., QUADROS, C. P. D., MARÓSTICA JÚNIOR, M. R., & PASTORE, G. M. Surfactin: chemical, technological and functional properties for food applications. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BASSYOUNI, F. A., ABU-BAKR, S. M., HEGAB, K. H., EL-ERAKY, W., AHMED, A., & REHIM, M. E. A. Synthesis of new transition metal complexes of 1H-perimidine derivatives having antimicrobial and anti-inflammatory activities. **Research on Chemical Intermediates**, v. 38, n. 7, p. 1527-1550, 2012.

BENINCASA, M., ABALOS, A., OLIVEIRA, I. AND MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 1, p. 1-8, 2004.

BORAH, S. N., GOSWAMI, D., LAHKAR, J., SARMA, H. K., KHAN, M. R., & DEKA, S. Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* SS14 causes complete suppression of wilt by *Fusarium oxysporum* f. Sp. pisi in *Pisum sativum*. **Biocontrol**, v. 60, n. 3, p. 375-385, 2015.

CAO Y, XU Z, LING N, YUAN Y, YANGX, CHEN L, SHEN B, SHEN Q. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium wilt* of cucumber. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 32-39, 2012.

DAS, P., MUKHERJEE, S., SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1675–1684, 2008.

DE RIENZO, M. A. D., BANAT, I. M., DOLMAN, B., WINTERBURN, J., & MARTIN, P. J. Sophorolipid biosurfactants: possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 720-726, 2015.

DE RIENZO, M. A. D., BANAT, I. M., DOLMAN, B., WINTERBURN, J., & MARTIN, P. J. Metal removal from contaminated soils through bioleaching with oxidizing bacteria and rhamnolipid biosurfactants. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 24, n. 1, p. 16-29, 2015.

DESAI, J.D., BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DHANARAJAN, G., SEN, R., Cost analysis of biosurfactant production from a scientist's perspective. **Biosurfactants**, v. 159, p. 153, 2014.

DÍAZ DE RIENZO, M.A., STEVENSON, P., MARCHANT, R., BANAT, I.M. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 2, p. 224, 2015.

DUSANE, D. H., NANCHARAI AH, Y. V., ZINJARDE, S. S., & VENUGOPALAN, V. P. Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 242-248, 2010.

EDWARDS, S.J., KJELLERUP, B.V. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products,

and heavy metals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 9909-9921, 2013.

ELSHAFIE, A. E., JOSHI, S. J., AL-WAHAIBI, Y. M., AL-BEMANI, A. S., AL-BAHRY, S. N., AL-MAQBALI, D. A., & BANAT, I. M. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1324, 2015.

EL-SHESHTAWY, H. S., AIAD, I., OSMAN, M. E., ABO-ELNASR, A. A., & KOBISY, A. S. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 24, n. 2, p. 155-162, 2015.

ETOUMI, A. Microbial treatment of waxy crude oils for mitigation of wax precipitation. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 55, n. 1-2, p. 111-121, 2007.

FALAGAS, M. E.; MAKRIS, G. C. Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. **Journal of Hospital Infection**, v. 71, n. 4, p. 301-306, 2009.

FARIA, N. T., MARQUES, S., FONSECA, C., & FERREIRA, F. C. Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048 T. **Enzyme and Microbial Technology**, v.71, p. 58-65, 2015.

FERHAT, S., MNIF, S., BADIS, A., EDDOUAOUA, K., ALOUAOUI, R., BOUCHERIT, A. & SAYADI, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 8, p. 1182-1188, 2011.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., COELHO, M. A. Z. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

GORDILLO A. & MALDONADO M. C. Purification of peptides from *Bacillus* strains with biological activity. **Chromatography and Its Applications**, v. 11, p. 201-225, 2012.

GROVER, M., NAIN, L., SINGH, S. B., SAXENA, A. K. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. **Current Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 99-106, 2010.

GUDIÑA E.J., TEIXEIRA J.A., RODRIGUES L.R. Biosurfactant-Producing Lactobacilli: Screening, production profiles, and effect of medium composition. **Applied and Environmental Soil Science**, v.14, n.38, p. 1-15, 2011.

GUDIÑA, E. J., RODRIGUES, A. I., DE FREITAS, V., AZEVEDO, Z., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 144-150, 2016.

GUSTAVSSON, J., CEDERBERG, C., SONESSON, U., VAN OTTERDIJK, R., & MEYBECK, A. **Global Food Losses and Food Waste**. Rome: FAO, 2011.

HARVEY, S., ELASHVILLI, I., VALDES, J. J., KAMELY, D., CHAKRABARTY, M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by microbial surfactant. **Nature Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 228, 1990.

HENKEL, M., MÜLLER, M.M., KÜGLER, J.H., LOVAGLIOB, R.B., CONTIERO, J., SYLDATK, C., HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1207-1219, 2012.

HOSKOVA, M., SCHREIBEROVA, O., JEZDIK, R., CHUDOBA, J., MASAK, J., SIGLER, K., REZANKA, T. Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 510-516, 2013.

IBRAHIM, M.L., IJAH, U.J.J., MANGA, S.B., BILBIS, L.S., UMAR, S. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 28-34, 2013.

IN, Y. W., KIM, J. J., KIM, H. J., & OH, S. W. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against *Shigella* species. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 1, p. 79-85, 2013.

INÈS M., DHOuha G. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming. **Peptides**, v.71, p. 100-112, 2015.

JAŁOWIECKI, Ł., ŻUR, J., CHOJNIK, J., EJHED, H., & PŁAZA, G. Properties of antibiotic-resistant bacteria isolated from onsite wastewater treatment plant in relation to biofilm formation. **Current Microbiology**, p. 1-11, 2018.

KAMOSHITA M., MATSUMOTO Y., NISHIMURA K., KATONO Y., MURATA M., OZAWA Y., SHIMMURA S., TSUBOTA, K. *Wickerhamomyces anomalus* fungal keratitis responds to topical treatment with antifungal micafungin. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 2, p. 141-143, 2015.

KAPADIA, S. G.; YAGNIK, B. N. Current trend and potential for microbial biosurfactants. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 8, 2013.

KARDENA E, HELMY Q, AND FUNAMIZU N. Biosurfactants and Soil Bioremediation. **Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics**, v. 159, p. 327, 2014.

KIM, H. S., JEON, J. W., KIM, S. B., OH, H. M., KWON, T. J., & YOON, B. D. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 19, p. 1637-1641, 2002.

KIM, H.S., YOON, B.D., LEE, C.H., SUH, H.H., OH, H.M., KATSURAGI, T., TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.

KIRAN, G. S., HEMA, T.A., GANDHIMATH, R., SELVINA, J., THOMAS, T. A., RAVJI, T. R., NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization and production of a biosurfactant from

the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256, 2009.

KONISHI, M., IMURA, T., MORITA, T., FUKUOKA, T., AND KITAMOTO, D. A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows high binding affinity towards lectines on a self-assembled monolayer system. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 3, p. 473-480, 2007.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 295-304, 2001.

KOSARIC, N., VARDA-SUKAN, F. (Ed.). 'Biosurfactants : production and utilization--processes, technologies, and economics. **CRC Press**, p. 389, 2014.

KULAKOVSKAYA, T. V., GOLUBEV, W. I., TOMASHEVSKAYA, M. A., KULAKOVSKAYA, E. V. Production of antifungal cellobiose lipids by *Trichosporon porosum*. **Mycopathologia**, v. 169, n. 2, p. 117-123, 2010.

LAHKAR, J., BORAH, S. N., DEKA, S., & AHMED, G. Biosurfactant of *Pseudomonas aeruginosa* JS29 against *Alternaria solani*: The causal organism of early blight of tomato. **BioControl**, v. 60, n. 3, p. 401-411, 2015.

LAZAR, I., VOICU, A., NICOLESCU, C., MUCENICA, D., DOBROTA, S., PETRISOR, I. G. & SANDULESCU, L. The use of naturally occurring selectively isolated bacteria for inhibiting paraffin deposition. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 22, n. 1-3, p. 161-169, 1999.

LI, J., DENG, M., WANG, Y., CHEN, W. Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycooides* BS6 utilizing soybean oil waste. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 112, p. 72-79, 2016.

LOTFABAD, T.B., ABASSI, H., AHMADKHANIHA, R., ROOSTAAZAD, R., MASOOMI, F., ZAHIRI, H.S., AHMADIAN, G., VALI, H., NOGHABI, K.A. Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01:

enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 2, p. 397-405, 2010.

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. 5, 2011.

MIRELES JR, TOGUCHI A, HARSHEY RM. *Salmonella enterica serovar typhimurium* swarming mutants with altered biofilm forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 20, p. 5848-5854, 2001.

