



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

IVISON AMARO DA SILVA

**SOBREMESA FARINÁCEA TIPO *CUPCAKE* UTILIZANDO BIOSSURFACTANTE
COMO EMULSIFICANTE**

Recife
2020

IVISON AMARO DA SILVA

**SOBREMESA FARINÁCEA TIPO *CUPCAKE* UTILIZANDO BIOSSURFACTANTE
COMO EMULSIFICANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Bioquímica e Biologia Celular de Micro-organismos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leonie Asfora Sarubbo

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Moura de Luna

**Recife
2020**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Ivison Amaro da
Sobremesa farinácea tipo *cupcake* utilizando biossurfactante como emulsificante /
Ivison Amaro da Silva. - 2020.

79 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo.

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Moura de Luna.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife,
2020.

Inclui referências.

1. Indústria alimentícia. 2. Resíduos industriais. 3. Candida. I. Sarubbo,
Leonie Asfora (orientadora). II. Luna, Juliana Moura de
(coorientadora). III. Título.

641

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-243

IVISON AMARO DA SILVA

**SOBREMESA FARINCEA TIPO *CUPCAKE* UTILIZANDO BIOSSURFACTANTE
COMO EMULSIFICANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Profa. Dra. Tânia Lúcia de Montenegro Stamford (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Fabíola Carolina Gomes de Almeida (Examinador Externo)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida e por me dar forças e sabedoria para continuar minha caminhada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, um ser iluminado que sempre acredita/acreditou em mim, fornecendo um pouco do seu conhecimento para minha construção como profissional e ser humano. Obrigado por tanto.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Juliana Moura de Luna, que está sempre presente, sempre solicita e gentil, compartilhando de sua trajetória comigo.

À CAPES, pela bolsa concedida neste período do mestrado.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, local onde pude adquirir conhecimentos que sempre estarão comigo.

À Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, por proporcionar a estrutura necessária para realizar uma etapa tão importante do meu projeto.

Ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação – IATI, pelo apoio financeiro e estrutural.

Ao CETENE, pela análise do perfil termoestável do biossurfactante.

Ao técnico Lucas Rocha, do Laboratório de Bioengenharia da UNICAP, por toda ajuda durante o desenvolvimento do projeto; também pela amizade e lanches!

À professora Dra. Jenyffer Campos Guerra, pela realização do estágio docência, onde pude aprender bastante sobre bioquímica dos alimentos e também por ceder espaço em seu laboratório para a caracterização dos cupcakes.

Ao Msc. Bruno Veras pela amizade e análise da atividade antioxidante do biossurfactante.

Ao técnico Camilo, do LEAAL, pela análise de proteínas em um dia não-apropriado.

À professora Dra. Viviane Lansky por ceder espaço nas dependências do LEAAL.

Aos meus colegas da turma BIOTEC 2018.1, por todo apoio durante as disciplinas.

Aos colegas e amigos do Grupo de Pesquisas em Biossurfactantes da UNICAP, pelo apoio, compreensão e amizade.

A todos aqueles que, de alguma forma, direta ou indireta, me ajudaram nesta etapa tão importante da minha formação profissional.

RESUMO

Os biossurfactantes, subprodutos metabólicos de microrganismos, têm despertado grande interesse industrial em função da diversidade de estruturas e produção a partir de fontes renováveis, o que permite a obtenção de produtos com características singulares, resistentes às técnicas de processamento hoje utilizadas nas indústrias alimentícias. Considerando a habilidade de bactérias e leveduras em produzir surfactantes com propriedades emulsificantes, esse trabalho propôs um estudo dirigido para a produção de um biossurfactante por *Candida bombicola* URM 3718 para aplicação como aditivo de sobremesa farinácea tipo *cupcake*. O biossurfactante foi produzido em meio alternativo contendo 5% de melaço de cana, 5% de óleo de soja residual e 3% de milhocina. Após a fermentação, medidas de tensão superficial e interfacial foram realizadas e o biossurfactante isolado foi submetido à determinação da concentração micelar crítica (CMC) e do índice de emulsificação. Em seguida, as emulsões obtidas foram caracterizadas por microscopia de luz e o perfil termoestável e a atividade antioxidante do biossurfactante foram determinados. Na etapa seguinte, o biossurfactante foi incorporado na formulação de sobremesa farinácea tipo *cupcake* substituindo 50%, 75% e 100% da margarina da formulação padrão, sendo as propriedades físicas e análise físico-química determinadas após a cocção. As tensões superficial e interfacial do biossurfactante produzido foram $30,790 \pm 0,04$ mN.m⁻¹ e $0,730 \pm 0,05$ mN.m⁻¹, respectivamente. O rendimento obtido no isolamento foi de 25 g.L⁻¹, enquanto que a CMC foi 0,5 g.L⁻¹. As emulsões (1/2CMC, CMC e 2xCMC) apresentaram resultados satisfatórios em comparação com a goma guar. As microfotografias das emulsões mostraram que o aumento da concentração de biossurfactante diminui as gotículas de óleo, o que está relacionado com a sua estabilidade. A análise térmica mostrou que o biossurfactante é estável à cocção dos cupcakes (180°C), uma vez que não houve perda significativa de massa na temperatura desejável da aplicação. O biossurfactante mostrou-se promissor para aplicação em alimentos pobres de antioxidante e não apresentou potencial citotóxico nas linhagens celulares testadas. Os testes de atividade antimicrobiana demonstraram que o biossurfactante não exibiu atividade antibacteriana frente a patógenos alimentares. Os cupcakes com biossurfactante incorporado em sua massa não apresentaram diferenças significativas nas propriedades físicas e físico-químicas após cocção quando comparados à formulação padrão. Deste modo, o biossurfactante apresenta grande potencial de aplicação na indústria alimentícia como emulsificante de sobremesa farinácea.

Palavras-chave: Biossurfactante; Bioemulsificante; *Candida bombicola*; Resíduos industriais; Indústria de alimentos.

ABSTRACT

Biosurfactants, metabolic by-products from microorganisms, have aroused great industrial interest due to the diversity of structures and production from renewable sources, which allows obtaining products with unique characteristics, resistant to the processing techniques used today in the food industries. Considering the ability of bacteria and yeasts to produce surfactants with emulsifying properties, this work proposed a study directed to the production of a biosurfactant by *Candida bombicola* URM 3718 for application as a cupcake-like meal additive. The biosurfactant was produced in an alternative medium containing 5% sugarcane molasses, 5% residual soybean oil and 3% corn steep liquor. After fermentation, measurements of surface and interfacial tension were performed and the isolated biosurfactant was subjected to the determination of the critical micellar concentration (CMC) and emulsification index. Then, the emulsions obtained were characterized by light microscopy and the thermostable profile and antioxidant activity of the biosurfactant were determined. In the next step, the biosurfactant was incorporated into the cupcake-type meal dessert replacing 50%, 75% and 100% of the margarine in the standard formulation, with the physical properties and physico-chemical analysis determined after cooking. The surface and interfacial tension of the produced biosurfactant were 30.790 ± 0.04 mN.m⁻¹ and 0.730 ± 0.05 mN.m⁻¹, respectively. The yield obtained was 25 g.L⁻¹, while the CMC was 0.5 g.L⁻¹. Emulsions (1/2CMC, CMC and 2xCMC) showed satisfactory results compared to guar gum. The microphotographs of the emulsions showed that increasing the concentration of biosurfactant decreases the oil droplets, which is related to its stability. The thermal analysis showed that the biosurfactant is stable to cooking cupcakes (180°C), since there was no significant loss of mass at the desirable temperature of the application. The biosurfactant proved to be promising for application in antioxidant-poor foods and did not show cytotoxic potential in the tested cell lines. Tests for antimicrobial activity showed that the biosurfactant did not exhibit antibacterial activity against food pathogens. Cupcakes with biosurfactant incorporated in their dough did not show significant differences in physical and physical-chemical properties after cooking when compared to the standard formulation. In this way, the biosurfactant has great potential for application in the food industry as a flour-based emulsifier.

Key-words: Biosurfactant; Bioemulsifier; *Candida bombicola*; Industrial waste; Food industry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – CMC e formação de micelas	21
Figura 2 – Estruturas de biossurfactantes: raminolipídios (A), surfactina (B), soforolipídio (C), trealose lipídio (D), emulsan (E).....	25
Figura 3 – Linhagem não-cancerígena de fibroblastos de camundongo (L929)	48
Figura 4 – Microplaca com células L929 na concentração 10^5 em meio DMEM	48
Figura 5 – CMC do biossurfactante produzido pela <i>Candida bombicola</i> URM 3718	53
Figura 6 – Fotomicrografia das emulsões	57
Figura 7 – TG (azul) e DSC (preto) do biossurfactante produzido pela <i>C. bombicola</i> URM 3718	59
Figura 8 – Atividade antibacteriana do biossurfactante de <i>C. bombicola</i> URM 3718	66
Figura 9 – Cupcakes após a cocção. (A): formulação padrão, 100% margarina; (B): formulação A – 50% margarina, 50% biossurfactante; (C): formulação B – 25% margarina, 75% biossurfactante; (D): formulação C – 100% biossurfactante	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais classes/subclasses de biossurfactantes e respectivas fontes microbianas	24
Tabela 2 – Principais funções e aplicações dos biossurfactantes	28
Tabela 3 – Resíduos industriais utilizados para produção de biossurfactante e seus respectivos micro-organismos produtores e rendimentos.....	32
Tabela 4 – Aditivos utilizados em alimentos.....	34
Tabela 5 – Composição da massa do cupcake	49
Tabela 6 – Índice de emulsificação da goma guar frente aos óleos vegetais	54
Tabela 7 – Índice de emulsificação do biossurfactante frente aos óleos vegetais	55
Tabela 8 – Percentual de sequestro de radicais DPPH (% I) e da capacidade antioxidante total (%CAT) em diferentes concentrações do biossurfactante	60
Tabela 9 – Percentual de sequestro do cátion radical 2',2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS ⁺) pelo biossurfactante.....	62
Tabela 10 – Percentual de viabilidade do biossurfactante de <i>C. bombicola</i> URM 3718 frente a linhagem L929	63
Tabela 11 – Percentual de viabilidade do biossurfactante de <i>C. bombicola</i> URM 3718 frente a linhagem Vero	63
Tabela 12 – Diâmetro (mm) do halo de inibição do biossurfactante frente bactérias patogênicas analisadas.....	65
Tabela 13 – Propriedades físicas dos cupcakes após a cocção.....	67
Tabela 14 – Composição físico-química e valor energético dos biscoitos com (formulação A, B e C) e sem adição de biossurfactante (formulação padrão).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2',2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AMH	Ágar Muller-Hinton
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMC	Concentração Micelar Crítica
DMEM	Meio Basal Eagle Modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilidazil
DSC	Differential Scanning Calorimetry
E24	Índice de Emulsificação após 24h
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Regarded as Safe
YMA	Yeast Mold Agar
YMB	Yeast Mold Broth
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NBT	Tetrazólio nitroazul
PES	Alga Eucheimia Processada
Tc	Temperatura de Cristalização
TG	Termogravimetria
UHT	Ultra High Temperature
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	GERAL	14
2.2	ESPECÍFICOS.....	14
3.1	SURFACTANTES	15
3.2	BIOSURFACTANTES	17
3.3	ADITIVOS ALIMENTARES	28
3.4	APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTE NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	30
3.5	PERSPECTIVAS INDUSTRIAIS.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DO BIOSURFACTANTE.....	36
4.1.1	Micro-organismo produtor do biosurfactante.....	36
4.1.2	Meios de manutenção e crescimento	36
4.1.3	Crescimento do inóculo	36
4.1.4	Meio de produção.....	36
4.1.5	Produção do biosurfactante.....	37
4.1.6	Determinação da tensão superficial e interfacial	37
4.1.7	Isolamento do biosurfactante	37
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO BIOSURFACTANTE.....	37
4.2.1	Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)	37
4.2.2	Atividade de emulsificação.....	38
4.2.3	Microscopia de luz das emulsões	38
4.2.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e análise termogravimétrica	38
4.2.5	Atividade antioxidante	39
4.2.6	Avaliação citotóxica	41
4.2.7	Atividade antibacteriana.....	42

4.3	PREPARO DAS FORMULAÇÕES DOS <i>CUPCAKES</i>	42
4.3.1	Materiais	42
4.3.2	Preparo de massa e cozimento dos <i>cupcakes</i>	43
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS <i>CUPCAKES</i>	44
4.4.1	Propriedades físicas dos <i>cupcakes</i> após cocção	44
4.4.2	Análise físico-química dos <i>cupcakes</i> após cocção	44
4.4.3	pH	44
4.4.4	Determinação do valor energético dos <i>cupcakes</i> após cocção	45
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	AVALIAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO.....	46
5.1.1	Tensão superficial e interfacial	46
5.1.2	Isolamento do biossurfactante	46
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE.....	47
5.2.1	Concentração Micelar Crítica (CMC)	47
5.2.2	Índice de emulsificação (E_{24})	48
5.2.3	Distribuição do tamanho de partículas das emulsões	50
5.2.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)	52
5.2.5	Atividade Antioxidante	54
5.2.6	Avaliação Citotóxica	56
5.2.7	Atividade Antibacteriana	58
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS <i>CUPCAKES</i>	61
5.3.1	Propriedades físicas	61
5.3.2	Análise físico-química	62
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Na era da globalização muitas indústrias clássicas estão sendo inovadas e redirecionadas para novas tecnologias onde a biotecnologia tem um desafio que permite diversas oportunidades de pesquisas sem alterar a produtividade. O rápido desenvolvimento da biotecnologia e o aumento da consciência ambiental entre os produtores e consumidores estão colocando os produtos biológicos na preferência do mercado (CAMPOS et al., 2016; KIELISZEK et al., 2017).

Nesse contexto, destacam-se os aditivos naturais produzidos por micro-organismos e conhecidos como bioemulsificantes, que são surfactantes com excelentes propriedades emulsificantes (CAMPOS et al., 2014). Devido a suas propriedades físico-químicas, os bioemulsificantes constituem um grupo atrativo de compostos com potencial de uso em várias aplicações industriais e biotecnológicas, como aditivos em alimentos, cosméticos e detergentes.

O uso de bioemulsificantes na indústria de alimentos é conferido às propriedades emulsificantes, espumantes, umectantes e solubilizantes, ou seja, podem ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, no controle da aglomeração de glóbulos de gordura, na estabilização de sistemas aerados e para melhorar a consistência de produtos gordurosos (PACWA-PLOCINICZAC et al., 2011; SALEK et al., 2019). A emulsificação é especialmente muito útil na indústria de alimentos na obtenção de emulsões óleo/água. Queijos, sobremesas e sorvetes adquirem textura macia e cremosidade a partir da adição de emulsificantes, que melhoram a estabilidade da massa, textura e volume, controlando a sua consistência e também adicionando sabor pela capacidade de solubilizar óleos aromatizantes nesses preparos (CAMPOS et al., 2013).

A utilização industrial dos biosurfactantes, entretanto, tem sido dificultada em virtude dos altos custos de produção associados à métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos de alto custo. No entanto, estes custos podem ser significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes de baixo custo, bem como através da obtenção de altos rendimentos em produto (SALEK et al., 2019). Por outro lado, a indústria de alimentos ainda não utiliza os bioemulsificantes como aditivos em larga escala. Muitas propriedades dos bioemulsificantes, assim como sua regulamentação para aprovação como novo ingrediente para alimentos necessita de aprovação, o que demanda tempo e investimento industrial.

Devido às mudanças no comportamento dos hábitos alimentares, alimentos prontos para comer, frequentemente disponíveis como pequenas unidades e conhecidos como “snackers”, ganham cada vez mais importância. Exemplos desses produtos estão disponíveis em docerias e

estabelecimentos similares e incluem os chamados *donuts*, *muffins*, *cupcakes* e os *cookies*, originados da cultura anglo-americana e disponíveis em todo o mundo (ZOUARI et al., 2016).

Os *cupcakes* são caracterizados por uma longa vida útil (GUPTA et al., 2011) e têm um grande potencial para se tornar um produto melhorado, fornecendo necessidades dietéticas especiais. Outro aspecto importante no oferecimento de biscoitos com melhor valor nutricional é a preservação dos atributos sensoriais de um produto, levando em conta que a satisfação dos consumidores continua a ser o ponto chave que determina o sucesso de um produto recém formulado (SKRBIC; CVEJANOV, 2011).

Os principais ingredientes em biscoitos incluem farinha, açúcar e gordura. Na verdade, as tendências de alimentação saudável e os progressos crescentes da investigação sobre os aditivos alimentares naturais funcionais têm sido notados, incluindo aqueles que exibem alta atividade antioxidante sem efeitos colaterais comparativamente a compostos sintéticos (BANDYOPADHYAY et al., 2014). Assim, a fim de reduzir o emprego de tensoativos sintéticos na indústria alimentar, o uso de biossurfactantes vem se tornando de grande interesse industrial (CAMPOS et al., 2013).

Dentre os micro-organismos produtores de bioemulsificantes, as leveduras do gênero *Candida* têm sido sugeridas em função de seu uso benéfico em alimentos (BOURDICHON et al., 2012). Uma grande vantagem do uso de leveduras está no seu status GRAS (*Generally Regarded as Safe*), que as classificam como seguras por não apresentarem riscos de toxicidade e patogenicidade, permitindo sua utilização na indústria de alimentos (CAMPOS et al., 2014). Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a adição de biossurfactante com capacidade emulsificante em substituição à gordura utilizada em *cupcakes* com vistas ao fornecimento de um produto mais biocompatível para as indústrias de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o biossurfactante produzido por *Candida bombicola* URM 3718 na formulação de sobremesa farinácea (*cupcake*) em substituição à gordura vegetal.

2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir o biossurfactante de *C. bombicola* utilizando resíduo industrial em condições previamente estabelecidas.
- Isolar o biossurfactante utilizando um método alternativo de baixo custo.
- Determinar as propriedades surfactantes e emulsificantes do biossurfactante.
- Estabelecer o potencial antioxidante e a estabilidade térmica do biossurfactante.
- Avaliar a citotoxicidade e atividade antimicrobiana do biossurfactante.
- Formular *cupcakes* com diferentes concentrações de biossurfactante em substituição à gordura vegetal.
- Verificar as características físicas e físico-químicas dos *cupcakes* produzidos.
- Determinar o valor energético dos *cupcakes* com e sem adição do biossurfactante.

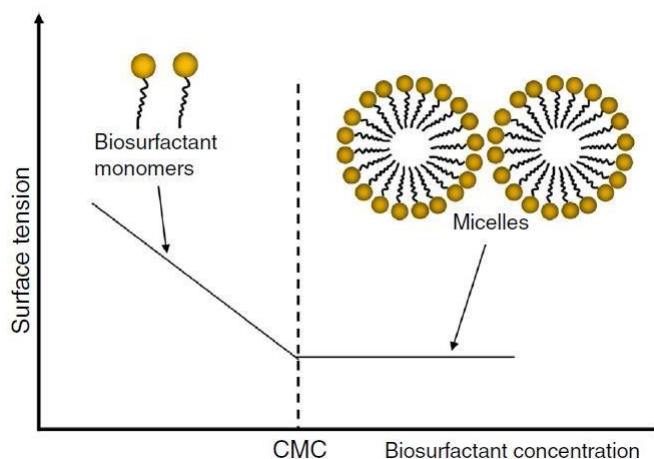
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos químicos constituídos por moléculas anfipáticas, atraídos pelas fases hidrofílica e hidrofóbica que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas que possuem diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água. Eles podem ser divididos com base em suas respectivas cargas de superfície, onde são encontrados três grupos principais – aniônicos, catiônicos e não-iônicos, além da natureza anfotérica (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018; SANTOS et al., 2016; CAMPOS et al., 2013).

O termo surfactante é uma palavra derivada da contração de “*surface active agent*”, que significa, literalmente, agente de atividade superficial, caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. Estas características permitem aos surfactantes formar microemulsões onde óleos possam se solubilizar em água ou vice-versa (NGUYEN et al., 2010). Tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo emulsificação, detergência, capacidade espumante, lubrificação, capacidade umectante, solubilização e dispersão de fases (SANTOS et al. 2016).

A propriedade de maior importância para os agentes tensoativos é a tensão superficial, que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante do meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna. A concentração destas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (Figura 1) (CAMPOS et al., 2016; 2013).

Figura 1. CMC e formação de micelas

FONTE: AKBARI,2018.

A CMC é um dos índices mais utilizados para avaliação da atividade surfactante podendo ser definida, também, como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa. A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (SANTOS et al., 2016).

Devido à estas características, vários setores demandam compostos com estas características como: petróleo, petroquímica, alimentos, bebidas, farmacêutico, cosméticos, mineração, metalúrgico, agroquímico, fertilizantes, ambiental, papel, celulose, entre outros. A utilização dos surfactantes se concentra nas indústrias de produtos de limpeza (sabões e detergentes), alimentos, petróleo, cosméticos e produtos de higiene. A produção mundial de surfactante excede 3 milhões de toneladas por ano, sendo a maioria utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico (ALMEIDA et al., 2016).

A maioria dos mercados de produção de surfactantes utiliza petroderivados para obtenção dos produtos, além disso uma grande quantidade de produtos que são consumidos no cotidiano provém do petróleo, tornando-o fonte única de energia. Para tal, é importante que haja um aumento na produção do petróleo, o que acarreta um aumento nos efeitos ambientais e econômicos negativos (AKBARI, 2018).

Neste contexto, a busca por agentes tensoativos menos agressivos ao meio ambiente, impulsionada por novas legislações, tem resultado em um maior interesse pela obtenção de surfactantes biologicamente produzidos, os biossurfactantes, que são uma opção ambientalmente amigável frente aos sintetizados quimicamente, uma vez que a grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é quimicamente sintetizada, representando,

atualmente nos países industrializados, 70-75% dos surfactantes consumidos de origem petroquímica. Esta tendência é movida pela necessidade de criação de produtos mais brandos, para a substituição de compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados), como também aumentar a especificidade de produtos. Dentre as vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes químicos, destacam-se a sua obtenção a partir de fontes renováveis, biodegradabilidade, menor concentração micelar crítica (CMC), baixa toxicidade, além da atividade sob condições adversas (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018; CAMPOS et al., 2016; 2013; RAHMAN; GAKPE, 2008).

3.2 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes microbianos são moléculas naturais de natureza anfifílica. Assim como os surfactantes, suas moléculas consistem em uma porção polar e uma porção apolar. Eles podem ser produzidos por diversos micro-organismos, entre eles bactérias, fungos filamentosos e leveduras, com diferentes estruturas moleculares e atividades de superfície. Em relação a carga das moléculas, eles podem apresentar natureza aniônica ou neutra e os que contêm grupo amina são catiônicos (BEZERRA et al., 2018; ROCHA E SILVA et al., 2018).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os biossurfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular promove a redução da tensão superficial e interfacial. Esta propriedade faz os biossurfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais (CAMPOS et al., 2013).

A utilização de técnicas para obtenção de surfactantes a partir de micro-organismos representa um elevado interesse no campo aplicado. Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizadas por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até micro-organismos (glicolipídios) e também no organismo humano (saís biliares), sendo considerados surfactantes naturais (SATPUTE et al., 2010).

Diversos produtos microbiológicos com propriedades surfactantes foram identificados no passado. Entre os diversos micro-organismos estudados para a produção de biossurfactantes estão o *Arthrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Candida lipolytica* e *Torulopsis bombicola* (CAMPOS et al., 2013).

3.2.1 Classificação

Os principais critérios de classificação dos biossurfactantes microbianos são a sua composição química e a fonte microbiana produtora do composto. As principais classes são lipopeptídios, fosfolipídios, glicolipídios, surfactantes poliméricos, particulados e ácidos graxos. Os biossurfactantes de alto peso molecular incluem polissacarídeos, proteínas, lipoproteínas e lipopolissacarídeos, enquanto que os biossurfactantes de baixo peso molecular incluem glicolipídios, lipopeptídios e fosfolipídios (BEZERRA et al., 2018; VANDANA; SINGH, 2018).

A maioria dos biossurfactantes microbianos é de natureza glicolipídica, onde em sua estrutura encontra-se carboidratos combinados a um ácido graxo de cadeia longa por meio de ligação glicosídica. Da classe dos glicolipídios, os ramnolipídios, trealolipídios e soforolipídios são os mais investigados e relatados. Os raminolipídios, comumente oriundos de *P. aeruginosa*, em seus primeiros estudos foram descritos como um composto do metabólito extracelular da bactéria do patógeno oportunista *P. aeruginosa*. Esses glicolipídios têm em sua estrutura raminose ligada a ácido hidroxil decanóico. Os trealolipídios são constituídos por dissacarídeos de trealose ligados ao ácido micólico (ácido β -hidroxicarboxílico de cadeia longa). Eles são caracterizados por possuir alta diversidade estrutural e estão associados com espécies de *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium*. Os soforolipídios são produzidos por leveduras, sua estrutura possui uma molécula de soforose associada a um ácido graxo hidroxílico de cadeia longa unidos por uma ligação glicosídica (ROCHA E SILVA et al., 2018; VANDANA; SINGH, 2018; WILLIAMS; TRINDADE, 2017).

Os lipopeptídios e fosfolipídios também são um grupo de biossurfactantes microbianos comumente estudados, tendo os lipopeptídios como maior destaque. A bactéria *Bacillus subtilis* produz surfactina, que é o lipopeptídio mais importante e um dos mais potentes biossurfactantes relatados. *B. licheniformis* também produz biossurfactantes, sendo muitos semelhantes à surfactina. Os fosfolipídios são uma classe importante dos glicolipídios. Eles são produzidos principalmente por leveduras do gênero *Candida*, porém bactérias também os sintetizam (KACZOREK et al., 2018; ROCHA E SILVA et al., 2018).

Dentre os biossurfactantes poliméricos, emulsan, biodispersan, liposan e alasan têm destaque. Eles podem ser produzidos por bactérias e leveduras do gênero *Candida* (VANDANA; SINGH, 2018). A aplicação de liposan como emulsificante na indústria de alimentos é discutida na literatura (CHAKRABARTI, 2012).

A Tabela 1 apresenta as principais classes de biossurfactantes e respectivas fontes microbianas e a figura 2 apresenta alguns exemplos de estruturas de biossurfactantes.

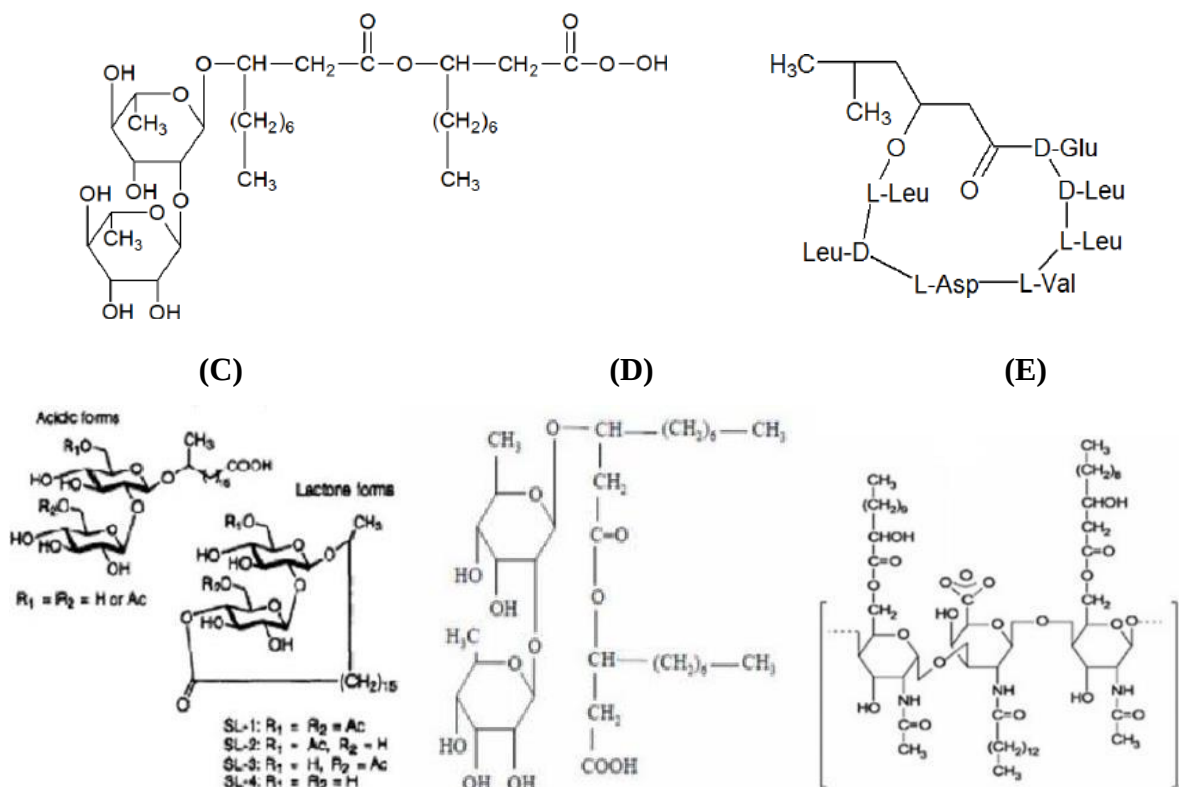
Tabela 1. Principais classes/subclasses de biossurfactantes e respectivas fontes microbianas

Classe	Subclasse	Fonte microbiana	Referência
Glicolipídios	Raminolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ehinmitola et al., 2018, Sodagari et al., 2017
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	Silva et al., 2014
		<i>Lysinibacillus sphaerica</i>	Gaur et al., 2019
	Trealolipídios	<i>Rhodococcus sp.</i>	Bages et al., 2018
		<i>Nocardia farcinica</i>	Christava et al., 2015
	Soforolipídios	<i>Candida bombicola</i>	Solaiman et al., 2017, Dolman et al., 2016
		<i>Starmerella bombicola</i>	Liu et al., 2019, Jiménez-Peñalver et al., 2018
		<i>Candida sphaerica</i>	Luna et al., 2011
		<i>Candida magnolia</i>	
		<i>Torulopsis petrophilum</i>	Kaczorek et al., 2018
Lipopeptídeos	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Datta et al., 2018
		<i>Kocuria marina</i>	Sarafin et al., 2014
	Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>	Coronel-León et al., 2015
Fosfolipídios		<i>Pseudomonas putida</i>	Janek et al., 2013
		<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Vandanda; Singh, 2018
Biossurfactantes poliméricos	Rufisan	<i>Candida lipolytica</i>	Rufino et al., 2013
	Liposan		Vandanda; Singh, 2018
	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoceticus</i>	Vandanda; Singh, 2018
	Biodispersan		
	Alasan		

Figura 2. Estruturas de biossurfactantes: raminolipídio (A), surfactina (B), soforolipídio (C), trealose lipídio (D), emulsan (E)

(A)

(B)



FONTE: KACZOREK et al., 2018 (A) e (B). MNIF; ELLOUZ-CHAABOUNI; GHRIBI, 2017 (C). SALIHU; ABDULKADIR; ALMUSTAPHA, 2009 (D) e (E).