MNIF I, GHRIBI D. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 13, p. 4310-4320, 2016.

MNIF, I., ELLOUZE-CHAABOUNI, S., GHRIBI, D. Economic production of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant using local agro-industrial wastes and its application in enhancing solubility of diesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 779-787, 2013.

MNIF, I., GRAU-CAMPISTANY, A., CORONEL-LEÓN, J., HAMMAMI, I., TRIKI, M. A., MANRESA, A., GHRIBI, D. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6690-6699, 2016.

MONTEIRO, A. S., MIRANDA, T. T., LULA, I., DENADAI, Â. M., SINISTERRA, R. D., SANTORO, M. M., & SANTOS, V. L. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfaces by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 467-476, 2011.

MORITA T, FUKUOKA T, IMURA T, DAI KITAMOTO L. Production of 778 mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 4691-4700, 2013.

MUKHERJEE, S., DAS, P., & SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C. N., SHARMA, S. K., MUDHOO, A., & MAKHIJANI, K. 1 Green Chemistry and. **Biosurfactants: Research Trends and Applications**, p. 1, 2014.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, n. 1-4, p. 371-380, 2001.

NICOLETTI R., TRINCONE A. Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, p. 37, 2016.

NITSCHKE, M., & PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M., & PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

PACWA-PLOCINICZAK, M., PLAZA, G.A., PIOTROWSKA-SEGET, Z., SINGH, S.C. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.

PARASZKIEWICZ, K. Biosurfactant enhancement factors in microbial degradation processes. In: **Microbial Biodegradation: From Omics to Function and Application**. Caister Academic Press, p. 167-182, 2016.

PARASZKIEWICZ, K. Production and utilization-processes, technologies, and economics. **CRC Press Taylor & Francis Group**, Florida, p. 153-161, 2016.

PARASZKIEWICZ, K., BERNAT, P., KUŚMIERSKA, A., CHOJNIAK, J., & PŁAZA, G. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains

grown on the media obtained from renewable natural resources. **Journal of Environmental Management**, v. 209, p. 65-70, 2018.

PERFUMO, A., BANAT, I.M., CANGANELLA, F., & MARCHANT, R. Rhamnolipid production by a novel thermos-tolerant hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 1, p. 132, 2006.

RAKESHKUMAR M., JAIN K.M., NIDHI J., AVINASH M., BHAVANATH J. Effect of unconventional carbon sources on bio surfactant production and its application in bioremediation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 52-58, 2013.

RANA D., BATEJA S., BISWAS S., KUMAR A., MISRA T., LAL B., Novel microbial process for mitigating wax deposition in down hole tubular and surface flow lines. **SPE Oil and Gas India Conference and Exhibition**. Society of Petroleum Engineers, 2010.

RIVARDO, F., TURNER, R. J., ALLEGRONE, G., CERI, H., MARTINOTTI, M. G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 541-553, 2009.

RODRIGUES LR, TEIXEIRA JA, VANDER MEI HC, OLIVEIRA R. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 49, n. 1, p. 79-86, 2006.

RODRIGUES, L.R., TEIXEIRA, J.A., VAN DER MEI, H.C., OLIVEIRA, R. Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, n. 1, p. 105-112, 2006.

RUFINO R.D., DE LUNA J.M., TAKAKI G.M.C., SARUBBO L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 6-6, 2014.

SAKTHIPRIYA N., DOBLE M., SANGWAI J.S. Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 168-177, 2015.

SAMBANTHAMOORTHY, K., FENG, X., PATEL, R., PATEL, S., PARANAVITANA, C. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 197, 2014.

SANZANI, S.M., SUSCA, A., MASTROROSA, S., SOLFRIZZO, M. Patulin risk associated with blue mould of pome fruit marketed in southern Italy. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 9, n. 1, p. 23-29, 2017.

SARAVANAKUMARI P, MANI K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8851-8854, 2010.

SATPUTE, S.K., BANAT, I.M., DHAKEPHALKAR, P.K., BANPURKAR, A.G., CHOPADE, B.A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 436-450, 2010.

SATPUTE, S.K., BANPURKAR, A.G., DHAKEPHALKAR, P.K., BANAT, I.M., CHOPADE, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127-144, 2010.

SATPUTE, S.K., PŁAZA, G., BANPURKAR, A.G. Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 25, n. 1, p. 46-54, 2017.

SHARMA, D., SAHARAN, B.S., CHAUHAN, N., BANSAL, A., PROCHA, S. Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant, **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 493 – 548, 2014.

SHEKHAR S, SUNDARAMANICKAM A, BALASUBRAMANIAN T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 14, p. 1522-1554, 2015.

SILVA, N. M. P. R., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SANTOS, V. A., & SARUBBO, L. A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 132-139, 2014.

SINGH, P., CAMEOTRA, S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 142-146, 2004.

SINGH, P., SRIVASTAVA, B., KUMAR, A., KUMAR, R., DUBEY, N. K., & GUPTA, R. Assessment of Pelargonium graveolens oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 14, p. 2421-2425, 2008.

SOUZA K.S.T., GUDINA E.J., AZEVEDO Z., DE FREITAS V., SCHWAN R.F., RODRIGUES L.R., DIAS D.R, TEIXEIRA J.A. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, p. 373-382, 2017.

SOUZA, E.C., VESSONI-PENNA, T.C., OLIVEIRA, R.P.D.S. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 88-94, 2014.

SOUZA, K. S. T., GUDIÑA, E. J., SCHWAN, R. F., RODRIGUES, L. R., DIAS, D. R., & TEIXEIRA, J. A. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 346, p. 152-158, 2018.

STANGHELLINI, M. E., MILLER, R. M. Biosurfactants: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, v. 81, n. 1, p. 4-12, 1997.

TAZDAÏT D., SALAH R., MOUFFOK S., KABOUCHE F., KEDDOU I., ABDI N., GRIB H., MAMERI N.. Preliminary evaluation of a new low-cost substrate (amurca) in production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fuel-contaminated soil. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 9, n. 3, p. 964-970, 2018.

VARJANI, S. J., & UPASANI, V. N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 510-516, 2016.

VARJANI, S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

VARJANI, S.J., RANA, D.P., BATEJA, S., SHARMA, M.C., UPASANI, V.N. Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering Technol**, n. 3, n. 2, p. 9205–9213, 2014.

VARJANI, S.J., UPASANI, V.N. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 195-201, 2016.

VARJANI, S.J., UPASANI, V.N. Core flood study for enhanced oil recovery through ex-situ bioaugmentation with thermo- and halo-tolerant rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 175-182, 2016.

VILLA, A. L. V., ARAGÃO, M. R. S., DOS SANTOS, E. P., MAZOTTO, A. M., ZINGALI, R. B., DE SOUZA, E. P., & VERMELHO, A. B. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 15, 2013.

ZAKI, M. F., & TAWFIK, S. M. Synthesis, surface properties and antimicrobial activity of some germanium nonionic surfactants. **Journal of Oleo Science**, v. 63, n. 9, p. 921-931, 2014.

ZHANG F., SHE H.Y., LI H.M., ZHANG X.T., SHU F.C., WANG Z.L., YU L.J., HOU D.J. Impact of an indigenous microbial enhanced oil recovery field trial on microbial community structure in a high pour-point oil reservoir, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 811-821, 2012.

ZHANG F., SHE Y.H., BANAT I.M., CHAI L.J., YI S.J., YU G.M., HOU D.J., Potential microorganisms for prevention of paraffin precipitation in a hypersaline oil reservoir. **Energy & Fuels**, v. 28, n. 2, p. 1191-1197, 2014.

ZHAO, F., ZHOU, J.-D., MA, F., SHI, R.-J., HAN, S.-Q., ZHANG, J., ZHANG, Y. Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H₂S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl: applications for microbial enhanced oil recovery. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 24-30, 2016.

CAPÍTULO 2

Article

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF A GLYCOLIPIDE PRODUCED BY YEAST

Wickerhamomyces anomalus CCMA 0358

Abstract

Biosurfactants are secondary metabolites, produced in the stationary phase of microbial growth, of an amphiphilic nature and have the potential to be applied in detergents, pharmaceuticals, cosmetics and in the food industry. The objective of this work was to evaluate the potential uses of a glycolipid produced by yeast *Wickerhamomyces anomalus* (CCMA 0358) in media containing alternative carbon sources soybean oil and palm oil as substrates, and comparing them to olive oil. The crude biosurfactant was checked for antibacterial and antiadhesive activity on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* using micro dilution method evaluated at different concentrations. The antifungal activity was performed against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cercospora sorghi*, *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium verticillioides* and *Fusarium solani*. The results showed that the yeast *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 is able to produce biosurfactant in different substrates, which was able to inhibit the growth and adhesion of all evaluated bacteria, demonstrating antibacterial capacity of up to 100% and antiadhesive, reaching 31% of inhibition. In addition, it inhibited the growth of all phytopathogenic fungi and food contaminants by up to 95% over the control. In addition to showing promising antimicrobial results against bacteria and fungi contaminating food and phytopathogenic fungi, the yeast *W. anomalus* is able to produce the biosurfactant from an inexpensive substrate, such as soybean oil used, which allows a greater possibility of applications due to its low cost.