3.2.2 Micro-organismos produtores

Uma variedade de micro-organismos é capaz de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares. A maioria dos biossurfactantes conhecidos é produzida em substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, embora muitos tenham sido obtidos a partir de substratos solúveis ou pela combinação destes, sendo este metabólico secundário produzido na fase estacionária do crescimento microbiano (VARJANI; UPASANI, 2017; VAN-HAMME et al., 2006).

As bactérias são as maiores responsáveis pela produção dos biossurfactantes com relatos que datam de 1949 onde foi descoberta a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis*, o qual foi denominado surfactina, como descrito anteriormente (BARROS et al., 2007). A surfactina, produzida por espécies de *Bacillus*, é considerada um dos biossurfactantes mais poderosos, pois em concentrações menores que 0,5% é capaz de reduzir eficientemente a tensão superficial. Além do *Bacillus*, as bactérias do gênero *Pseudomonas*

são descritas na literatura como grandes produtoras de biossurfactantes (SILVA et al., 2017; CHAPRÃO et al., 2015).

Dentre as leveduras, representantes do gênero *Candida* (Classe *Deuteromycetes*, Ordem *Saccharomycetales*), têm sido utilizados na emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos, facilitando o crescimento do micro-organismo nestes substratos, através da produção de biossurfactantes. Essas substâncias de origem microbiana têm atraído grande atenção devido às suas características de biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e habilidade de serem produzidas a partir de fontes renováveis e de baixo custo (SANTOS et al., 2017; LUNA et al., 2016; CAMPOS et al., 2015; RUFINO et al., 2008; SOBRINHO et al., 2008)

Além da *Candida*, a *Yarrowia* também está entre as leveduras estudadas para produção de emulsificadores. Ambas, têm sido largamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biossurfactantes. Uma grande vantagem do uso de leveduras está o status GRAS (Generally Regarded as Safe), os quais não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, permitindo sua utilização na indústria de alimentos. Alguns exemplos destes micro-organismos são: *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida lipolytica* e *Candida utilis* (SOUZA et al., 2017; CAMPOS et al., 2015; ELSHAFIE et al., 2015; FONTES et al., 2008).

Bacillus amyloliquefaciens e outros membros do grupo do *Bacillus subtilis* são considerados como seguros. Alguns produtos celulares de linhagens de *Bacillus* possuem o status 'GRAS'. Alguns casos podem ser citados, como a preparação enzimática de pectato-liase de *Bacillus subtilis* (GRAS nº 114), α -amilase derivada de *Bacillus licheniformis* (GRAS nº 79) e pululanase de *Bacillus licheniformis* (GRAS nº 72). Entretanto, existem relatos que *B. subtilis* e *B. licheniformis* parecem estar implicados em alguns casos de envenenamentos por alimentos (BARROS et al., 2007).

A *Candida lipolytica* vem sendo utilizada com sucesso devido ao potencial em produzir biopolímeros com alta atividade de emulsificação utilizando substratos regionais como fonte de carbono (SARUBBO et al., 2001; 1999).

Biossurfactantes derivados de fungos filamentosos também têm sido descritos. Entre eles podem ser citados: *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 (PELE et al., 2018), *Aspergillus sp.* RFC-1 (AL-HAWASH et al., 2018), *Aspergillus ustus* MSF3 (KIRAN et al., 2009), *Fusarium fujikuroi* (REIS et al., 2018) e *Penicillium* 8CC2 (SENA et al., 2018).

3.2.3 Propriedades e aplicações

A produção mundial de surfactantes somou 17 milhões de toneladas em 2000, esperando-se um aumento da ordem de 3-4% ao ano. Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicação em vários processos industriais, além da possibilidade de novas aplicações para estas biomoléculas. Acredita-se que os biossurfactantes ficarão conhecidos como “materiais multifuncionais” do novo século (ALMEIDA et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

Os biossurfactantes ocupam uma posição química especial, pois podem ser aplicados em diversas áreas, como o aumento da recuperação de óleos, auxiliando na biodegradação de poluentes insolúveis em água e do material processado nas indústrias alimentícias (MONTEIRO et al., 2010; PACHECO et al., 2010).

Os biossurfactantes são mais utilizados na indústria petrolífera, onde participam no processo de extração de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Devido à propriedade dos biossurfactantes interagirem na superfície óleo/água, são utilizados na biorremediação de águas e solos com a emulsificação e dispersão de hidrocarbonetos em água, aumentando a degradação destes compostos no ambiente. Outras aplicações envolvem a dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e recuperação terciária de petróleo (MEOR- *microbial enhanced oil recovery*) (ALMEIDA et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

Wolf e Gan (2018) aplicaram biossurfactante para a mineralização de [14C]pireno em solo utilizando um biossurfactante tipo raminolipídio. Bastrzyk et al. (2019) estudaram a aplicação de um biossurfactante lipopeptídeo produzidos por *Bacillus* sp. para precipitação de cálcio. Martins e Martins (2018) produziram biossurfactantes com as bactérias *Corynebacterium aquaticum* e *Corynebacterium* spp. CCT 1968 com potencial para remoção de tinta insolúvel. Cameotra e Makkar (1998) aplicaram biossurfactantes para a solubilização parcial do carvão utilizando uma preparação de biossurfactante produzido por *Candida bombicola*. Mulligan (2005) utilizou surfactina, raminolipídios e soforolipídios em experimentos para remoção de metais pesados de sedimentos. Algumas outras aplicações dos biossurfactantes também foram relatadas, como na indústria de papel, em indústrias têxteis, de cerâmica e no processamento de urânio (DELEU; PAQUOT, 2004). Muitos produtos necessitam de surfactantes em seus ingredientes, incluindo repelentes de insetos, antiácidos, soluções para lentes de contato, desodorantes, produtos para unhas, pastas de dentes, etc. (MAIER; SOBERON-CHAVEZ, 2000).

Processos industriais e ambientais frequentemente estão associados a condições de extremas de temperatura, pH, força iônica e para que o uso do surfactante seja viabilizado são necessários estudos de estabilidade nestas condições (SANTOS et al., 2016). Além destas aplicações, os biossurfactantes são utilizados em diversos tipos de indústrias, que estão resumidas na tabela 1.

Tabela 2. Principais funções e aplicações dos biossurfactantes

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e higiene
Agentes umectantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo

Fonte: CAMPOS et al., 2013

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes, que se atrelam como vantagens aos surfactantes convencionais, tais como (SANTOS et al., 2016):

- **atividade superficial e interfacial:** os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial a menores concentrações;

- **tolerância à temperatura, pH e força iônica:** muitos biossurfactantes podem ser utilizados sob condições extremas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2, por exemplo, é estável a temperaturas em torno de 75°C, por até 140 horas e pHs entre 5 e 12. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de sal, enquanto que 2% de NaCl são suficientes para inativar surfactantes convencionais;

- **biodegradabilidade:** os biossurfactantes são facilmente degradados por bactérias e outros micro-organismos microscópicos na água e solo, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos;
- **toxicidade reduzida:** os biossurfactantes têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, favorecendo o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos;
- **disponibilidade:** biossurfactante podem ser produzidos a partir de matérias-primas largamente disponíveis, além da possibilidade de serem produzidos a partir de resíduos industriais;
- **especificidade:** biossurfactantes, sendo moléculas orgânicas complexas com grupos funcionais específicos também serão específicos em suas ações. Essa propriedade pode ser de grande interesse da detoxificação de poluentes específicos ou em determinadas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética ou alimentícia;
- **biocompatibilidade e digestibilidade,** o que garante a aplicação dessas biomoléculas nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.

Muitos surfactantes lipopeptídicos possuem atividades antibióticas potentes e foram submetidos a diversos estudos na descoberta de novos antibióticos. Além destas funções, os biossurfactantes desempenham funções fisiológicas, ainda de mecanismo não totalmente esclarecido, mas com funções atribuídas a transporte de hidrocarbonetos, aderência/liberação da célula de superfícies, atividade antimicrobiana, antioxidante, antiproliferante e antibiofilme (YULIANI et al., 2018; ELSHIKH et al., 2017; MERGHNI et al., 2017; NITSCHKE et al., 2004).

3.2.4 Utilização de resíduos industriais na produção de biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser aplicados em uma variedade de processos industriais. Porém, do ponto de vista econômico, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes químicos, devido principalmente ao seu alto custo. Entretanto, com o aumento da preocupação

ambiental, há a necessidade de desenvolvimento de biossurfactantes como alternativa aos produtos existentes (SANTOS et al., 2016).

A maioria dos biossurfactantes conhecidos é produzida em substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, embora muitos tenham sido obtidos a partir de substratos solúveis. O processo de fermentação possui a ferramenta para reduzir os custos do processo fermentativo (SANTOS et al., 2016).

A possibilidade de produção dos biossurfactantes a partir de substratos renováveis e de diferentes espécies microbianas, além da possibilidade de variação de inúmeros parâmetros culturais como tempo de cultivo, velocidade de agitação, pH do meio e nutrientes adicionados, permite a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência, embora os custos de produção ainda não permitam uma maior competitividade com os similares sintéticos (CAMPOS et al., 2013).

O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo, como resíduos agroindustriais. O principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos envolve a seleção de um substrato que contenha um balanço correto de nutrientes que suportem tanto o crescimento celular quanto a produção do composto de interesse (CAMPOS et al., 2013).

Considerando que o Brasil é um país essencialmente agrícola, a disponibilidade de quantidade e facilidade de acesso aos subprodutos agroindustriais é bastante significativa. A recuperação e concentração de biossurfactante do meio de cultura é que vão determinar a viabilidade de produção em grande escala. Geralmente a baixa concentração e a estrutura do biossurfactante limitam a extração (SARUBBO et al., 2015). Nesse sentido, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias que permitam a produção e consequente aplicação dos biossurfactantes em escala industrial. Os substratos de baixo custo, a seleção de micro-organismos superprodutores e o aprimoramento dos processos de produção e purificação têm sido utilizados com essa finalidade.

Uma possível solução seria o uso de subprodutos industriais, a exemplo, a borra residual da indústria de óleos vegetais. O glicerol, um produto obtido de muitos processos industriais, como por exemplo na produção do biodiesel, é gerado em grandes quantidades e podem ser utilizados como fonte de carbono, reduzindo os custos de produção. Adicionalmente, a manipulação da composição do meio de cultura, também pode permitir o aumento da produtividade, otimizando, desta forma, as condições de cultivo (SANTOS et al., 2016).

Milhões de toneladas de resíduos industriais são gerados e rejeitados no meio ambiente todos os anos podendo, na grande maioria das vezes serem reutilizados. Pesquisas visando selecionar substratos adequados e de baixo custo para a produção de biossurfactantes, destacam os resíduos agroindustriais, como os do processamento dos óleos de soja, milho, coco, amendoim e canola, gorduras animais, açúcar da beterraba, sorgo, casca de soja, bagaço de cana-de-açúcar e resíduos do processamento de algumas frutas como maçã, banana, abacaxi, resíduos da indústria de laticínios (soro de leite), melaço de cana, glicerina e manipueira. Os óleos vegetais, efluentes industriais, resíduos de indústrias de processamento de batatas e resíduos gordurosos de frango têm sido mencionados (SANTOS et al., 2016).

A seleção do substrato depende da escolha de um resíduo com um certo balanço de nutrientes para crescimento e produção. Os resíduos industriais com elevado teor de carboidratos e lipídios encontrados são elementos necessários para o uso como substratos para produção de biossurfactantes (SILVA et al., 2014; SARUBBO et al., 2015).

Neste contexto, a produção de biossurfactante por micro-organismos a partir de resíduos industriais, representa uma alternativa para a produção de biopolímeros com atividade de emulsificação, possibilitando aplicações futuras no controle da poluição causada por petróleo e derivados, em ecossistemas terrestres e aquáticos. Assim, as concentrações ideais de substratos são estabelecidas através de planejamentos fatoriais, visando minimizar os altos custos de produção. Sabe-se também que, atualmente, muitos estudos têm sido realizados na seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes para as indústrias alimentícias e petroquímicas. Estudos estão sendo também direcionados para o desenvolvimento de tecnologias buscando melhorar as linhagens e processos de produção, devido à vasta aplicabilidade dos biossurfactantes como por exemplo, na indústria alimentícia, onde podem ser aplicados como aditivos em formulações de emulsificantes (CAMPOS et al., 2013).

Na literatura, tem-se encontrado cada vez mais trabalhos com a utilização de resíduos industriais para a produção de biossurfactante. Na perspectiva industrial para a produção em larga escala é de extrema importância, pois viabiliza as grandes produções do biocomposto, além da perspectiva ambiental, como citado anteriormente, favorecendo o meio ambiente, uma vez que grandes quantidades de resíduos são impedidas de entrar em contato com o meio ambiente. A tabela 3 mostra um levantamento recente da utilização de resíduos industriais para produção de biossurfactante.

Tabela 3. Resíduos industriais utilizados para produção de biossurfactante e seus respectivos micro-organismo produtor e rendimentos

Resíduos industriais	Micro-organismo produtor	Rendimento (g/L)	Referência
Glicerol bruto	<i>Bacillus</i> sp.	2,8	RULLI et al., 2019
Águas residuais de fábrica de óleo, milhocina e melaço de cana-de-açúcar	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> #112	5,1	GUDIÑA et al., 2016
Cascas de batata e bagaço de cana-de-açúcar	<i>Pseudomonas azotoformans</i> AJ15	1,16	DAS; KUMAR, 2018
Óleo de soja residual e milhocina	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA1566	1,9	SANTOS et al., 2019
Óleo de girassol residual	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RHNK 22	0,8	KUMAR, et al., 2017
Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana	<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i> UFMG-CM-Y6148	0,167	MARCELINO et al., 2019
Resíduo de óleo vegetal e milhocina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCP0992	26	SILVA et al., 2018
Milhocina	<i>Candida lipolytica</i> UCP0988	40	SANTOS et al., 2017
Óleo de canola residual e milhocina	<i>Pseudomonas cepacia</i> CCT6659	8	SILVA et al., 2017
Vinhaça	<i>Bacillus pumilus</i> CCT 2487	27,7	OLIVEIRA; GARCIA-CRUZ, 2013

Suco de maçã de caju clarificado	<i>Bacillus subtilis</i> LAMI005	0,3193	OLIVEIRA et al., 2013
-------------------------------------	-------------------------------------	--------	-----------------------

3.3 ADITIVOS ALIMENTARES

Os avanços da indústria alimentícia no século XXI permitiram cada vez a manipulação de alimentos, bem como o emprego de aditivos alimentares em suas composições, favorecendo as grandes produções de alimentos de sabor agradável, motivo pelo qual o desenvolvimento e uso de aditivos tem ganhado destaque. Esse fator decorre também da mudança no estilo de vida das pessoas nas últimas décadas, que promoveu a transformação dos hábitos alimentares, levando as indústrias a formular produtos alimentícios com alteração consideráveis, envolvendo a incorporação de ingredientes adicionais aos produtos alimentícios (ONAO LAPO; ONAO LAPO, 2018).

Esses ingredientes adicionais são os mencionados anteriormente como aditivos alimentares, que são segundo a World Health Organization (WHO, 2018), substâncias adicionadas aos alimentos para manter ou melhorar a segurança, a frescura, o sabor, a textura ou a aparência dos alimentos. Muitos aditivos alimentares diferentes foram desenvolvidos ao longo do tempo para atender às necessidades da produção de alimentos, já que fazer alimentos em larga escala é muito diferente de fazê-los em pequena escala em casa. São necessários aditivos para garantir que os alimentos processados permaneçam seguros e em bom estado durante toda a sua jornada, desde fábricas ou cozinhas industriais, durante o transporte até armazéns e lojas e, finalmente, aos consumidores. Os aditivos alimentares podem ser derivados de plantas, animais ou minerais, ou podem ser sintéticos. Eles são adicionados intencionalmente à comida para realizar certos fins tecnológicos que os consumidores geralmente aceitam como certos. Existem vários milhares de aditivos alimentares usados, todos os quais são projetados para fazer um trabalho específico em tornar os alimentos mais seguros ou mais atraentes.

Dentre os princípios fundamentais de uso de aditivos, a segurança é primordial, considerando que é indispensável a adoção de procedimentos necessários para a obtenção de alimentos inócuos, saudáveis e sãos. Desta forma, antes de ser autorizado para uso, o aditivo deve ser submetido a uma adequada avaliação toxicológica, levando-se em conta, dentre outros aspectos, qualquer efeito acumulativo, sinérgico, e de proteção, decorrente de seu uso (BRASIL, 1997; 2002).

No Brasil, a responsabilidade pela autorização do uso dos aditivos alimentares nas indústrias alimentícias, bem como a inspeção desses alimentos é da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018).

A Tabela 4 lista os aditivos permitidos atualmente e suas propriedades nas categorias conferidas aos alimentos.

Tabela 4. Aditivos utilizados em alimentos

INS	NOME DO ADITIVO	FUNÇÃO
407a	Alga Euchema processada (PES)	espessante / estabilizante/ gelificante
417	Goma Tara	espessante / estabilizante
418	Goma gelana	espessante / estabilizante/ gelificante
440	Pectina	espessante / estabilizante/ gelificante
460 ii	Celulose em pó	antiumectante / emulsificante/ espessante / agente de corpo
461	Metilcelulose	espessante/ estabilizante
462	Etilcelulose	emulsificante / espessante/ estabilizante / agente de corpo
464	Hidroxipropilmetilcelulose	emulsificante / espessante/ estabilizante
466	Carboximetilcelulose sódica	Espessante
467	Etilhidroxietilcelulose	emulsificante / espessante/ estabilizante

Fonte: CAMPOS et al., 2013

O monoestearato de glicerila e a carboximetilcelulose são emulsificantes sintéticos largamente empregados nas indústrias de alimentos. Embora sejam extremamente eficientes, esses aditivos têm sofrido restrições, especialmente por parte dos consumidores, em função das exigências de redução do uso de aditivos “artificiais” ou quimicamente sintetizados em alimentos. Consequentemente, a consciência cada vez maior dos consumidores tem levado ao aumento da demanda por aditivos e ingredientes mais naturais (CAMPOS et al., 2013).

Os emulsificantes são ingredientes indispensáveis na maioria dos alimentos contendo óleos e gorduras. Entretanto, seu uso se estende para outras áreas. Os emulsificantes pertencem a classe geral de compostos chamados de agentes surfactantes, atuando como um produto que facilita a formação de uma emulsão devido a sua capacidade de redução de tensão interfacial

entre duas fases distintas e que numa etapa subsequente, estabiliza a emulsão formada (CAMPOS et al., 2013).

Desta forma, os emulsificantes tornam-se indispensáveis na indústria de alimentos onde espumas e emulsões, especialmente emulsões de água e óleo, são frequentemente utilizadas. As funções mais importantes em sistemas alimentares são, além da redução na tensão superficial na interface óleo-água e estabilização da emulsão, controlar a aglomeração de glóbulos de gordura, melhorar a textura e aumentar a vida de prateleira (CAMPOS et al., 2016).

3.4 APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Os surfactantes quimicamente sintetizados têm sido usados em muitas formulações de alimentos. Os biossurfactantes não ficam atrás, eles também têm sido utilizados, como exemplo temos a lecitina e algumas proteínas sendo utilizada em molhos e cremes para saladas e glacê de bolo. No entanto, uma vez que os surfactantes quimicamente sintetizados possuem alta toxicidade, os biossurfactantes têm ganhado destaque por sua natureza biodegradável e baixa toxicidade, sendo cada vez mais recomendados como novos aditivos funcionais para a indústria de alimentos. (SHARMA, 2016).

E essa consciência crescente pela substituição de produtos sintéticos por produto naturais atinge os consumidores que exigem que haja a substituição de produtos mais nocivos por produtos menos nocivos e que atendam as mesmas exigências. Nesse contexto, os biossurfactantes atuam de forma muito importante como emulsificante e a combinação particular dessa característica com atividades antibiofilme, antimicrobianas e antioxidantes apresentadas pelo biocomposto sugere sua aplicação como aditivo alimentar na formulação de alimentos (RANASALVA; SUNIL; POOVARASAN, 2014).

Nas formulações de produtos de padaria e sorvetes, por exemplo, os biossurfactantes atuam como agentes durante a cocção de gorduras e óleos, além disso controlam a consistência, o que faz com que prolongue a vida útil do produto, além de solubilizar óleos aromáticos. Surfactantes do tipo ramnilipídio ajudam na melhoria da estabilidade da massa, volume, textura e conservação de produtos de panificação (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

Mnif et al., (2012) mostraram que a suplementação de bioemulsificante SPB1 de *B. subtilis* melhorou significativamente o perfil de textura do pão, principalmente a uma concentração de 0,075% (p/p) e reduziu a sensibilidade do pão à proliferação microbiana.

Saccharomyces cerevisiae produz uma manoproteína capaz de estabilizar emulsões água/óleo para produção de maionese, biscoitos, sorvetes, entre outros (BENTO; GAYLARDE

1996). O uso de glicolipídios produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para melhorar as propriedades da manteiga, de croissants e de produtos de confeitaria congelados também já foi reportado (CALVO et al., 2009). Um biossurfactante de *C. utilis* demonstrou adequação como emulsificante em molhos para saladas (CAMPOS et al., 2014; 2015). Zouari et al. (2016), utilizaram biossurfactante isolado de *B. subtilis* para formulação de biscoitos de farinha de gergelim.

3.4.1 Biossurfactante como conservantes alimentares

3.4.1.1 Biossurfactantes como agentes emulsificantes

A emulsificação tem um papel na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas, especialmente quando se consegue estabilidade, sem adição de aditivos sintéticos, por tempo superior a 100 dias sem separação de fases. De forma geral, a função dos emulsificantes em alimentos é promover a estabilidade da emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados (SATPUTE; ZINJARDE; BANAT, 2018; RADHAKRISHNAN et al., 2011; PATINO et al., 2008).

Por definição, uma emulsão é um sistema heterogêneo, consistindo de ao menos um líquido imiscível disperso em outro em forma de gotículas (SANTOS et al., 2016). Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, a qual pode ser aumentada por aditivos surfactantes, sólida finamente dividida que atuam reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia na superfície entre as duas fases e prevenindo a coalescência das partículas através da formação de barreiras históricas e eletrostáticas (McCLEMENTS; GUMUS, 2016).

Alguns emulsificantes alimentícios naturais derivados de vegetais, como a lecitina e a goma arábica, já gozam de grande participação e aceitação no mercado. Contudo, a lecitina apresenta limitações de funcionalidade quando aplicada em produtos submetidos a condições de processamento mais modernas, como cocção em micro-ondas e irradiação. A produção de emulsificantes a partir de cultivos microbianos surge como alternativa aos aditivos existentes, especialmente em virtude da possibilidade em obter produtos mais resistentes às exigências das modernas tecnologias de processamento de alimentos (NITSCHKE; COSTA, 2007).

Exemplos de alimentos processados, que são emulsões, são creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos para salada, salsicha, recheio entre outros. Outras aplicações para os emulsificantes são descritas, entre elas melhorar a textura e vida de prateleira de produtos

contendo amido, pela formação de complexos com os componentes destes, modificar as propriedades reológicas de farinha de trigo, pela interação com o glúten, melhorar a consistência e textura de produtos à base de gorduras, pelo controle do polimorfismo e da estrutura cristalina das gorduras (NITSCHKE; COSTA, 2007; CAMPOS et al., 2013).

Em alimentos, existem relatos da ação de biossurfactantes como emulsionantes para o processamento de matéria-prima, com aplicação em produtos de panificação, influenciando nas características reológicas da farinha, e em produtos derivados de carne, na emulsificação da gordura. A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas.

Os biossurfactantes ainda podem ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, no controle da aglomeração de glóbulos de gordura, na estabilização de sistemas aerados e para melhorar a consistência de produtos gordurosos. O uso de ramnolipídios para melhorar as propriedades da manteiga, croissants e de produtos de confeitaria congelados também foi reportado (MUTHUSAMY et al., 2008).

Leveduras como *Candida utilis*, *Candida valida*, *Hansenula anomala*, *Rhodospiridium diobovatum* e *Rhodotorula graminis*, a alga vermelha *Porphyridium cruentum* e as bactérias *Klebsiella sp* e *Acinetobacter calcoaceticus* foram identificadas como bons produtores de bioemulsificantes extracelulares, com melhor atividade estabilizante que a goma arábica e a carboximetilcelulose (BARROS et al., 2007).

3.4.1.2 Biossurfactantes como agentes antibiofilmes

Os biofilmes são um conjunto de micro-organismos emaranhados que residem dentro de uma matriz polimérica extracelular que está aderida a uma superfície. Normalmente, 5 a 35% do biofilme é constituído pelos micro-organismos, enquanto o restante é a matriz extracelular (JAMAL et al., 2018).

Na indústria alimentícia, os biofilmes bacterianos são fontes de contaminação em potencial, que representam transmissão de doenças e deterioração dos alimentos. Devido a isso, diminuir a formação desses biofilmes na superfície dos alimentos é de extrema importância para fornecer produtos de qualidade aos consumidores (CAMPOS et al., 2013). Desta forma, por ser altamente ativos na superfície, os biossurfactantes são eficazes contra a formação de biofilme (SHARMA, 2016).

O biossurfactante isolado da bactéria *Lactobacillus paracasei* apresentou atividade antibiofilme contra alguns patógenos alimentares, como *Candida albicans*, *Staphylococcus*

aureus, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus agalactiae* (GUDIÑA et al. 2010). A formação de biofilme por *E. Coli* foi anulada em 54% por biossurfactante derivado de *Bacillus licheniformis* (GIRI et al., 2017). O biossurfactante produzido por *Nocardiopsis sp.* MSA13 interrompeu significativamente a formação de biofilme por *Vibrio alginolyticus* (KIRAN et al., 2014). Um biossurfactante do tipo glicolípido produzido por *Brevibacterium casei* inibiu de forma significativa a produção de biofilme por *Vibrio spp.*, *E. coli* e *Pseudomonas spp.* (KIRAN et al., 2010).

3.4.1.3 Biossurfactantes como agentes antimicrobianos

Muitos metabólitos secundários derivados de micro-organismos têm sido estudados e descritos como agentes antimicrobianos, essa busca por compostos que apresentem atividades contra patógenos surge da necessidade de inibir a ação desses micro-organismos, com visão especial para a área alimentícia, pois os antibióticos convencionais já não estão mais dando conta, uma vez que esses patógenos estão cada vez mais resistentes (SHARMA, 2016).

Nesse contexto, os biossurfactantes têm sido utilizados com sucesso para inibir ou retardar o desenvolvimento de micro-organismos comuns em alimentos. Anjun et al. (2016) realizaram testes com resultados eficazes, aplicando biossurfactante produzido por *Bacillus sp.* para inibir o crescimento de *E. coli*. Yuliani et al. (2018) também utilizaram um biossurfactante produzido por uma espécie de *Bacillus*, o *Bacillus subtilis* C19, mostrando atividade contra cinco patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica typhi* e *Listeria monocytogenes*).

Biossurfactantes isolados de *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* apresentam atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* CMCC26003 (YAN et al., 2019). Ramnolípídios derivados de *Pseudomonas aeruginosa* reduziram populações de vários patógenos de origem alimentar, como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* (COSTA et al., 2010).

3.4.1.4 Biossurfactantes como agentes antioxidantes

Os antioxidantes são uma classe de aditivos alimentares utilizados para evitar a oxidação lipídica em alimentos, elevando a vida útil dos produtos alimentícios. Geração de compostos tóxicos e causa e desenvolvimento de rancidez e sabores indesejáveis são saldos negativos da

auto-oxidação lipídica, isso faz com que haja a diminuição das qualidades do produto, além da queda da segurança alimentar (NITSCHKE; SILVA, 2017).

No setor de alimentos, o potencial antioxidante de compostos naturais é de grande atenção, uma vez que surgiu a necessidade de substituir antioxidantes de origem sintética. Os biossurfactantes mostraram que tem potencial para substituí-los e ainda substituir os naturalmente existentes por apresentar atividade antioxidante significativas (SHARMA, 2016).

Biossurfactantes isolados de cepas de *Lactobacillus casei* foram avaliados quanto a sua atividade sequestradora de radicais livres de DPPH, onde obteve-se resultados satisfatórios, com maior atividade de eliminação do radical aumentando com a concentração de biossurfactante utilizada (MERGHNI et al., 2017).

Yalçın e Çavuşoğlu (2010) sugeriram que o biossurfactante do tipo lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* RWI poderia ser utilizado como um antioxidante natural alternativo ao avaliar a sua atividade antioxidante por poder redutor, sequestro de DPPH e ensaios de quelação de íons ferrosos, onde concluíram que o biocomposto mostrou uma boa capacidade antioxidante para eliminar radicais livres.

3.5 PERSPECTIVAS INDUSTRIAIS

Nos últimos anos, têm surgido um aumento no interesse de isolamento e identificação de novos polissacarídeos microbianos e surfactantes. A possibilidade em descobrir uma nova goma tal como a Xantana ou um emulsificante como o Emulsan, que possui propriedades permitindo seu uso como agente gelificante, emulsificante ou dispersante, tem encorajado este interesse (McCLEMENTS; GUMUS, 2016).

Conforme descrito anteriormente, os altos custos de produção resultam primeiramente de metodologias de bioprocessamento ineficientes, mas também da utilização de substratos caros. Os pré-requisitos para que os biossurfactantes ganhem uma parcela significativa do mercado são: utilização de substratos baratos e que forneçam altos rendimentos, desde que eles contem para 50% do custo final do produto; melhoramento das tecnologias de processamento para facilitar a recuperação do produto; mais conhecimento para manipular o metabolismo das classes produtoras e seleção de biossurfactantes para aplicações específicas (CAMPOS et al., 2013).

Paralelamente, o desenvolvimento nas tecnologias das fermentações aumentará as possibilidades de se modificar a estrutura e a função dos biopolímeros de forma controlável,

sendo possível desenvolver modelos estruturais de ligação e a possibilidade de um “designer-biopolímero”.

Novos ingredientes que possam suportar as modernas técnicas de processamento de alimentos, tais como “UHT” (*ultra high temperature*), aquecimento por extrusão em micro-ondas, etc. e possam funcionar adequadamente em novas formulações de produtos com baixo teor de sal, baixo teor de gordura e baixa caloria, serão desenvolvidos. Contudo, o sucesso dos alimentos e dos ingredientes alimentícios produzidos pela Biotecnologia dependerão também da aceitação do consumidor. Espera-se que as inovações em alimentos baseados na Biotecnologia não sucumbam a uma sorte similar. Será incumbência dos governos, das indústrias alimentícias, dos educadores e da mídia, assim como dos cientistas e tecnologistas diretamente envolvidos, educar os consumidores sobre os benefícios potenciais oferecidos pela Biotecnologia dos alimentos. Não há dúvida de que novas descobertas da Biotecnologia trarão soluções tecnológicas para os desafios enfrentados pela indústria de alimentos (CAMPOS et al., 2013).

Apesar da aplicação potencial, a indústria de alimentos ainda não utiliza os biossurfactantes como aditivos em larga escala. Muitas propriedades dos biossurfactantes, assim como sua regulamentação para aprovação como novo ingrediente para alimentos necessita de aprovação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DO BIOSSURFACTANTE

4.1.1 Micro-organismo produtor do biossurfactante

A levedura *Candida bombicola* URM 3718, depositada na Coleção de Culturas do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, foi utilizada na produção do biossurfactante.