Key words: Biosurfactant, biotechnological potential, antimicrobial activity, antiadhesive, antifungal.

1. INTRODUCTION

Biosurfactants are amphiphilic compounds produced by microorganisms, both on their cell surface and inside the cell (SAMBANTHAMOORTHY, et al., 2014). These microbial compounds comprise a variety of chemical structures, such as glycolipids, phospholipids, lipopeptides, fatty acids and neutral lipids (AHIMOU, JACQUES & DELEU, 2001). Two classes of biosurfactants are currently considered of industrial and economic relevance: glycolipids and lipopeptides, both of which are low molecular weight surfactants (HENKEL, et al., 2012).

Glycolipids consist of sugar and lipids in which the carbohydrate moiety is attached to a portion of fatty acid (aliphatic acids or hydroxylaliphatic acids) (ZHAO et al., 2016). Normally, glycolipids are known for their good stability under extreme conditions of pH, salinity and temperature (MNIF & GHRIBI, 2016). Aerobic microorganisms such as bacteria, fungi, yeasts and actinomycetes produce lipopeptides. Lipopeptide surfactants are produced naturally as a mixture of several macromolecules belonging to the same family or class (MNIF & GHRIBI, 2015).

The advantages of biosurfactants on chemical surfactants are greater specific action, low toxicity, high biodegradability, generalized applicability and, in addition, their unique structures that can show new properties and future applications (DE RIENZO, et al., 2015). Biosurfactants have different properties and have a variety of physiological functions depending on the microorganisms that produce them (DIAZ DE RIENZO et al. 2016).

Another advantage of biosurfactants are the antibacterial, antifungal and antiadhesive activities that make them relevant compounds for applications in the fight against many diseases and infections. Biosurfactants with known antimicrobial activity include surfactin and iturin produced by *Bacillus subtilis* strains (AHIMOU et al., 2001), lipid mannoseritritol (MEL) produced by *Candida antarctica* (ARUTCHELVI et al., 2008) and *Pseudozyma antarctica* (NASHIDA, et al., 2018), *Pseudomonas aeruginosa* raminolipids (BENINCASA et al. 2004) and biosurfactants isolated from *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis* (RODRIGUES et al., 2006), besides biosurfactant produced by *Bacillus cereus* (BASIT, et al., 2018), produced by *Candida sphaerica* (LUNA, et al., 2011) and *Candida parapsilosis* (GARG & CHATTERJEE, 2018).

The main group of microorganisms producing biosurfactants are bacteria, but filamentous fungi and yeasts can also produce them. One of the great advantages of the use of yeasts in the production of biosurfactants is that most of these species are recognized as GRAS (generally recognized as safe), such as *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*

and *Kluyveromyces lactis*, which allows the application of their products in the pharmaceutical and food industry (FONTES, AMARAL & COELHO, 2008).

The evaluation of the production of biosurfactants by yeasts has increased in recent years, and several strains have been reported as biosurfactant producers, due to their high production yields and high substrate conversion rates. Among them, species belonging to the genus *Candida*, *Starmerella*, *Pseudozyma*, *Yarrowia* and *Wickerhamomyces* (FARIA, et al., 2015; ELSHAFIE, et al., 2015; SOUZA, et al., 2018) stand out.

The objective of this work was to evaluate the biotechnological potential of biosurfactant produced by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 as well as its antibacterial and antifungal properties with inductive substrates containing olive oil, used soy oil or palm oil.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Culture conditions

The yeast *W. anomalus* CCMA 0358 (isolated from coffee processing) was obtained from the Agricultural Microbiology Culture Collection, CCMA (Department of Biology, Federal University of Lavras, Brazil). Yeast was grown in YEPG medium (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose, pH 6.5) at 28 ° C and 200 rpm for 48 hours.

2.2 Biosurfactant production

A 5 L capacity bioreactor (BIOSTAT® A Fermentor, B. Braun Biotech International GmbH, Germany) was used, equipped with stirring and temperature measurement and control. The experiments were carried out at 28°C using 2 L of the previously optimized culture medium containing different substrates (yeast extract - 4.64 g/L, ammonium sulfate - 4.22 g/L, glucose - 1.39 g/L and 10 g/L of olive oil or spent oil or palm oil) (SOUZA, et al., 2018), with the air injected into the bottom of the bioreactor with a constant flow. A culture of *W. anomalus* CCMA 0358 (grown for 24 hours in YEPG medium at 28 ° C and 200 rpm) was inoculated into the bioreactor to achieve an initial cell concentration of 10^7 cells/mL. The bioreactor was programmed to maintain stirring at 500 rpm for biosurfactant production in 12 hours of fermentation. To evaluate cell growth, samples (15 mL) were collected at zero times and after 12 hours of fermentation (SOUZA, et al., 2017). Cell growth was determined

according to the number of cells counted using a Neubauer improved cell counter (Marienfeld GmbH, Germany).

2.3 Recovery of Biosurfactant

To obtain the cell-free supernatant, the medium was withdrawn from the bioreactor and centrifuged for 10 minutes at 15000 rpm and 4 °C. The biosurfactant produced was recovered from the cell-free supernatant by adsorption chromatography using a glass column (430 mL) filled with Amberlite XAD-2 polystyrene resin (Sigma-Aldrich, USA), as described by Gudiña et al. (2010). 250 mL of the cell free supernatant obtained at the end of the fermentation through the column was passed until the surface tension of the effluent was equal to or greater than 50 mN/m. Subsequently, the column was washed with three volumes of demineralized water to remove the non-adsorbed compounds. Finally, the resin-adsorbed biosurfactant was eluted with 750 mL of methanol, subsequently was utilized a rotary evaporator at 60 °C and 120rpm, crude biosurfactant obtained was used for the tests.

2.4 Antibacterial activity

The antimicrobial activity of the crude biosurfactant against several microorganisms was determined using the microdilution method in 96-well plastic tissue culture plates (Orange Scientific, Belgium), as described by Gudiña et al. (2015). The microorganisms used to evaluate the antiadhesive capacity of the biosurfactants were *Escherichia coli* (EPEC 055), *Salmonella enteritidis* (ATCC 564), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 8702). Subsequently, 100 µL of double strength culture medium (LB) were placed into the 1st column of the 96-well microplate, and 100 µL of single strength culture medium in the remaining wells. After that, 100 µL of the crude biosurfactant solution were added to the 1st column of the microplate and gently mixed with the medium. Subsequently, 100 µL from the 1st column were transferred to the 2nd column and mixed; serially, 100 µL were transferred to the subsequent wells, discarding 100 µL of the mixture in the 10th column, so that the final volume in each well was 100 µL. This process resulted in two-fold serial dilutions of the biosurfactant in the first 10 columns. Columns 11 and 12 did not contain biosurfactant and served as negative and growth controls, respectively. All the wells (except for the 11th column) were inoculated with 10 µL of a pre-culture of the corresponding microorganism grown overnight in the appropriate culture medium (LB) at 37°C. The microplates were covered and incubated for 24 at 37 °C. After the incubation time, the optical

density at 600 nm was determined for each well. The growth inhibition percentages at different biosurfactant concentrations for each microorganism were calculated as:

$$\% \text{ Growth Inhibition} = [1 - (A_C / A_0)] \times 100$$

Where, A_C represents the absorbance of the well with the biosurfactant concentration and A_0 is the absorbance of the control well. All assays were performed in triplicate.

2.5 Antiadhesive Activity

The antiadhesive activity of the biosurfactant was quantified according to the procedure described by Heinemann, et al. (2000). The microorganisms used to evaluate the antiadhesive capacity of the biosurfactants were *Escherichia coli* (EPEC 055), *Salmonella enteritidis* (ATCC 564), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 8702). These bacteria were cultured in TSB medium at 37 °C and standardized at 10⁸ CFU/mL. After incubation, the cells were centrifuged for 10 minutes at 15000 rpm and 4 °C, then the supernatant was discarded and replaced with sterile water, centrifuged for washing the cells.