4.1.2 Meios de manutenção e crescimento

A manutenção da levedura foi realizada utilizando-se o meio Yeast Mold Ágar (YMA), com a seguinte composição: extrato de levedura (0,3%), D-glicose (1%), peptona (0,5%), ágar (2%), dissolvidos em água destilada (100mL), pH=7,0. O meio de crescimento, Yeast Mold Broth (YMB), tem a mesma composição, excluindo-se o ágar.

4.1.3 Crescimento do inóculo

O inóculo da levedura foi padronizado transferindo-se a cultura para um tubo contendo o meio YMA, a fim de se obter uma cultura jovem. Em seguida, a amostra foi transferida para frascos contendo 50 mL do meio YMB e incubados sob agitação de 150 rpm a 28°C durante 24 horas. Após este período, foram realizadas diluições até se obter a concentração final de 10^4 células/mL, a qual foi utilizada na concentração de 5% (v/v). A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer.

4.1.4 Meio de produção

As fermentações para produção do biossurfactante foram realizadas em meio formulado com água destilada contendo 5% de melaço de cana, 5% de óleo de fritura residual e 3% de milhocina, sendo o pH ajustado para 6,0 com solução de HCl, conforme descrito por Freitas et al. (2016).

4.1.5 Produção do biossurfactante

As fermentações para a produção do biossurfactante foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 1000 mL de capacidade, contendo 500 mL do meio de produção e incubados com 5% do pré-inóculo. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 180 rpm durante 120 horas, à temperatura de 28°C (FREITAS et al., 2016).

4.1.6 Determinação da tensão superficial e interfacial

A tensão superficial do biossurfactante produzido foi medida no líquido metabólico livre de células em tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY. A tensão interfacial foi medida em relação ao n-hexadecano no líquido metabólico.

4.1.7 Isolamento do biossurfactante

Para o isolamento do biossurfactante, foi utilizado um método desenvolvido em laboratório, no qual consiste primeiramente na extração líquido-líquido com acetato de etila, por duas vezes, na proporção 1:4 com o meio não centrifugado. Em seguida, a fase orgânica foi submetida à centrifugação (2600xg por 20 minutos) e posterior filtração. O filtrado foi transferido novamente para o funil de separação e solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) foi adicionada para separar a fase aquosa restante. A fase orgânica foi transferida para um frasco de erlenmeyer e foi adicionado sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) até a formação de grânulos, sendo filtrada em papel de filtro qualitativo e seca à temperatura de 50 °C.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

4.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Para esta determinação, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) diluído em uma pequena fração de água destilada ao extrato bruto do biossurfactantes, na proporção 1:7. Em seguida, o produto formado foi lavado com acetona, sendo filtrado em filtro de vidro sinterizado e secado para evaporação do solvente. Para a obtenção da CMC, inicialmente foi pesado 0,1 g do produto e realizada sucessivas diluições com água destilada, sendo posteriormente quantificadas as tensões superficiais das respectivas diluições com auxílio do anel de NOUY.

4.2.2 Atividade de emulsificação

A atividade de emulsificação do biossurfactante foi comparada com a goma guar (origem vegetal) utilizando método de Prasanna, Bell e Grandinson (2012). O óleo (2 mL) foi adicionado a 2 mL de uma solução do bioemulsificante ou solução de goma (1%, p/v) num tubo de vidro com tampa de rosca (100 mm x 13 mm) e o conteúdo foi agitado em vortex durante 2 min a 50 Hz. Após 24 h, o índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado de acordo com a Equação 1:

$$E_{24} = (he/ht) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde: *he* é a altura da camada de emulsão e *ht* é a altura total da mistura, em mm. Diferentes óleos vegetais foram usados como substratos (óleo de milho, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de canola e óleo de amendoim).

Todas as amostras foram armazenadas a 27°C (HAN et al., 2015).

4.2.3 Microscopia de luz das emulsões

As emulsões foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2 utilizando-se as soluções de biossurfactante ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2xCMC). A distribuição de tamanho de partícula das emulsões foi medida utilizando uma modificação do método de Prasanna, Bell e Grandinson (2012). Resumidamente, foi utilizado um microscópio óptico (XSZ-HS3, Zhongyi Ltd, Pequim) para examinar e fotografar a emulsão após 24h de armazenamento a 27°C através de uma lente objetiva de 10x. Um volume de 60 μ L da emulsão foi adicionado a uma lâmina de microscópio de cavidade e deixado em repouso durante 5 minutos para estabilização da emulsão, seguindo-se a observação sob o microscópio óptico (HAN et al., 2015).

4.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e análise termogravimétrica

A análise térmica do biossurfactante foi realizada conforme metodologia adaptada de Han et al. (2015) em amostras de biossurfactante de 50 mg, utilizando-se um analisador térmico simultâneo STA 449 F3 (NETZSCH). Para isto, foram realizadas etapas sucessivas de

aquecimento/resfriamento/aquecimento, com razão de aquecimento e de resfriamento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, em atmosfera de nitrogênio com vazão de $50,0 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$, na faixa de 40 a 400°C .

4.2.5 Atividade antioxidante

Avaliação da atividade sequestradora do cátion radical 2',2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}): A atividade antioxidante do composto pelo o ensaio ABTS baseou-se na geração do radical catiônico cromóforo obtido a partir da oxidação de ABTS por persulfato de potássio. Para esta análise, foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999). O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação de 5 mL da solução ABTS^{•+} 7mM, com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25°C e na ausência de luz durante 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm.

Diferentes concentrações do composto (10 µL) foram misturadas com solução de ABTS^{•+} (1 mL) e após 6 min de incubação ao abrigo da luz, as absorbâncias foram lidas ao mesmo comprimento de onda mencionado acima. As medidas foram triplicatas e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de ABTS^{•+} sequestrado. Para curva de calibração preparou-se uma solução padrão de Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, na concentração 2 mM. Primeiro, diluiu-se 25 mg deste composto em álcool etílico até completar o volume para 50 mL em balão volumétrico. A partir desta solução, foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 100 a 2000 µM. Em ambiente escuro, transferiu-se 10 µL de cada solução de Trolox com 1 mL da solução do radical ABTS^{•+}. A leitura foi realizada após 6 minutos da mistura. O álcool etílico foi utilizado como branco na calibração do equipamento. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada utilizando a equação 2:

$$\% I = [(Abs0 - Abs1) / Abs0] \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

em que Abs0 é a absorbância do controle e Abs1 é a absorbância do composto.

Avaliação da atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH): A avaliação da atividade antioxidante do biossurfactante pelo método do sequestro de radical livre foi medida por meio de doação de hidrogênio usando o radical estável DPPH (Blois, 1958). Uma solução de reserva de DPPH metanólica (200 µM) foi adicionalmente

diluída em metanol para obter uma absorbância UV-VIS entre 0,6-0,7 a 517 nm, obtendo a solução de trabalho DPPH. Diferentes concentrações da composição (40 µL) foram misturados com solução de DPPH (250 µL) e após 30 min de incubação ao abrigo da luz, as absorbâncias foram lidas ao mesmo comprimento de onda mencionado acima. As medidas foram triplicatas e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH eliminado. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada utilizando a equação 3:

$$I\% = [(Abs0 - Abs1)/Abs0] \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

onde Abs0 é a absorbância do controle e Abs1 é a absorbância do composto.

Para curva de calibração preparou-se uma solução padrão de Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, na concentração 2 mM. Primeiro, diluiu-se 25 mg deste composto em álcool etílico até completar o volume para 50 mL em balão volumétrico. A partir desta solução, foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 10 a 200 µM. Em ambiente escuro, transferiu-se 40 µL de cada solução de Trolox e 240 µL da solução do radical DPPH. A leitura foi realizada após 25 minutos da mistura. O álcool etílico foi utilizado como branco na calibração do equipamento.

Capacidade antioxidante total por fosfomolibdênio (CAT): A capacidade antioxidante total (CAT) do biossurfactante foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio, que consistiu na capacidade da composição em reduzir o molibdênio e formar o complexo fosfato-molibdato (Pietro et al., 1999). A formação desse complexo resulta na mudança de coloração de amarelo para roxo-azulado. Diferentes concentrações da composição (100µL) foram misturados em 1 mL com complexo fosfato-molibdato (molibdato de amônio 40 mM/ácido sulfúrico 60 mM, fosfato de sódio 280 mM), em seguida incubados em banho-maria a 90 °C por 90 minutos. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 695 nm. Para efeito de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante, sendo a atividade calculada de acordo com a equação 4:

$$\% \text{ Ativ. antioxidante} = [(Abs1 - Abs0)/Abs0 - Abs AA] \times 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

onde Abs0 é a absorbância do controle, Abs1 é a absorbância do composto e Abs AA absorbância do ácido ascórbico.

4.2.6 Avaliação citotóxica

O teste do MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) foi desenvolvido com linhagens das células de fibroblastos de camundongo (L929) (Figura 3) e células epiteliais renais de macaco verde africano (Vero), segundo protocolo descrito por Alley et al. (1988) e Mosmann (1983). Para a realização deste teste, inicialmente foram adicionadas às células de L929 e Vero, mantidas em frascos de cultura a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂, solução de tripsina (0,5%), deixando em repouso por 5 minutos. Em seguida, a ação da tripsina foi inibida com a adição do meio DMEM (Meio Basal Eagle Modificado), sendo realizada a contagem em câmara de Neubauer para cálculo da concentração a ser adicionada nos poços (10⁵ células/mL). Desta forma, adicionou-se à cada poço da microplaca 190 µL de meio de cultura contendo as células na concentração especificada, com exceção dos poços referentes ao branco (apenas meio de cultura DMEM) (Figura 4). Posteriormente, a microplaca foi incubada, para estabilização, em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO₂, por um período de 24h. Decorrido este tempo, foram adicionados 10 µL das soluções dos biossurfactantes para concentração final de 6,25 a 50 µg.mL⁻¹, sendo reincubados nas mesmas condições atmosféricas por 72h. O controle negativo e positivo foi realizado, respectivamente, com meio de cultura DMEM. Após o período de 72h, adicionou-se 25 µL do corante MTT (5 mg.mL⁻¹) e a placa incubada por 3 horas, sendo posteriormente aspirado o meio de cultura com o MTT e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. Após a adição do DMSO, a microplaca foi submetida à leitura de absorbância em leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os valores de absorbância obtidos foram comparados com os do controle negativo, sendo a percentagem de inibição calculada no programa *GraphPad Prism 7.0 demo*.

Figura 3. Linhagem não-cancerígena de fibroblastos de camundongo (L929)

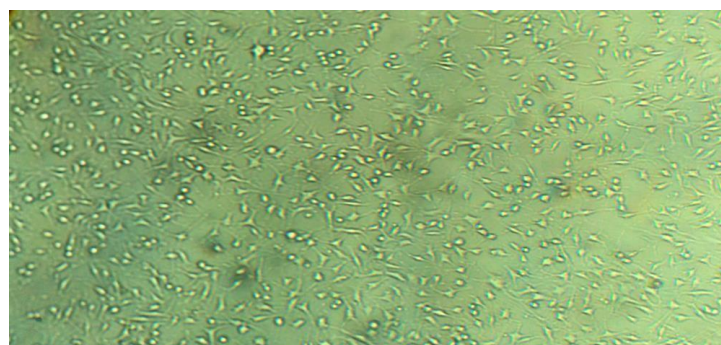


Figura 4. Microplaca com células L929 na concentração 10^5 em meio DMEM



4.2.7 Atividade antibacteriana

Para verificação da atividade antibacteriana foi realizado o ensaio de ágar de difusão em disco adaptado de Bona et al. (2014), utilizando-se as bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* UCP 01575, Gram-positiva *Staphylococcus aureus* UCP 01576, Gram-negativa *Salmonella enterica* UCP 01595 e Gram-positiva *Bacillus cereus* UCP 1615, na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹, correspondente à escala 0,5 de McFarland. Para tal, discos estéreis de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram impregnados com o biossurfactante isolado, solução de biossurfactante (CMC, 2xCMC e 4xCMC), cloranfenicol como controle positivo e água estéril como controle negativo e, em seguida, aplicados com auxílio de pinça estéril sobre uma placa de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton (AMH), previamente inoculada com 0,1 mL da bactéria a ser testada. Após este procedimento, as placas foram submetidas à incubação sob temperatura de 30 °C por 24 horas para medição do diâmetro, em mm, da zona de inibição do crescimento. O ensaio foi realizado em triplicata para cada bactéria estudada e os resultados analisados conforme metodologia do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2009), medindo-se os halos de inibição com auxílio de um paquímetro.

4.3 PREPARO DAS FORMULAÇÕES DOS CUPCAKES

4.3.1 Materiais

Para processamento dos *cupcakes* foram adquiridas amostras comerciais dos seguintes ingredientes: farinha de trigo branco, margarina fabricada partir de óleos vegetais não hidrogenados (palma e soja) e enriquecida com vitaminas A e E (80% de gorduras e 16% de

umidade), açúcar granulado, ovos frescos, fermento em pó (contendo pirofosfato de sódio, bicarbonato de sódio e amido de milho) e sal.

4.3.2 Preparo de massa e cozimento dos *cupcakes*

Uma formulação de massa de bolo foi utilizada como referência (CROSS, 2006) conforme a Tabela 5. A margarina e o ovo inteiro líquido foram batidos com um misturador planetário N50 (Hobart GmbH, Offenburg, Alemanha) durante 60 s (velocidade 3). Os ingredientes secos, pesados numa tigela e misturados e água foram adicionados à massa de margarina/ovo pré-batida na unidade de mistura e batidos durante mais 60 s (10 s à velocidade 2, 50 s à velocidade 3). Depois de encher a massa em formas de papel em alíquotas de $50 \pm 0,2$ g, os *cupcakes* foram assados em forno MIWE (Michael Wenz GmbH, Arnstein, Alemanha). A temperatura do forno foi ajustada para 180°C, e o tempo de cocção ajustado para 24 minutos. Após arrefecimento, os *cupcakes* foram armazenados em sacos de plástico até à análise (18-24 horas após a cocção). A partir da formulação de referência, 50% (formulação A), 75% (formulação B) e 100% (formulação C) da margarina foi substituída pelo biossurfactante e cada uma das formulações de *cupcakes* foi processada em triplicata.

Tabela 5. Composição da massa do cupcake

Ingredientes	Padrão (g)	Formulação A (g)	Formulação B (g)	Formulação C (g)
Farinha de trigo	153,66	153,66	153,66	153,66
Açúcar	92,20	92,20	92,20	92,20
Fermento em pó	7,66	7,66	7,66	7,66
Sal	1,80	1,80	1,80	1,80
Leite em pó desnatado	11,60	11,60	11,60	11,60
Margarina	77,00	38,50	19,25	0,00
Ovo inteiro	46,10	46,10	46,10	46,10
Água	76,80	76,80	76,80	76,80
Biossurfactante	0,00	38,50	57,75	77,00
Total	466,82	466,82	466,82	466,82

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS *CUPCAKES*

4.4.1 Propriedades físicas dos *cupcakes* após cocção

As propriedades físicas avaliadas foram: peso, diâmetro e altura. O peso foi determinado usando uma balança analítica de precisão de 0,001 g (BEL Engineering). A medição do diâmetro dos cupcakes será realizado segundo Noor Aziah et al. (2012). Quatro amostras selecionadas aleatoriamente foram colocadas uma ao lado da outra e o diâmetro total foi medido com um paquímetro digital (Mtx). Em seguida, todos os *cupcakes* foram girados por 90°C e o novo diâmetro foi medido. A média das duas medidas divididas por quatro foi tomada como o diâmetro final. A altura dos cupcakes foi medida utilizando um paquímetro digital (Mtx).