200 µL of the biosurfactant concentration (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%) were added in 96-well microplates. The plate was incubated for 18 h at 4 °C and subsequently washed twice with PBS buffer (KH₂ PO₄ phosphate buffer – 0,21 g/L; NaCl 9 g/L; Na₂ HPO₄ 0,726 g/L). Then, a 200 µL aliquot of the washed bacterial suspension was added and incubated in the wells for 4 hours at 4 °C. The control wells contained only PBS buffer. The unbound microbial cells were removed after three consecutive washes with PBS. Cells that were able to adhere to the microplate were fixed with 200 µL of methanol, and then all methanol was discarded. After drying the plates, staining was performed for 5 minutes with 200 µL of 2% crystal violet, and the excess of the dye was removed under running water. The plates were then dried outdoors, and the dye attached to the adherent microorganisms was solubilized with 200 µL of 33% (v/v) glacial acetic acid per well, and the absorbance of each well was read in ELISA (Thermo Scientific) at 600 nm. The percentages of inhibition of adhesion in relation to the control and to different concentrations of biosurfactant for each microorganism were calculated according to the equation:

$$\% \text{ Growth Inhibition} = [1 - (A_C / A_0)] \times 100$$

Where, A_c represents the absorbance of the well with the biosurfactant concentration and A_0 is the absorbance of the control well. All assays were performed in triplicate.

2.6 Antifungal activity

The antifungal activity of the biosurfactant was performed according to Singh, et. al. (2008). Different concentrations of biosurfactants in aqueous solution were used in the test of antifungal activity (30, 40 and 50%) against six species of phytopathogenic fungi and food contaminants belonging to the Laboratory of Seed Pathology, Federal University of Lavras (*Aspergillus flavus* (LAPS 155), *Aspergillus niger* (LAPS 182), *Cercospora sorghi* (LAPS 122), *Colletotrichum truncatum* (LAPS 457), *Fusarium verticillioides* (LAPS 355) and *Fusarium solani* (LAPS 167).

Different concentrations of biosurfactants evaluated were added in PAD medium (Potato Agar Dextrose). The fungi were grown for 4 days at 25 °C in PAD medium. Then part of the mycelium of each fungus was cut into a disc (0,5 cm) with the aid of a sterile tip and inoculated to the center of the partially solidified plates containing the different concentrations of the biosurfactant and the control treatments (without biosurfactant). The plates were incubated at 25 °C until the fungal growth of the control was almost complete (AGARWAL, et al., 2001). The reduction in radial growth was measured and the percentage of inhibition relative to the control was calculated using the formula (CAKIR, et al., 2004).

$$I\% = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$

Were,

I = % Inhibition of mycelial growth (reduction of growth in relation to the control).

C = Radial growth of the fungus on the control plate (mm).

T = Radial growth of the fungus in the plate inoculated with biosurfactant (mm).

For the negative control, a broad - spectrum chemical fungicide, Cercobin 700wp (Iharabras S.A. Indústria Química) was used in a concentration of 80ul per cm² (according to the manufacturer's information). It is a systemic fungicide, used to control numerous fungal diseases in different crops, in the form of aerial sprays and in seed treatment. All assays were performed in triplicate.

2.7 Statistical Analyzes

From the data obtained for each treatment, the analysis of variance was performed, for the five characters evaluated, using the nominal level. The analyzes were performed with the statistical software Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014). For the substrate and concentration characteristics, the Skott-knott test (5%) was used for the qualitative variables and regression analysis for the quantitative treatments.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Biosurfactant production

The cell growth was evaluated by counting in the Neubauer chamber, a fermentation started at 3×10^7 cells/mL and end after 12 hours was counted to evaluate cell viability. Three fermentations were made in bioreactor with three different substrates for the production of biosurfactant, olive oil, used soy oil and palm oil. Table 1 shows that cell growth in the three fermentations reached a population of 10^9 cells/mL after 12 hours of fermentation.

Table 1 – Number of cells/mL in three different substrates for the production of biosurfactant (0h and 12h of fermentation)

Substrate	Fermentation time	
	0h	12h
Olive oil	3×10^7	$9,3 \times 10^9$
Soy oil	3×10^7	$1,6 \times 10^9$
Palm Oil	3×10^7	$7,2 \times 10^9$

Cell growth of yeast (cells/mL) *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 during the 12 hours fermentation for the production of the biosurfactant.

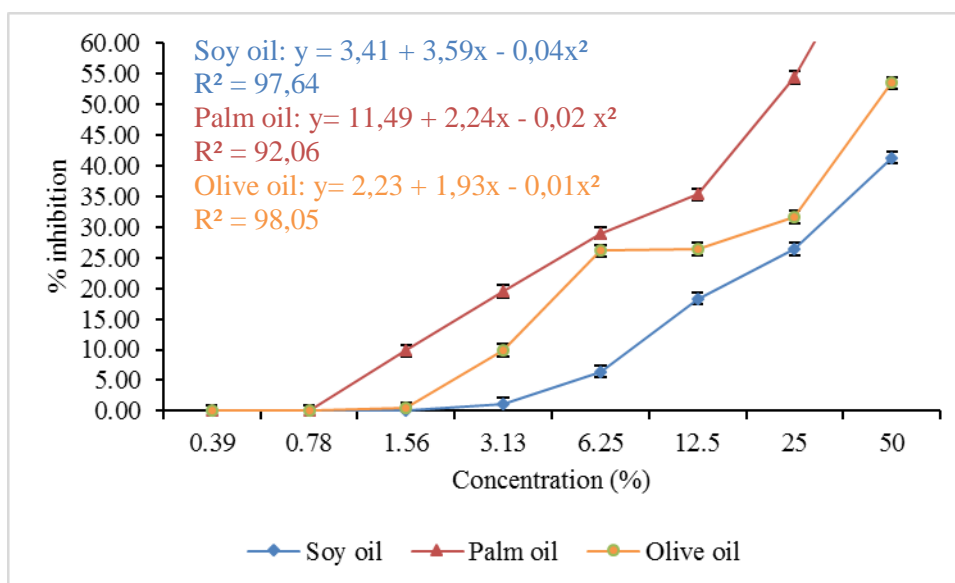
3.2 Antibacterial activity

One of the potential uses of the biosurfactant as a bio-product includes its role as an antimicrobial agent. The biosurfactants revealed their antimicrobial activity by their lytic membrane properties (GOMAA, 2013; JEMIL et al., 2017). Microbial surfactants can interfere in the adhesion of microorganisms to different surfaces (RODRIGUES, 2011); some of them reported to exhibit antibacterial and antifungal activity (GUDIÑA, et al., 2010; RUFINO, et al., 2013, GUDIÑA, et al., 2015). These properties contribute to their potential use as alternatives to conventional therapeutic agents in many biomedical applications.

The antimicrobial activity of the crude biosurfactant produced by *W. anomalus* CCMA 0358 was determined by measuring the growth inhibition percentages obtained for different microorganisms at different concentrations of biosurfactant. The results obtained for an antibacterial action for the biosurfactants are produced from substrates of olive oil used soy oil and palm oil in different concentrations are shown in the figures 3, 4, 5 and 6.

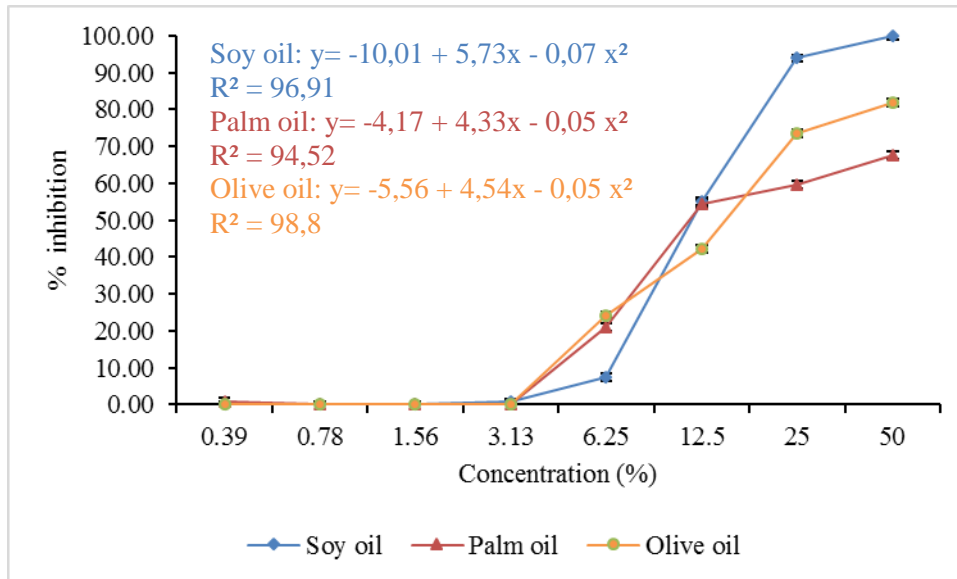
This biosurfactant showed percent inhibition of growth of 41 to 82% against *Staphylococcus aureus*, in which the crude biosurfactant produced from the oil palm substrate was more efficient (Figure 3), for the bacteria *Bacillus cereus* (67 to 100%) (Figure 4), *Salmonella enteritidis* (59 to 75%) (Figure 5) and *Escherichia coli* (62 to 96%) (Figure 6), the best substrate used for the production of the biosurfactant was that of soybean oil used, in which a complete inhibition was observed for the bacterium *B. cereus* was, in the concentration of 50%. It can be noticed that the substrate used for the production of the biosurfactant that presented a greater percentage of inhibition was the soy oil used, being very promising, since it is an inexpensive substrate. The antibacterial results with the current biosurfactant were comparable to those obtained in previous reports (DÍAZ DE RIENZO, et al., 2016; MANI, et al., 2016).

Figure 3 - Growth inhibitory percentages against *Staphylococcus aureus* (ATCC 8702) obtained with crude biosurfactant isolated from *W. anomalus* CCMA 0358 on different substrates at different concentrations.



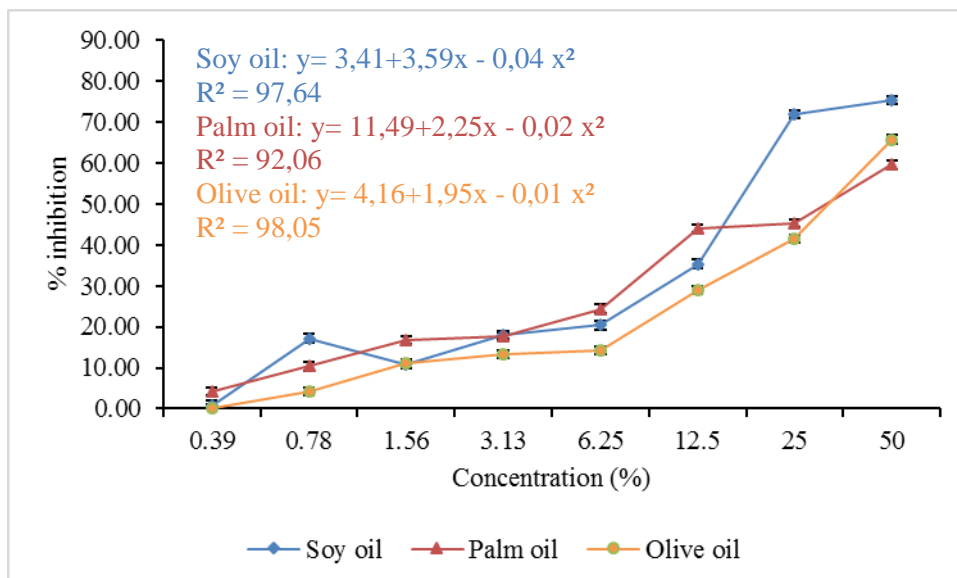
Staphylococcus aureus (ATCC 8702) strain was used. The biosurfactant concentrations used were 0,39%; 0,78%; 1,56%; 3,13%; 6,25%; 12,5%; 25% and 50%.

Figure 4 - Growth inhibitory percentages against *Bacillus cereus* (ATCC 14579) obtained with crude biosurfactant isolated from *W. anomalus* CCMA 0358 on different substrates at different concentrations.



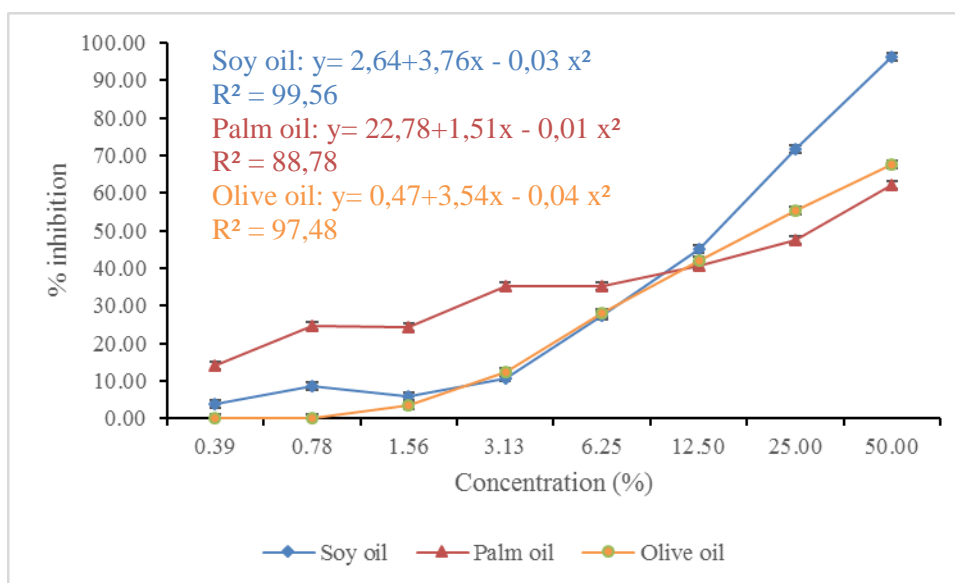
Bacillus cereus (ATCC 14579) strain was used. The biosurfactant concentrations used were 0,39%; 0,78%; 1,56%; 3,13%; 6,25%; 12,5%; 25% and 50%.

Figure 5 - Growth inhibitory percentages against *Salmonella enteritidis* (ATCC 564) obtained with crude biosurfactant isolated from *W. anomalus* CCMA 0358 on different substrates at different concentrations.



Salmonella enteritidis (ATCC 564) strain was used. The biosurfactant concentrations used were 0,39%; 0,78%; 1,56%; 3,13%; 6,25%; 12,5%; 25% and 50%.

Figure 6 - Growth inhibitory percentages against *Escherichia coli* (EPEC 055) obtained with crude biosurfactant isolated from *W. anomalus* CCMA 0358 on different substrates at different concentrations.



Escherichia coli (EPEC 055) strain was used. The biosurfactant concentrations used were 0,39%; 0,78%; 1,56%; 3,13%; 6,25%; 12,5%; 25% and 50%.

Similar results were found in the work of Basit et al. (2018), biosurfactant produced by *Bacillus cereus* evaluated against *S. aureus* and *E. coli* of to 63% of inhibition. In addition, the crude biosurfactant produced by *W. anomalus* CCMA 0358 showed higher antimicrobial activity against all microorganisms when compared to the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* UCP 0995 in a similar concentration (LUNA, et al., 2011). Garg & Chatterjee (2018) evaluated the crude biosurfactant *Candida parapsilosis*, which showed antimicrobial activity with similar concentrations against *S. aureus* and *E. coli*, with inhibition of 95 and 90% respectively. Nashida et al. (2018), also reports the antibacterial activity of biosurfactant produced from soy oil substrate by the yeast *Pseudozyma antarctica*, being a Mannosylerythritol Lipids, which obtained a result of up to 71% inhibition against the bacterium *S. aureus*, similar to the results herein obtained.

3.3 Antiadhesive Activity

The antiadhesion assay allows estimation of crude biosurfactant concentrations that are effective in decreasing the adhesion of the evaluated microorganisms. This activity estimates the percentage of reduction of microbial adhesion relative to the control, which

were adjusted to 0% to indicate the absence of biosurfactant. In contrast, negative results indicate the percentage increase in microbial adhesion at a given concentration of biosurfactant in relation to the control.

The antiadhesive activity of the biosurfactant was examined against the bacterial strains using micro dilution method in different concentrations (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% and 100%). The biosurfactants showed antiadhesive activity against the microorganisms tested, but the antiadhesive effect depends on the substrate used in the biosurfactant, the concentration and the microorganism tested (GUDÑA, et al., 2010).

This biosurfactant showed inhibition of adhesion with a percentage of growth of 6 to 14% against *Staphylococcus aureus*, in which the substrates used for the production of the crude biosurfactant did not present statistical differences among them, for the bacteria *Escherichia coli* (inhibition of 7 to 26%) and *Bacillus cereus* (20 to 23%), a statistical difference between the substrates used for the production of the crude biosurfactant, in which palm oil was shown to be the most inhibitory when compared to the other substrates, the *Salmonella enteritidis* strain presented a inhibition of adhesion of 11 to 15% and also did not present statistical differences. For none of the concentrations evaluated there was statistical difference (Table 2).