4.4.2 Análise físico-química dos *cupcakes* após cocção

Foram utilizadas as metodologias de ensaio conforme a AOAC (2002). O teor de umidade foi determinado por meio do método gravimétrico, baseado na perda de peso das amostras submetidas a aquecimento em estufa a 105 °C até peso constante (método 985.14). A concentração de proteínas totais foi calculada utilizando-se o método Kjeldahl, baseado na digestão ácida da matéria orgânica seguido da destilação, sendo o nitrogênio posteriormente dosado por titulação; e o valor em nitrogênio multiplicado pelo fator 6,25 (método 992.15). Já para o resíduo mineral fixo (cinzas) o método gravimétrico foi utilizado, baseado na determinação da perda de peso das amostras submetidas à incineração a 550 °C (método 923.03).

Para quantificação da fração lipídica utilizou-se o método de extração a frio de Bligh-Dyer (1959), em que se utiliza uma mistura de clorofórmio, metanol e água. Já o teor de carboidratos foi obtido a partir da diferença entre 100 e o somatório das determinações de umidade, proteínas, lipídios e cinzas.

4.4.3 pH

O valor de pH foi determinado em potenciômetro digital MS TECNOPON Instrumentação. O pHmetro foi calibrado com soluções tampão e, em seguida, foi determinado o pH dos cupcakes macerados, onde foi pesado 10g do conteúdo macerado e acrescentou-se 100 mL de água destilada para dissolução do material.

4.4.4 Determinação do valor energético dos *cupcakes* após cocção

Para determinação do valor energético, foi calculado como [(proteínas x 4 kcal/g) + (lipídios x 9 kcal/g) + (carboidratos x 4 kcal/g)]

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata. Médias e erros padrão foram calculados usando o Microsoft Office Excel 2016. O Teste Tukey, com 95% de confiança, foi utilizado na análise físico-química dos *cupcakes* formulados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO

5.1.1 Tensão superficial e interfacial

As propriedades mais importantes para verificação da eficácia de um biossurfactante estão relacionadas à tensão superficial e interfacial. Segundo Bezerra et al. (2018), a tensão superficial é a tensão entre um líquido e o ar, enquanto a tensão interfacial é a tensão encontrada entre duas fases distintas. Os biossurfactantes atuam reduzindo as forças existentes entre as moléculas da superfície do líquido, exercendo influência nas ligações de hidrogênio e ainda em interações hidrofóbicas-hidrofílicas, aumentando, assim, a superfície de contato.

Os resultados obtidos de tensão superficial e interfacial para o biossurfactante produzido por *C. bombicola* URM 3718 cultivado em meio alternativo foram de $30,790 \pm 0,04 \text{ mN.m}^{-1}$ e $0,730 \pm 0,05 \text{ mN.m}^{-1}$, respectivamente. Conforme Akbari et al. (2018), biossurfactantes com a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN.m^{-1} e tensão interfacial de 40 para 1 mN.m^{-1} são eficazes, sendo, assim, considerados bons tensoativos.

Analisando os resultados obtidos com os valores apresentados por Jadhav, Pratap e Kale (2019) utilizando-se a *Starmerella bombicola* MTCC 1910 em meio contendo 10% de resíduo de refinaria de óleo de girassol como fonte de carbono, pode-se observar resultados semelhantes, de $35,5 \pm 0,52 \text{ mN.m}^{-1}$ e $0,923 \pm 0,06 \text{ mN.m}^{-1}$ para tensão superficial e interfacial, respectivamente. Resultados semelhantes também foram encontrados por Shah et al. (2017) em meio com 10% de óleo de palma, utilizando a *Starmerella bombicola* ATCC 22214, $35,35 \text{ mN.m}^{-1}$ para tensão superficial e $3,322 \pm 0,176 \text{ mN.m}^{-1}$ para tensão interfacial.

Outros resultados encontrados na literatura para a produção de biossurfactante utilizando *Candida sp.* podem ser utilizados como comparativos. Luna et al. (2013) utilizaram 9% de resíduo de refinaria de óleo de amendoim e 9% de milhocina para obtenção de um biossurfactante por *C. sphaerica* UCP 0995 e obtiveram resultados de 25 mN.m^{-1} para tensão superficial e $12,5 \text{ mN.m}^{-1}$ para tensão interfacial. Valores de $35,33 \pm 0,19 \text{ mN.m}^{-1}$ e $2,53 \pm 0,02 \text{ mN.m}^{-1}$ para tensão superficial e interfacial, respectivamente, foram encontrados por Ribeiro et al. (2019) utilizando a levedura *C. utilis* UFPEDA 1009 em meio de baixo custo suplementado com 6% de óleo residual de canola.

5.1.2 Isolamento do biossurfactante

O biossurfactante foi isolado a partir de procedimento desenvolvido em laboratório. O método apresenta vantagens frente a outros métodos convencionalmente utilizados para extração de biossurfactantes, uma vez que etapas iniciais de centrifugação e filtração são descartadas, além da utilização de menor volume de solvente (acetato de etila) na etapa principal do isolamento. O rendimento obtido foi de 25 g.L⁻¹.

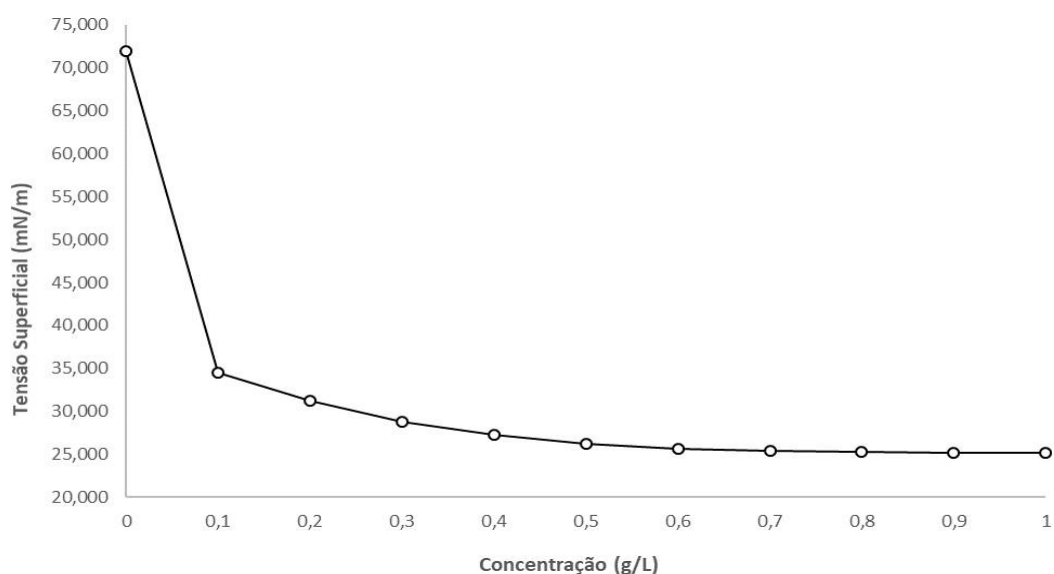
Ribeiro et al. (2019) utilizaram a mesma metodologia de extração para isolamento de biossurfactante produzido por *C. utilis* UFPEDA 1009 e obtiveram 24,22 ± 0,23 g.L⁻¹. Pinto et al. (2018) obtiveram rendimento 61 g.L⁻¹ utilizando *C. bombicola* em produção em biorreator de 3 L, com a mesma metodologia de extração empregada neste projeto, indicando um possível escalonamento para a continuidade do trabalho, uma vez que no presente projeto a produção do biossurfactante foi realizada em shaker.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

5.2.1 Concentração Micelar Crítica (CMC)

Os perfis de mudança da tensão superficial versus concentração de biossurfactante estão apresentados na Fig. 5.

Figura 5. CMC do biossurfactante produzido pela *Candida bombicola* URM 3718



Segundo Rocha e Silva et al. (2018), a Concentração Micelar Crítica (CMC) corresponde a menor concentração de surfactante necessária para reduzir ao máximo a tensão superficial. Essa condição é atingida quando começam a se formar micelas no meio e não há mais redução da tensão superficial. A CMC está relacionada a eficiência dos surfactantes e varia de 0,001 a 2 g.L⁻¹ para os biossurfactantes. Biossurfactantes são mais eficientes à medida que a concentração de biossurfactante diminui para atingir a CMC.

O biossurfactante produzido pela *C. bombicola* URM 3718 mostrou-se eficiente, uma vez que apresentou valor de CMC de 0,5 g.L⁻¹.

5.2.2 Índice de emulsificação (E₂₄)

O índice de emulsificação (E₂₄) é um método qualitativo e rápido para avaliação das propriedades emulsificante dos surfactantes. Sistemas de emulsão com hidrocarbonetos e/ou compostos insolúveis em águas tem estabilidade mínima, então surfactantes são utilizados para estabilizar esses sistemas. De acordo com Campos et al. (2015), a estabilidade dessas emulsões é um indicativo da atividade de superfície dos biossurfactantes, embora a capacidade de emulsificação do bioproduto não esteja relacionada com a sua capacidade em reduzir a tensão superficial. A capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por *C. bombicola* URM 3718 foi comparado com a goma guar após 24 h de armazenamento a 27° C e os resultados estão expressos nas Tabelas 6 e 7, onde a Tabela 6 apresenta os resultados obtidos utilizando a goma guar como emulsificante frente a óleos de soja, milho, canola, girassol e amendoim, comuns em alimentos; a Tabela 7 apresenta o índice de emulsificação do biossurfactante produzido frente aos mesmos óleos vegetais. Quanto maior o índice de emulsificação, melhor a atividade de emulsificação do emulsificante com os componentes hidrofóbicos.

Tabela 6. Índice de emulsificação da goma guar frente aos óleos vegetais

Goma Guar (1%, p/v)	E ₂₄ (%)				
	Óleo de soja	Óleo de milho	Óleo de Canola	Óleo de Girassol	Óleo de Amendoim
	48,11±1,33	66,77±0,15	52,59±1,05	30,49±0,85	42,36±1,38

Tabela 7. Índice de emulsificação do biossurfactante frente aos óleos vegetais

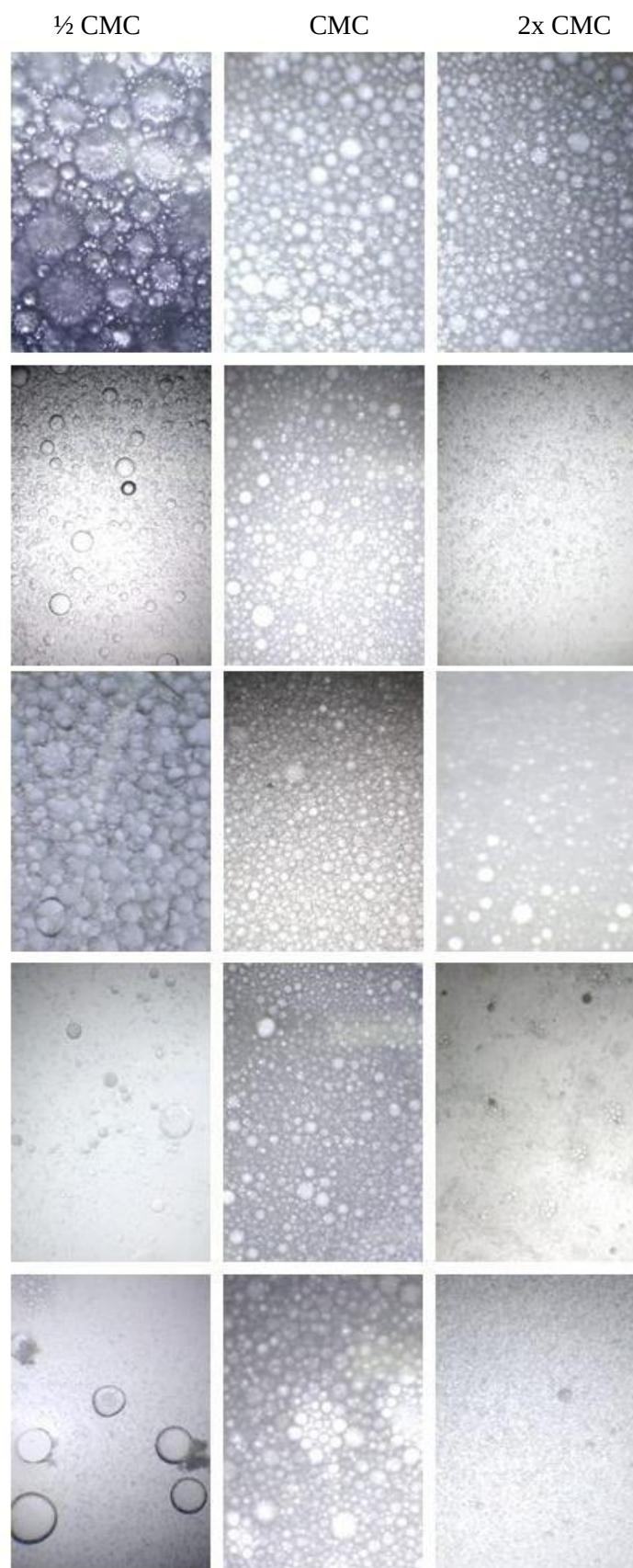
Biossurfactante	E ₂₄ (%)				
	Óleo de soja	Óleo de milho	Óleo de Canola	Óleo de Girassol	Óleo de Amendoim
1/2 CMC	41,16±0,32	39,29±0,00	44,64±0,27	49,78±0,31	62,70±0,89
CMC	45,81±3,50	48,28±0,00	45,44±1,40	54,61±0,79	68,97±0,00
2x CMC	51,78±0,08	56,33±0,48	50,86±1,22	56,72±2,19	69,48±0,73

A goma guar, uma fibra obtida do endosperma de *Cyamopsis tetragonolobus*, foi utilizada como comparativo, uma vez que apresenta regulação documentada pela Food and Drug Administration (FDA) para fins alimentícios. A goma guar é composta, principalmente, por polissacarídeos hidrofílicos de alto peso molecular, é largamente utilizada como aditivo alimentar e fornece ao alimento, entre outras propriedades, a emulsificação (Sharma et al., 2018). Ao analisar os resultados, é possível afirmar que ambos os bioemulsificantes foram capazes de emulsionar de forma satisfatória os óleos estudados, com destaque para o biossurfactante, que apresentou altos índices para todos os óleos testados, sendo o aumento da concentração de biossurfactante fator determinante para o aumento dos índices de emulsificação.

Comparando-se os resultados obtidos com valores encontrados na literatura para índices de emulsificação de biossurfactante de espécies de *Candida* frente a óleos vegetais, Pinto et al. (2018) utilizaram *C. bombicola* para produzir biossurfactante a partir de resíduos industriais em meio contendo 5% de melaço de cana, 5% de milhocina e 5% de óleo de soja residual e obtiveram índices de emulsificação de 28% para óleo de canola, 26% para óleo de milho e 30% para óleo de soja. Gaur et al. (2019) utilizaram biossurfactante isolado da levedura *C. glabrata* CBS138 para verificar a sua capacidade emulsificante frente a óleos de amêndoa, mostarda, soja e azeite de oliva e obtiveram 50, 50, 51 e 49% de emulsificação, respectivamente. Luna et al. (2015) obtiveram $21,74 \pm 0,41$ para óleo de milho e $24,00 \pm 0,53\%$ para óleo de soja utilizando biossurfactante isolado de *C. sphaerica* UCP0995 produzido com substratos de baixo custo. Campos, Stamford e Sarubbo (2014), utilizaram biossurfactante produzido por *C. utilis* UFPEDA 1009 em meio contendo óleo residual de canola e obtiveram 73, 73, 43 e 33% para os óleos de girassol, milho, soja e arroz, respectivamente. Esses resultados apresentados são favoráveis à aplicação do biossurfactante produzido por *C. bombicola* URM 3718 em meio de baixo custo como emulsificante em sistemas alimentares.