Table 2 - Statistical difference between the substrates and the concentrations used for the *B.cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli* bacteria, in which the averages and concentrations of the substrates are in percentage.

<i>Bacillus cereus</i>		<i>Salmonella enteritidis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
Biosurfactant	Antiadhesion	Biosurfactant	Antiadhesion	Biosurfactant	Antiadhesion	Biosurfactant	Antiadhesion
Olive oil	19.68 b	Olive oil	13.97	Olive oil	11.16	Olive oil	13.68 b
Soy oil	20.40 b	Soy oil	14.29	Soy oil	9.30	Soy oil	14.83 b
Palm oil	23.37 a	Palm oil	13.29	Palm oil	10.99	Palm oil	17.13 a
Concentration (%)		Concentration (%)		Concentration (%)		Concentration (%)	
	30 20.17		30 11.95		30 6.26		30 7.82
	40 20.30		40 13.64		40 8.74		40 9.52
	50 21.71		50 13.08		50 8.98		50 9.52
	60 21.07		60 15.47		60 9.45		60 13.03
	70 18.90		70 12.37		70 10.87		70 13.15
	80 21.45		80 14.48		80 11.93		80 19.72
	90 22.47		90 14.62		90 13.00		90 22.90
	100 23.11		100 15.19		100 14.65		100 26.07
CV	18.56	CV	24.55	CV	38.10	CV	24.46
Standard error	1.30	Standard error	1.13	Standard error	1.33	Standard error	1.24

Means followed by distinct, lowercase letters in the columns differ from each other by the Skott-knott test ($p \leq 0.05$).

The antiadhesive activity observed with this biosurfactant against several pathogenic microorganisms such as *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* and *Salmonella enteritidis* are very promising. However new studies and applications should be evaluated with the aim of reducing microbial colonization in different foods and materials. The highest inhibition result of adhesion to control was for *E. coli* and the lowest inhibition values were for *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*.

The ability of biosurfactants to disperse a biofilm of pathogenic microbial species, reducing cell viability and reducing bacterial adhesion properties, has been reported as demonstrated in the present work (JALOWIECKI et al., 2018). Jemil, et al. (2017) reported that inhibition of biofilm formation was concentration-dependent, and the antiadhesion effect remained almost constant above a concentration of 1 mg/mL⁻¹, and demonstrated 89% inhibition results, obtaining results higher than those found on here. In addition, both biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* presented antiadhesion activity with percentages varying from 80,22% to 86,21% and from 53,38% to 64,42% against *S. aureus* strains, also showed higher inhibition results that of this work (MERGHNI, et al., 2017).

The possible mechanism of such actions is related to the binding of the biosurfactant molecules to the components of the cell wall or to its surface, which results in severe changes in the hydrophobicity of the outer membrane. The insertion of surfactants into the bilayer cell membrane structure may result in disruption of its integrity (JALOWIECKI, et al., 2018). The negative influence of biosurfactants on Gram-negative and Gram-positive strains is related to the release of biosurfactant molecules from the outer membrane or to the formation of transmembrane pores, which results in increased cell wall permeability (RIVARDO et al., 2009).

The biosurfactant isolated in this study showed antiadhesive activity against all evaluated microorganisms. The involvement of biosurfactants in adhesion and microbial desorption has been widely described and the adsorption of isolated biosurfactants to solid surfaces can constitute an effective strategy to reduce microbial adhesion and to combat colonization by pathogenic microorganisms, not only in the biomedical field, but also in other areas such as the food industry (NITSCHKE, COSTA & VAO, 2007; SINGH et al., 2007; FALAGAS & MAKRIS 2009).

3.3 Antifungal activity

In recent years, many studies have demonstrated problems arising from the presence of pesticide residues in the environment, foods, and feeds. This allowed us to avoid the use of some chemical fungicides to control the disease of plants and spoilage of their products used for food. Alternative methods to control these pathogens and spoilage organisms are now being investigated. Several microorganisms such as bacteria, yeasts, fungi, and their related metabolites could be exploited as biological control agents to replace hazardous chemical fungicides (HAMMAMI et al., 2009; AL-REZA et al., 2010). In this work, the use of a biosurfactant derived from *W. anomalus* CCMA 0358 as a potent antifungal agent against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cercospora sorghi*, *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium verticillioides* and *Fusarium solani*.

The biosurfactant produced here presented inhibition of mycelial growth, relative to the control, with a percentage of 72 to 94% against *Fusarium solani*, in which the used soybean oil substrate used for the production of the crude biosurfactant stood out in relation to the other substrates statistically, because it did not present statistic differences between the concentrations, being able to be used in a lower concentration. *Aspergillus niger* observed an inhibition of 20 to 90%, with no statistical difference between the substrates at the highest concentration (50%). For *Colletotrichum truncatum*, the inhibition observed was 75 to 94%, in which the used olive oil substrate used for the production of the crude biosurfactant stood out in relation to the other substrates statistically, because it did not present statistical differences between the concentrations. Statistically, for the three fungi, there was interaction between concentration and substrate, observed in table 3.

Table 3 - Statistical difference between the substrates and the concentrations used for the *F. solani*, *A. niger* and *C. truncatum* fungi, in which the averages and concentrations of the substrates are in percentage.

% Inhibition <i>Fusarium solani</i>			% Inhibition <i>Aspergillus niger</i>			% Inhibition <i>Colletotrichum truncatum</i>					
Concentration(%) /biosurfactant	30	40	50	30	40	50	30	40	50		
Palm oil	72.22 cC	85.13 bB	94.44 aA	Palm oil	20.0 bC	60.0 bB	89.3 aA	Palm oil	75.92 cB	94.07 aA	94.44 aA
Soy oil	91.85 aA	94.44 aA	94.44 aA	Soy oil	30.0 aC	40.0 cB	90.0 aA	Soy oil	91.85 bB	94.44 aA	94.44 aA
Olive oil	79.63 bB	94.44 aA	94.44 aA	Olive oil	20.0 bC	80.0 aB	88.66 aA	Olive oil	94.44 aA	94.44 aA	94.44 aA
CV	2.88			CV	5.98			CV	1.56		

The averages followed by distinct lowercase letters in the columns and uppercase letters in the lines differ from each other by the Skott-knott test ($p \leq 0.05$).

For *Aspergillus flavus* the mycelial inhibition in relation to the control was 67 to 95%, being the fungus that presented greater sensitivity to the biosurfactant. *Fusarium verticillioides* showed an inhibition of 37 to 61%, whereas for *Cercospora sorghi*, the inhibition observed was 37 to 91%. Statistically, for the three fungi, there was no interaction between concentration and substrate, observed in table 4.

Table 4 - Statistical difference between the substrates and the concentrations used for the *A. flavus*, *F. verticillioides* and *C. sorghi* fungi, in which the averages and concentrations of the substrates are in percentage.

Biosurfactant	% Inhibition		
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Cercospora sorghi</i>
Palm oil	78.88 c	44.44 c	65.74 b
Soy oil	82.77 b	50.00 c	63.51 b
Olive oil	84.72 b	58.95 b	64.81 b
Cercobin	100.00 a	100.00 a	100.00 a
Concentration			
30	67.13 c	37.34 b	37.03 c
40	83.79 b	54.93 a	65.74 b
50	95.46 a	61.11 a	91.29 a
CV	4.93	14.32	11.92

Means followed by distinct, lowercase letters in the columns differ from each other by the Skott-knott test ($p \leq 0.05$).

For the negative control, mycelial growth was not observed in all evaluated fungi. When compared to the biosurfactant, there was greater efficiency, however the product is classified as extremely toxic to the environment and to animals, including humans (IHARA, 2018). While biosurfactants are neither toxic to the environment nor to animals. The biosurfactants showed antifungal activity against the evaluated microorganisms, and their effects varied depending on the substrate used for the production of the biosurfactant, the concentrations and microorganisms tested, as shown in figure 7.

Figure 7 – Reduction of mycelial growth in relation to the control.

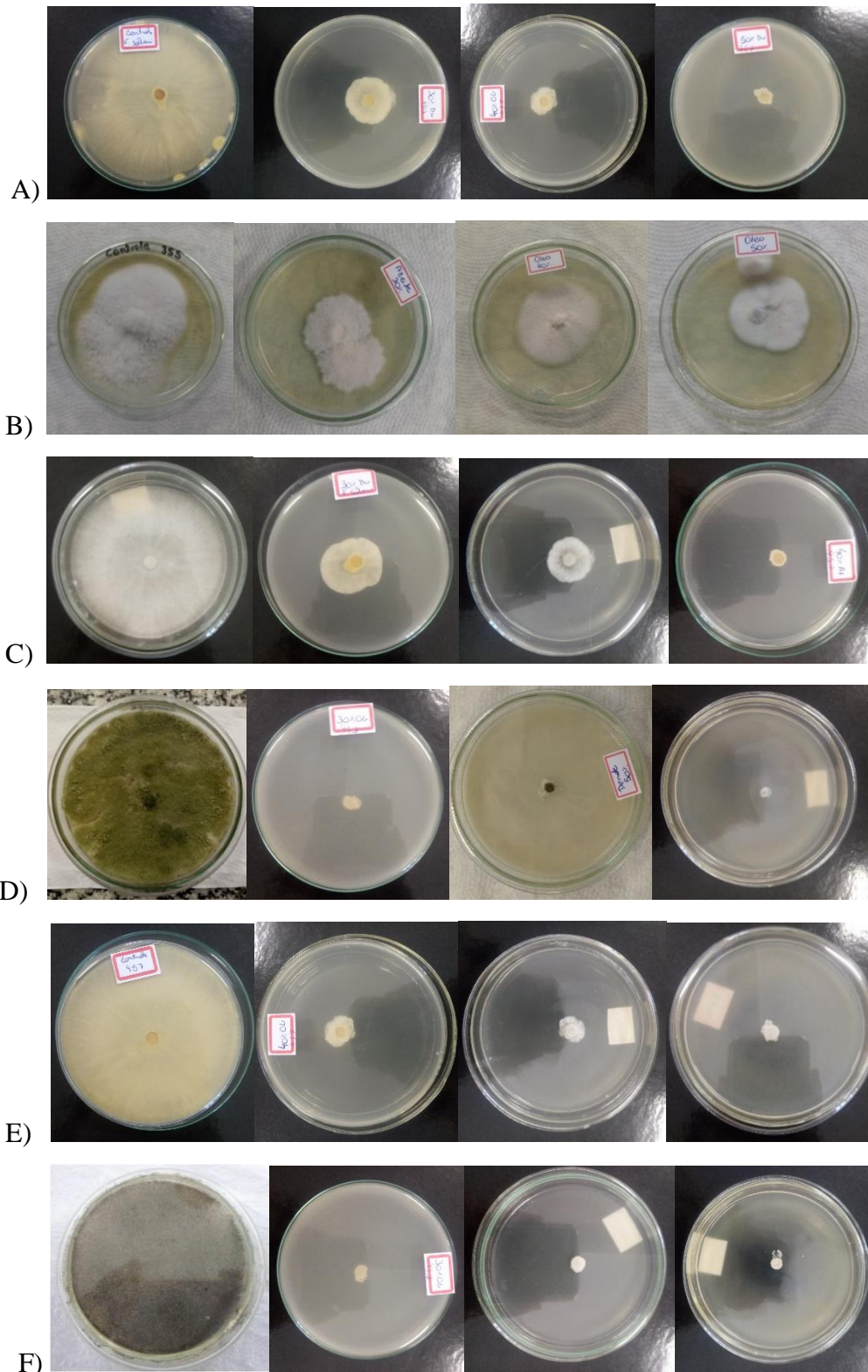


Figure A – *Fusarium solani* fungus and concentrations. Figure B – *Fusarium verticillioides* and concentrations. Figure C – *Cercospora sorghi* and concentrations. Figure D – *Aspergillus flavus* and concentrations. Figure E – *Colletotrichum truncatum* and concentrations. Figure F – *Aspergillus niger* and concentrations.

The biosurfactant presented intense antifungal activity against the fungal strains evaluated, corroborating another study in which the complete inhibition of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* was obtained with the biosurfactant produced by *Enterobacter* sp (JADHAV, et al., 2011). In another work, the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* significantly inhibited the growth of *A. flavus*, showing that purified compounds can inhibit the growth of *A. flavus* in various foods, indicating that biosurfactants have the potential as an additive in food storage (ZHANG, et al., 2008).

The antifungal activity against phytopathogens such as *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria citri* and *Alternaria alternata* was demonstrated by Singh et al, (2014) and can be exploited for the development of microbial biocontrol agents. The radial growth of *F. solani* was affected in the presence of biosurfactant in the work of Mnif, et al (2015), a gradual decrease of the fungi diameter was observed with the increase of the biosurfactant concentration, as observed in the present work.

These results corroborate previous studies that reported biosurfactant antagonist activity against other fungal genera, including *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Phytophthora* and *Macrophomina*, in which growth inhibitions were observed with those presented here (KIM, LEE and HWANG, 2000, NALINI & PARTHASARATHI, 2014, REDDY, et al., 2016). Although the mechanisms responsible for this antifungal activity are not well established, it is presumed that biosurfactants interact with the lipid constituents of biological membranes, disturbing their integrity and permeability, inducing the formation of pores and ion channels (MNIF, et al., 2015). One of the mechanisms proposed for the biological activities of biosurfactants is their interaction with the phospholipid bilayer, which results in a similar effect to the detergent that breaks the plasma membrane (AKIODE, et al., 2016).

The antifungal activity of the biosurfactant isolated against the fungal phytopathogens is also in agreement with the literature (SHA et al., 2012, GOSWAMI, HANDIQUE & DEKA, 2014, BORAH et al., 2015, LAHKAR et al., 2015). Biosurfactants have been reported previously to describe antifungal activity against various phytopathogens, including *Botrytis* sp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum* sp., *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. and *Plasmopara* sp. (VARNIER et al., 2009; KIM et al., 2011; GOSWAMI, HANDIQUE & DEKA, 2014). Apparently, the studies of Goswami, Handique & Deka (2014) have shown that biosurfactants could effectively reduce fungal mycelial growth by demonstrating the fact that biosurfactants may also have an adverse effect on cell structures that are certainly protected by the cell wall.

4 CONCLUSION

The results showed that yeast *W. anomalous* CCMA 0358 was able to produce biosurfactant on different inductive substrates, such as olive oil, soybean oil and olive oil, which was able to inhibit the growth and adhesion of all evaluated bacteria, demonstrating antibacterial capacity up to 100% and antiadhesive, reaching 31% inhibition. In addition, it inhibited the growth of all phytopathogenic fungi and food contaminants used up to 95% in relation to the control. Besides that to promising antimicrobial results, yeast *W. anomalous* is able to produce the biosurfactant from an inexpensive substrate, such as the oil used, which allows a greater possibility of industrial applications due to its low cost. The results obtained suggest the possible use of this biosurfactant as an alternative antimicrobial agent in the in the medical field, food industries and can prevent unwanted contamination of materials, surfaces or food, thus maintaining good sanitation and quality.

REFERÊNCIAS

AHIMOU F, JACQUES P, DELEU M. SURFACTIN & ITURIN. A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 10, p. 749-754, 2000.

AKIYODE, O., GEORGE, D., GETTI, G. & BOATENG, J. Systematic comparison of the functional physico-chemical characteristics and biocidal activity of microbial derived biosurfactants on blood-derived and breast cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 479, p. 221-233, 2016.

AL-REZA, S. M., RAHMAN, A., AHMED, Y., & KANG, S. C. Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 2, p. 86-92, 2010.

ARUTCHELVI, J.I., BHADURI, S., UPPARA, P.V. AND DOBLE, M. Mannosylerythritol lipids: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1559-1570, 2008.

BANAT I.M., DÍAZ DE RIENZO M.A., QUINN G.A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agentes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9915-9929, 2014.

BASIT, M., RASOOL, M. H., NAQVI, S. A. R., WASEEM, M., & ASLAM, B. Biosurfactants production potential of native strains of *Bacillus cereus* and their antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, 2018.

BASSYOUNI, F. A., ABU-BAKR, S. M., HEGAB, K. H., EL-ERAKY, W., AHMED, A., & REHIM, M. E. A. Synthesis of new transition metal complexes of 1H-perimidine derivatives having antimicrobial and anti-inflammatory activities. **Research on Chemical Intermediates**, v. 38, n. 7, p. 1527-1550, 2012.

BENINCASA, M., ABALOS, A., OLIVEIRA, I. AND MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek** 85, 1–8, 2004.

BORAH, S. N., GOSWAMI, D., LAHKAR, J., SARMA, H. K., KHAN, M. R., & DEKA, S. Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* SS14 causes complete suppression of wilt by *Fusarium oxysporum* f. Sp. pisi in *Pisum sativum*. **Biocontrol**, v. 60, n. 3, p. 375-385, 2015.

CAKIR, A., KORDALI, S., ZENGIN, H., IZUMI, S., & HIRATA, T. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, n. 1, p. 62-68, 2004.