5.2.3 Distribuição do tamanho de partículas das emulsões

No âmbito comercial, é importante que as emulsões formadas em qualquer processo permaneçam estáveis, tendo grande importância o estudo da variação da concentração de biossurfactante, seja no aumento ou na diminuição, para esta estabilidade. Com isso, avaliar a distribuição do tamanho de partículas de emulsões é necessário para o estudo das propriedades físicas de um biossurfactante, uma vez que é possível observar o tamanho da gota da emulsão (LUO et al., 2017; HAN et al., 2015). As fotomicrografias das emulsões das soluções do biossurfactante produzido ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2 CMC) com os óleos de amendoim, canola, soja, milho e girassol apresentam-se na Fig. 6.

Figura 6. Fotomicrografia das emulsões

Óleo de amendoim

Óleo de canola

Óleo de soja

Óleo de girassol

Óleo de milho

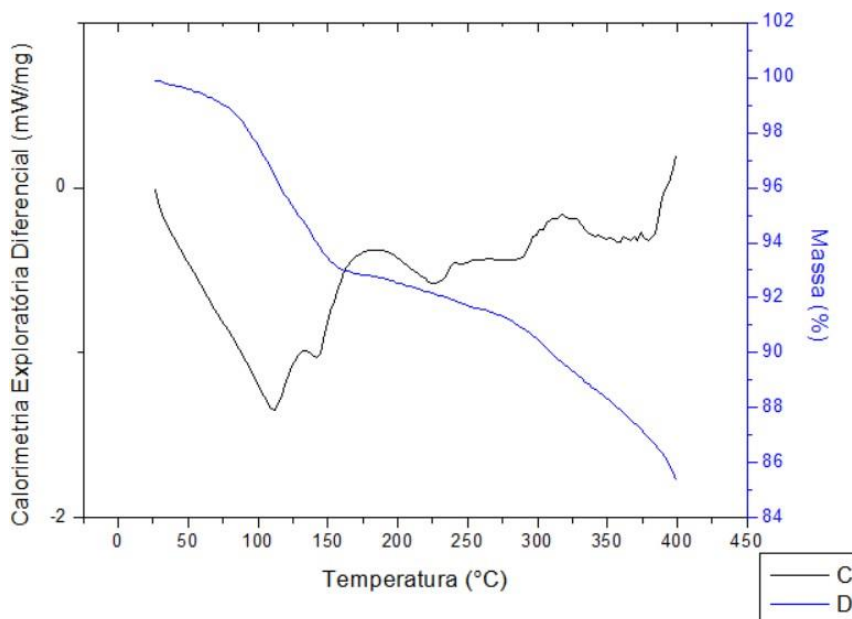
De acordo com Kokal (2005), tanto o tamanho das gotículas, quanto a forma de distribuição das mesmas depende de fatores relacionados, incluindo tensão superficial, natureza do emulsificante, propriedades do óleo utilizado, além da taxa de cisalhamento (misturas, acidentes, etc.). Analisando a Fig. 6, observa-se, de forma geral, que o aumento da concentração de biossurfactante foi determinante para diminuição das gotículas, o que está relacionada com a estabilidade da emulsão. Também é possível observar que as microfotografias para o óleo de amendoim apresentaram aspecto mais uniforme quanto ao tamanho das gotículas, corroborando com os resultados apresentados na Tabela 7, onde foram obtidos os maiores índices de emulsificação. Comportamento este semelhante ao encontrado para os biossurfactantes estudados por Rocha e Silva et al. (2017).

Como não há registros na literatura de análises por microscopia das emulsões com biossurfactantes produzidos pela levedura deste trabalho, não foi possível fazer análise comparativa com os resultados. Contudo, Han et al. (2015) realizaram esta análise com emulsões de óleo de girassol utilizando exopolissacarídeos produzidos por espécies de *Bacillus* e goma guar comercial como emulsificantes, obtendo fotomicrografias semelhantes. Deste modo, os resultados demonstram que o biossurfactante produzido tem grande potencial para ser utilizado como emulsificante.

5.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

Visando a aplicação industrial do biossurfactante produzido por *C. bombicola* URM 3718, é imprescindível analisar o seu comportamento quando submetido a mudanças de temperatura, com o objetivo de avaliar os efeitos às propriedades físicas e/ou químicas ao biocomposto. Portanto, determinar o perfil termoestável do produto através da termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) é de extrema importância, tendo em vista que é possível submeter o produto a um programa controlado de temperatura e obter dados inerentes a este fim, como variação de massa, estabilidade térmica, água livre e água ligada, pureza, ponto de fusão, ponto de ebulição, diagramas de fase, transições vítreas, entre outros (IONASHIRO, 2005). O perfil de termoestabilidade do biossurfactante produzido apresenta-se na Fig. 7.

Figura 7. TG (azul) e DSC (preto) do biossurfactante produzido



Em relação à análise termogravimétrica, foi possível obter a curva (em azul) de perda de massa do biossurfactante em função da temperatura. Conforme a Fig. 7, o biossurfactante produzido apresentou boa estabilidade térmica, com perda de massa de 7,22% na temperatura de 181,76 °C. Até a temperatura final (400 °C), a variação de perda de massa foi na faixa de 14,36%.

Para a análise de DSC, o termograma do biossurfactante produzido apresentou pico exotérmico com temperatura de cristalização (T_C) de 116,76 °C (temperatura de início de 26,76 °C) e o picos de fusão endotérmico foram observados em 186,76 °C (temperatura de início em 141,76 °C) e 319,26 °C (temperatura de início em 291,76 °C).

Na literatura, não é possível encontrar relatos deste tipo de análise em biossurfactantes produzidos por *C. bombicola*; no entanto, biossurfactantes produzidos por espécies de bactérias têm sido caracterizados quanto ao seu perfil termoestável. Kiran et al. (2017) analisaram a termoestabilidade de biossurfactante lipopeptídico produzido por *Nesterenkonia sp* e apresentaram resultados semelhantes de picos de fusão 240 °C e 320 °C. Para a análise termogravimétrica, a perda máxima de massa ou máxima degradação ocorreu na temperatura de 260 °C, com 50,725%. Singh e Tiwary (2016) produziram um biossurfactante a partir da *Pseudomonas otitidis* P4 e observaram que na temperatura de 149,9°C, 21,38% de biossurfactante havia sido degradado. A temperatura de cristalização foi semelhante a temperatura encontrada para o biossurfactante de *C. bombicola*, isto é, 112,83 °C. Kourmentza

et al. (2017) apresentaram resultado semelhante a um dos picos de fusão, de 166,40 °C para raminolipídio de *Burkholderia thailandensis*.

Segundo Han et al. (2015), quanto maior o pico de fusão dos biossurfactantes maior é a sua estabilidade térmica. Além disso, compostos que apresentam temperaturas de degradação altas são mais vantajosos, uma vez que torna sua aplicação viável frente às condições extremas de temperatura. Com isso, sabendo-se que o processo de cocção dos cupcakes é sob temperatura máxima de 180 °C, é possível afirmar que o biossurfactante não sofrerá perda significativa de massa, proporcionando sua adequada aplicação.

5.2.5 Atividade Antioxidante

A oxidação lipídica e atividades enzimáticas são problemas de grande significância na indústria de alimentos, que pode resultar em mudanças na composição química do alimento, reduzindo, assim, sua qualidade e vida útil (GAHRUIE; NIAKOUSARI, 2017). Os antioxidantes têm papel central na neutralização desses processos, podendo sua ação ser verificada através de vários mecanismos: inibindo radicais livres, sequestrando oxigênio ou quelando íons metálicos que catalisam as reações oxidativas (CÖRMET; GÖKMEN, 2018).

Capturas de radicais orgânicos como o 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) ou redução de complexos como o fosfomolibdênio, sendo visualmente observadas a partir da mudança de coloração das soluções, proporcional à capacidade antioxidante, foram determinadas e os percentuais de capacidade antioxidante total (complexo fosfomolibdênio) e de inibição (DPPH) das soluções do biossurfactante estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Percentual de sequestro de radicais DPPH (% I) e da capacidade antioxidante total (%CAT) em diferentes concentrações do biossurfactante

Concentração de Biossurfactante (µg/mL)	% I	% CAT
2000,00	-	25,47 ± 3,18
1000,00	52,42 ± 0,69	11,16 ± 0,37
500,00	32,93 ± 0,59	7,65 ± 4,53
250,00	25,05 ± 0,67	7,01 ± 0,46
125,00	8,48 ± 1,16	3,47 ± 0,07
62,50	4,55 ± 0,35	2,80 ± 0,21
31,25	2,32 ± 0,90	-

Conforme a Tabela 8, o biossurfactante apresentou resultados promissores em relação à técnica de redução do complexo fosfomolibdênio. Segundo Pietro et al. (1999), esta análise baseia-se na redução de molibdênio VI em molibdênio V pela substância em teste, resultando na alteração da coloração do meio de amarelo claro para verde. Comparando-se os percentuais da capacidade antioxidante total (CAT) do biossurfactantes com a concentração referência do ácido ascórbico (2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o biossurfactante apresentou 25,47% de atividade. Os resultados apresentaram uma relação linear, indicando que o aumento da concentração de biossurfactante favorece o aumento da sua atividade. Desta forma, em concentrações maiores o biossurfactante produzido tem potencial para aplicação em alimentos carentes de antioxidantes.

A partir do ensaio de DPPH, avaliou-se a capacidade do biossurfactante e do padrão Trolox de impedir a oxidação do radical DPPH. Segundo Schaich, Tian e Xie (2015), o DPPH é um radical estável de cor roxa (púrpura profunda). Sua reação com outros radicais, elétrons ou alguns átomos de hidrogênio acarreta na perda da sua cor para amarelo. Analisando a Tabela 8, é possível notar novamente uma relação linear com os percentuais de redução do radical DPPH (% I). Comparando-se os percentuais com a referência do Trolox na concentração de 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com um percentual de 84,24%, o biossurfactante apresentou 52,42% na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando neste ensaio potencial de redução do radical DPPH, sendo esta redução de extrema importância para a indústria de alimentos.

A literatura não descreve trabalhos com biossurfactantes produzidos pela levedura *C. bombicola* que avaliem a sua atividade antioxidante. No entanto, lipopeptídios têm sido descritos como excelentes antioxidantes, principalmente no que diz respeito a atividade de eliminação do radical DPPH (TABBENE et al., 2012; YALÇIN; ÇAVUŞOĞLU, 2010). Ben Ayed et al. (2015) relataram interessante atividade de eliminação de radicais DPPH (65%) de lipopeptídeos oriundos de *Bacillus mojavensis* A21 na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Outro biossurfactante produzido por espécies de lactobacilos apresentaram atividade sequestrante de radicais de DPPH em torno de 75% na concentração de 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MERGHNI et al., 2017). Com isso, o biossurfactante produzido pela *C. bombicola* URM 3718 pode ser considerado um bom antioxidante, de acordo com o método de sequestro de radicais DPPH.

A terceira metodologia utilizada neste trabalho para determinar o perfil antioxidante do biossurfactante foi o método de sequestro do cátion radical 2',2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}). Segundo Re et al. (1999), esta técnica envolve a produção direta do

cromóforo ABTS^{•+} azul/verde através da reação entre ABTS e persulfato de potássio. A adição de um antioxidante ao cátion pré-formado reduz o ABTS, onde fatores importantes como a atividade antioxidante do composto teste, a sua concentração e a duração da reação são considerados para o resultado desta reação de redução. A Tabela 9 apresenta os percentuais de inibição do radical ABTS^{•+} pelo biossurfactante produzido.

Tabela 9. Percentual de sequestro do cátion radical 2',2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}) pelo biossurfactante

Concentração de Biossurfactante (µg/mL)	% I
5000,00	24,27 ± 2,38
2500,00	17,40 ± 0,49
1250,00	16,64 ± 0,44
625,00	3,36 ± 0,71
312,50	3,82 ± 0,35
156,25	0,61 ± 2,73

Conforme a Tabela 9, o biossurfactante produzido não apresentou bons percentuais de inibição do radical ABTS^{•+}, em comparação com o padrão Trolox, que na concentração de 5000 µg.mL⁻¹ foi capaz de inibir em 84,58%, na mesma concentração. Portanto, este ensaio não indica a aplicação direta do biossurfactante como sequestrador do cátion 2',2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}).

Segundo Vadivel et al. (2011), avaliar a capacidade antioxidante de um determinado composto por metodologias de sequestro é importante, pois estes íons estão presentes no organismo humano, de forma natural. Sendo assim, o biossurfactante avaliado apresenta potencial para aplicação em alimentos carentes em antioxidantes.

5.2.6 Avaliação Citotóxica

Diversos metabólitos microbianos frequentemente exercem algum efeito adverso nos organismos hospedeiros, desencadeando doenças epidêmicas, incluindo efeitos neurotóxicos e citotóxicos (PATOWARY et al., 2017). Com isso, uma avaliação citotóxica desses metabólitos é de extrema importância.

O ensaio MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) para avaliação citotóxica é amplamente aplicado para estimar viabilidade de células microbianas. É um método rápido e barato, que permite a otimização das condições de teste, por ser suficientemente preciso (GRELA; KOZŁOWSKA; GRABOWIECKA, 2018). Segundo Mosmann (1983), o mecanismo deste método consiste na redução do MTT por meio da atividade mitocondrial succinato desidrogenase das células vivas, que resulta diretamente da formação de cristais de formazan, os quais se acumulam no interior na célula e absorvem luz no comprimento de onda de 560 nm.

Os resultados de percentagem de viabilidade celular obtidos para as concentrações analisadas do biossurfactante estão descritos nas Tabelas 10 (linhagem L929) e 11 (linhagem Vero).

Tabela 10. Percentual de viabilidade do biossurfactante de *C. bombicola* URM 3718 frente a linhagem L929

Linhagem L929		
Concentrações	Viabilidade celular (%)	Desvio padrão (%)
Controle	99,50	3,07
6,25	109,79	1,56
12,50	92,06	6,56
25,00	93,14	10,52
50,00	107,66	5,00

Tabela 11. Percentual de viabilidade do biossurfactante de *C. bombicola* URM 3718 frente a linhagem Vero

Linhagem Vero		
Concentrações	Viabilidade celular (%)	Desvio padrão (%)
Controle	99,82	1,96
6,25	94,72	3,32
12,50	96,54	3,43
25,00	98,37	4,79
50,00	95,93	0,72

Conforme os dados obtidos, observou-se que para as duas linhagens de células o biossurfactante apresentou viabilidade celular acima de 90%, o que indica percentuais de inibição inferiores a 20%. De acordo com Gomes Silva et al. (2017), percentuais de inibição de

1 a 20% são considerados sem atividade inibitória. Sendo assim, o biossurfactante não apresentou potencial citotóxico frente as linhagens estudadas. A ISO 10993-5, 2009, determina que viabilidade celular acima de 80% pode ser considerada de natureza não tóxica (ISO Report, 2009).

Para a linhagem L929, houveram percentuais de viabilidade celular acima de 100%. Para ensaio de MTT especialmente esse tipo de fenômeno não é incomum. Uma razão para esse fato pode ser a flutuação experimental aleatória que deve estar entre +/- 10%; outra razão é a estimulação pelo tratamento. No ensaio MTT, mede-se a respiração celular e sua indução pode indicar estresse celular grave, uma vez que o MTT é propenso a compostos que interferem no metabolismo energético, que pode aumentar o metabolismo do MTT para até 200% da atividade da linha de base. Uma terceira razão, porém quase descartável, seria a redução química direta do MTT pelo biossurfactante; no entanto, quando este fenômeno acontece os valores são excessivamente altos (>500%).