DE RIENZO, M. A. D., BANAT, I. M., DOLMAN, B., WINTERBURN, J., & MARTIN, P. J. Sophorolipid biosurfactants: possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 720-726, 2015.

DÍAZ DE RIENZO, M. A., STEVENSON, P., MARCHANT, R., & BANAT, I. M. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 2, p. fnv224, 2016.

ELSHAFIE, A. E., JOSHI, S. J., AL-WAHAIBI, Y. M., AL-BEMANI, A. S., AL-BAHRY, S. N., AL-MAQBALI, D. A., & BANAT, I. M. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1324, 2015.

FALAGAS, M. E.; MAKRIS, G. C. Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. **Journal of Hospital Infection**, v. 71, n. 4, p. 301-306, 2009.

FARIA, N. T., MARQUES, S., FONSECA, C., & FERREIRA, F. C. Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048 T. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 58-65, 2015.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., COELHO, M. A. Z. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

GARG, M., & CHATTERJEE, M. Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*. **Biotechnology Reports**, v. 18, 2018.

GOMAA E.Z. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 259-268, 2013.

GOSWAMI, D., HANDIQUE, P.J., DEKA, S. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari* – the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 548-557, 2014.

GUDIÑA, E. J., FERNANDES, E. C., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. **RSC Advances**, v. 5, n. 110, p. 90960-90968, 2015.

GUDIÑA, E. J., ROCHA, V., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

HAMMAMI, I., RHOUMA, A., JAOUADI, B., REBAI, A., & NESME, X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 253-260, 2009.

HEINEMANN, C., VAN HYLCKAMA, V., JANSSEN, D., BUSSCHER, H.J., VAN DER MEI, H.C. and REID, G. Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n. 1, p. 177-180, 2000.

HENKEL, M., MÜLLER, M.M., KÜGLER, J.H., LOVAGLIOB, R.B., CONTIERO, J., SYLDATK, C., HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1207-1219, 2012.

IHARA - IHARABRAS S.A. Indústrias Químicas. Ficha de informação de segurança de produto químico: CERCOBIN 700 WP. Sorocaba: **IHARABRAS S.A. Indústrias Químicas**, 2018. Acesso em: 16 de Maio de 2018.

JADHAV M., KAGALKAR A., JADHAV S. and GOVINDWAR S. Isolation, characterization, and antifungal application of a biosurfactant produced by *Enterobacter* sp. MS16 2. **European Journal of lipid Science and Technology**, v. 113, n. 11, p. 1347-1356, 2011.

JAŁOWIECKI, Ł., ŻUR, J., CHOJNIAK, J., EJHED, H., & PŁAZA, G. Properties of antibiotic-resistant bacteria isolated from onsite wastewater treatment plant in relation to biofilm formation. **Current Microbiology**, p. 1-11, 2018.

JEMIL N., AYED H.B., MANRESA A., NASRI M. and HEMIDET N. Antioxidant properties, antimicrobial and antiadhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 144, 2017.

KIM, B. S., LEE, J. Y. & HWANG, B. K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. **Pest Management Science**, v. 56, n. 12, p. 1029-1035, 2000.

KIM, S.K., KIM, Y.C., LEE, S., KIM, J.C., YUN, M.Y., KIM, I.S. Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against Green Peach Aphid (*Myzus persicae*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 934-938, 2011.

LAHKAR, J., BORAH, S.N., DEKA, S., AHMED, G. Biosurfactant of *Pseudomonas aeruginosa* JS29 against *Alternaria solani*: the causal organism of early blight of tomato. **BioControl**, v. 60, n. 3, p. 401-411, 2015.

LUNA, J. M., RUFINO, R. D., SARUBBO, L. A., RODRIGUES, L. R., TEIXEIRA, J. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1527-1534, 2011.

MANI, P., DINESHKUMAR, G., JAYASEELAN, T., DEEPALAKSHMI, K., KUMAR, C. G., & BALAN, S. S. Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 163, 2016.

MERGHNI, A., DALLEL, I., NOUMI, E., KADMI, Y., HENTATI, H., TOBJI, S. & MASTOURI, M. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 84-89, 2017.

MNIF I, GHRIBI D. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 13, p. 4310-4320, 2016.

MNIF I., GHRIBI, D. G. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming. **Peptides**, v. 71, p. 100-112, 2015.

MNIF I., HAMMAMI I., TRIKI M. A., AZABOU M. C., ELLOUZE-CHAABOUNI S., GHRIBI D. Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 18137-18147, 2015.

MNIF, I., HAMMAMI, I., TRIKI, M. A., AZABOU, M. C., ELLOUZE-CHAABOUNI, S., & GHRIBI, D. Purification and identification of *Bacillus subtilis*SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 18137-18147, 2015.

NALINI, S. & PARTHASARATHI, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 231-238, 2014.

NASHIDA, J., NISHI, N., TAKAHASHI, Y., HAYASHI, C., IGARASHI, M., TAKAHASHI, D., & TOSHIMA, K. Systematic and stereoselective total synthesis of mannosylerythritol lipids (MELs) and evaluation of their antibacterial activity. **The Journal of Organic Chemistry**, 2018.

NEGM, N., & TAWFIK, S. M. Isoxazolium cationic Schiff base surfactants against pathogenic bacteria. **Chemistry Today**, v. 30, n. 6, 2012.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.; G. VAO. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 252-259, 2007.

REDDY, K. S., KHAN, M. Y., ARCHANA, K., REDDY, M. G. & HAMEEDA, B. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 291-299, 2016.

RIVARDO, F., TURNER, R. J., ALLEGRONE, G., CERI, H., MARTINOTTI, M. G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 541-553, 2009.

RODRIGUES, J., MADHUKAR, A., KUMAR, N., & SANGODKAR, U. M. X. Isolation and Characterization of a marine bacterium belonging to the genus *Alkaligenes* capable of the complete mineralization of the dibenzothiophene. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 40, n. 3, p. 975-1033, 2011.

RODRIGUES, L., BANAT, I. M., TEIXEIRA, J., & OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609-618, 2006.

RODRIGUES, L.R., TEIXEIRA, J.A., VAN DER MEI, H.C. AND OLIVEIRA, R. Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, n. 1, p. 105-112, 2006.

RUFINO, R. D., LUNA, J. M., MARINHO, P. H. C., FARIAS, C. B. B., FERREIRA, S. R. M., & SARUBBO, L. A Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 109, p. 117-122, 2013.

RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SARUBBO, L. A., RODRIGUES, L. R. M., TEIXEIRA, J. A. C., & CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 1-5, 2011.

SAMBANTHAMOORTHY, K., FENG, X., PATEL, R., PATEL, S., PARANAVITANA, C. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 197, 2014.

SATPUTE SK, BANPURKARA AG, BANAT IM, SANGSHETTIC JN, RAJENDRA R, PATILD RR, GADED WN. Multiple roles of biosurfactants in biofilms. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 11, p. 1429-1448, 2016.

SHA, R., JIANG, L., MENG, Q., ZHANG, G. & SONG, Z. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 458-466, 2012.

SINGH, AJAY; VAN HAMME, JONATHAN D.; WARD, OWEN P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

SINGH, P., SRIVASTAVA, B., KUMAR, A., KUMAR, R., DUBEY, N. K., & GUPTA, R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 14, p. 2421-2425, 2008.

SOUZA, K. S. T., GUDIÑA, E. J., SCHWAN, R. F., RODRIGUES, L. R., DIAS, D. R., & TEIXEIRA, J. A. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus*

CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 346, p. 152-158, 2018.

SOUZA, KARLA S. T.; GUDINA, E.; SCHWAN, R. F.; RODRIGUES, L.; DIAS, D. R.; TEIXEIRA, J.A. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, p. 373-382, 2017.

VAN HOUTDT R, MICHELS CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117-1131, 2010.

VARNIER, A.L., SANCHEZ, L., VATSA, P., BOUDESOCQUE, L., GARCIA-BRUGGER, A., RABENOELINA, F., SOROKIN, A., RENAULT, J.H., KAUFFMANN, S., PUGIN, A., CLEMENT, C., BAILLIEUL, F., DOREY, S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 2, p. 178-193, 2009.

ZAKI, M. F., & TAWFIK, S. M. Synthesis, surface properties and antimicrobial activity of some germanium nonionic surfactants. **Journal of Oleo Science**, v. 63, n. 9, p. 921-931, 2014.

ZHANG T., SHI Z., HU L., CHENG L., WANG F. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 783, 2008.

ZHAO, F., ZHOU, J.-D., MA, F., SHI, R.-J., HAN, S.-Q., ZHANG, J., ZHANG, Y. Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H₂S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl: applications for microbial enhanced oil recovery. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 24-30, 2016.