Na literatura, é comum encontrar relatos de biossurfactantes produzidos através de via bacteriana que são atóxicos. Para efeito comparativo, o biossurfactante utilizado neste trabalho é derivado de uma levedura; no entanto, é importante mencionar alguns relatos que podem corroborar com os resultados encontrados para o biossurfactante produzido pela *C. bombicola* URM 3718, uma vez que se trata de um biossurfactante da classe dos glicolipídios.

Patowary et al. (2017) utilizaram um raminolipídio, da classe dos glicolipídios, produzido por *P. aeruginosa* PG1 e obtiveram viabilidade celular de 85,6% após 72h de incubação para a linhagem celular de fibroblastos L292 de camundongo. Também da classe dos glicolipídios, um surfactante produzido por *Rhodococcus* sp. 51T7 apresentou toxicidade menor que surfactantes sintéticos frente a fibroblastos 3T6 de camundongos (MARQUES et al., 2009).

Desta forma, o biossurfactante de *C. bombicola* URM 3718 apresenta potencial de aplicação nos setores alimentício, cosmético e farmacêutico.

5.2.7 Atividade Antibacteriana

O teste de difusão em disco, também chamado de difusão em placas, é um método físico, o qual relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo teste com a concentração do composto avaliado. Este teste é utilizado para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado micro-organismo, sendo

um método bastante confiável por não sofrer influência da velocidade de crescimento (BONA et al., 2014).

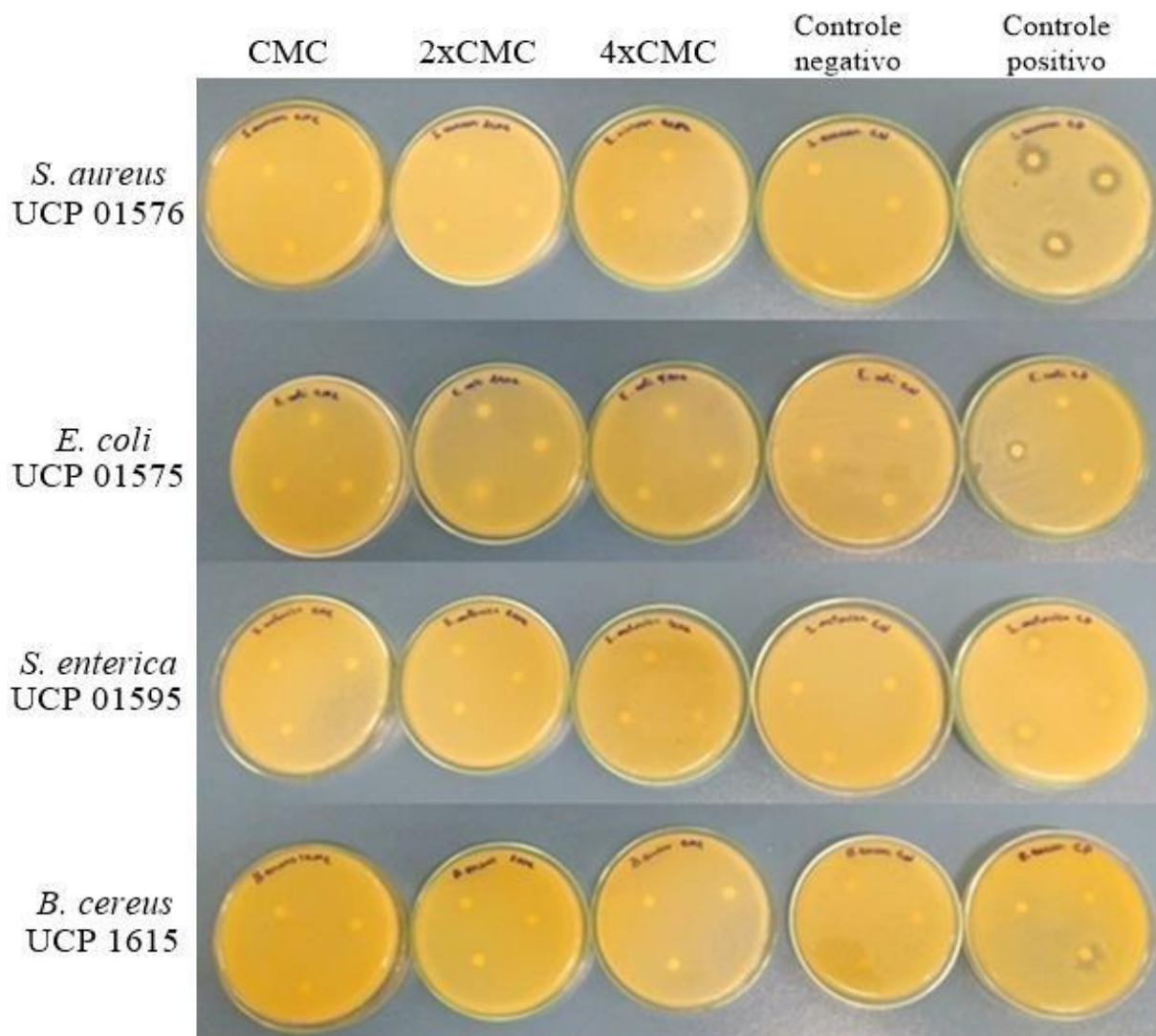
Os dados de diâmetro do halo de inibição do biossurfactante frente cada bactéria testada e as placas de leitura, estão na Tabela 12 e Fig. 8, respectivamente.

Tabela 12. Diâmetro (mm) do halo de inibição do biossurfactante frente bactérias patogênicas analisadas

Substância teste	D _{HALO} de inibição (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>B. cereus</i>
Controle positivo:				
Clorafenicol (100 mg/mL)	14,67 ± 0,58	11,00 ± 0,00	9,19 ± 0,08	15,88 ± 0,00
Controle negativo:				
Água estéril	SA	SA	SA	SA
Biossurfactante (CMC)	SA	SA	SA	SA
Biossurfactante (2x CMC)	SA	SA	SA	SA
Biossurfactante (4x CMC)	SA	SA	SA	SA

SA = sem atividade.

Figura 8. Atividade antibacteriana do biossurfactante de *C. bombicola* URM 3718



Com base na Tabela 12, o biossurfactante produzido por *C. bombicola* URM 3718 não exerceu inibição ao crescimento das bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* UCP 01575, Gram-positiva *Staphylococcus aureus* UCP 01576, Gram-negativa *Salmonella enterica* UCP 01595 e Gram-positiva *Bacillus cereus* UCP 1615 nas concentrações utilizadas do biossurfactante.

Já o cloranfenicol, antibiótico amplamente empregado para tratar infecções bacterianas, que foi utilizado como controle positivo apresentou inibição com halo acima de 10 mm de diâmetro para as bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* UCP 01575, Gram-positiva *Staphylococcus aureus* UCP 01576, Gram-positiva *Bacillus cereus* UCP 1615 e halo de 9,19 mm para a Gram-negativa *Salmonella enterica* UCP 01595. O controle positivo utilizado foi a água estéril e, como esperado, não apresentou atividade de inibição e demonstrou o ótimo crescimento dos patógenos no meio de cultura utilizado.

Segundo Ostrosky et al. (2008), a concentração inibitória mínima (CIM) é determinada quando a concentração do composto avaliado é capaz de desenvolver halo de inibição do crescimento microbiano maior ou igual a 10 mm de diâmetro. Neste caso, não foi possível determinar a CIM do biossurfactante devido a sua falta de atividade antibacteriana contra os patógenos utilizados neste teste.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS CUPCAKES

5.3.1 Propriedades físicas

Após a cocção (Fig. 9), as propriedades físicas dos cupcakes foram determinadas, sendo os resultados médios de peso, diâmetro, e altura dispostos na Tabela 13.

Figura 9. Cupcakes após a cocção. (A): formulação padrão, 100% margarina; (B): formulação A – 50% margarina, 50% biossurfactante; (C): formulação B – 25% margarina, 75% biossurfactante; (D): formulação C – 100% biossurfactante.



Tabela 13. Propriedades físicas dos cupcakes após cocção

Parâmetro	Formulação padrão	Formulação A	Formulação B	Formulação C
Peso (g)	44,841 ± 0,05	44,955 ± 0,22	43,712 ± 0,01	44,576 ± 0,29
Altura (mm)	41,265 ± 1,18	35,975 ± 1,93	45,885 ± 0,94	42,435 ± 0,35
Diâmetro (mm)	59,120 ± 0,25	57,630 ± 0,01	59,400 ± 0,36	57,610 ± 0,68

Conforme os resultados apresentados na Tabela 13, não houveram grandes discrepâncias entre as diferentes formulações em relação aos parâmetros avaliados. Desta

forma, a substituição parcial ou total da margarina pelo biossurfactante não ocasiona em mudanças significativas nas propriedades físicas dos cupcakes, apesar da flutuação mais acentuada observada nos valores encontrados para Altura, que se mantiveram em uma margem aceitável. Visualmente (Fig. 9) também não foram observadas grandes diferenças nos cupcakes, que se mantiveram com um padrão semelhante.

Fazendo um comparativo com os valores encontrados em Altura e Peso da formulação padrão *versus* formulações com adição de biossurfactante é possível observar que mesmo notando-se uma variação nos valores de Altura, as respectivas medições de peso não sofreram alterações expressivas. Isso se deu pelo fato de que a redução de gordura (margarina) empregada durante o preparo dos *cupcakes* diminui a quantidade de bolhas de ar que são incorporadas na massa e se expandem durante o cozimento, resultando no aumento da densidade das migalhas e, conseqüentemente, no aumento da massa (ZAHN; PEPKE; ROHM, 2010).

5.3.2 Análise físico-química

Os resultados obtidos para os teores de umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos, bem como os valores energéticos e pH dos cupcakes estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14. Composição físico-química e valor energético dos cupcakes com (formulação A, B e C) e sem adição de biossurfactante (formulação padrão).

Parâmetro	Formulação padrão	Formulação A (50% biossurf.)	Formulação B (75% biossurf.)	Formulação C (100% biossurf.)
Umidade (%)	26,43 ± 0,28 ^a	26,25 ± 0,35 ^a	20,75 ± 0,07 ^b	19,45 ± 0,21 ^c
Cinzas (%)	2,50 ± 0,02 ^a	2,07 ± 0,01 ^b	1,95 ± 0,00 ^c	1,72 ± 0,03 ^d
Proteínas (%)	6,86 ± 0,00 ^a	6,45 ± 0,08 ^b	4,14 ± 0,01 ^c	3,17 ± 0,02 ^d
Lipídios (%)	19,72 ± 1,94 ^a	18,61 ± 3,25 ^a	19,15 ± 0,49 ^a	22,50 ± 0,56 ^a
Carboidratos (%)	44,88 ± 1,62 ^a	46,60 ± 2,99 ^{a,c}	54,01 ± 0,41 ^b	53,15 ± 0,41 ^{b,c}
Valor energético (kcal)	382,86 ± 10,90 ^a	379,73 ± 17,62 ^a	404,95 ± 2,76 ^{a,b}	427,80 ± 3,53 ^b
pH	8,19 ± 0,01 ^a	6,60 ± 0,00 ^b	6,50 ± 0,00 ^c	6,30 ± 0,00 ^d

Valores na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Conforme descrito na Tabela 14, com relação à umidade, observou-se uma diminuição significativa da mesma entre as três formulações propostas, não havendo diferença significativa entre as formulações padrão e a formulação A. A gordura vegetal empregada na formulação dos cupcakes do presente trabalho, por ser uma emulsão, é composta por uma fase gordurosa e uma fase aquosa, onde cerca de 16% corresponde à água. Como consequência, os cupcakes contendo gordura vegetal na sua composição apresentaram teor maior de umidade em comparação com os cupcakes que continham biossurfactante na formulação. A gordura tem um papel importante na formulação de um cupcake, pois além de agir como emulsificante, atua também na textura e sabor.

Com relação ao teor de cinzas, todas as quatro formulações elaboradas apresentaram estes teores diferentes entre si, sendo observado um declínio no conteúdo destas ao longo da substituição da gordura vegetal pelo biossurfactante. A adição do biossurfactante também atuou significativamente na redução do resíduo mineral fixo, uma vez que a margarina comercial industrializada utilizada nas formulações apresentava cerca de 550mg/100g de produto, representando grande contribuição no percentual de cinzas das amostras. Do mesmo modo, o teor de proteínas diminuiu à medida em que houve o aumento na incorporação do biossurfactante.

Efeito contrário foi observado em relação aos carboidratos, ou seja, o aumento da concentração de biossurfactante a partir de 75% favoreceu o aumento do teor de carboidratos nos cupcakes. Por se tratar de um glicolípido, formado por unidades de carboidratos chamados glicanos (ABDEL-MAWGOUD; STEPHANOPOULOS, 2018), o biossurfactante produzido por *C. bombicola* pode ter contribuído no aumento dos teores de carboidratos do produto formulado.

Não houve diferença significativa entre as formulações quanto aos teores de lipídios encontrado nas amostras dos cupcakes. Considerando que o biossurfactante produzido por *C. bombicola* apresenta natureza glicolípida (LUNA et al., 2016), as formulações (com e sem biossurfactante) apresentaram teores semelhantes no conteúdo em lipídeos. No entanto, é possível notar um aumento dos percentuais de lipídios com o aumento da porcentagem de biossurfactante nos cupcakes devido à natureza lipídica dos soforolipídios (glicolipídios). É importante salientar que cerca de 75% dos ácidos graxos do glicolípido de *C. bombicola* são insaturados (C18:1, C18:2 e C18:3), enquanto que os outros 25% são ácidos graxos saturados (principalmente C16:0), ao contrário da gordura vegetal, que pode apresentar gorduras *trans*, que aumentam os níveis de colesterol e provocam doenças cardiovasculares (CAVENDISH et al., 2009).

O valor energético não variou significativamente entre as formulações padrão, A e B, bem como não houve diferença entre as formulações B e C. Com a substituição da gordura vegetal pelo biossurfactante, a partir de 75%, o teor de carboidratos foi maior, implicando em valores energéticos maiores. Zahn, Pepke e Rohm (2010) relataram a substituição da gordura em *muffins* por carboidratos e obtiveram redução de cerca de 45% no teor de lipídios e, consequentemente, redução do valor calórico do produto.

Com relação ao pH dos cupcakes, houve diminuição quando o biossurfactante foi adicionado à formulação em concentrações crescentes. Isso ocorreu devido ao valor do pH do meio de produção do biossurfactante, que ao final da fermentação atinge valores em torno de 6,2.

Desta forma, a substituição parcial ou total da gordura vegetal pelo biossurfactante produzido por *C. bombicola* URM 3718 não afeta de forma drástica o produto final, indicando a viabilidade de aplicação da biomolécula. Os resultados obtidos nessa pesquisa demonstram a viabilidade de estudos futuros focados no aumento da escala de produção do biossurfactante, bem como na realização de estudos sensoriais visando sua futura e promissora aplicação como aditivo do tipo emulsificante para a indústria de alimentos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem as seguintes conclusões:

- A levedura *C. bombicola* URM 3718 produz um biossurfactante a partir de resíduos agroindustriais com atividade tensoativa e emulsificante adequadas para aplicação como aditivo alimentar.
- O rendimento em biossurfactante obtido é promissor para o aumento da escala de produção do biossurfactante em nível industrial.
- A concentração de biossurfactante é proporcional à estabilidade das emulsões formadas.
- O biossurfactante apresenta estabilidade térmica, podendo ser aplicado em sistemas com elevadas temperaturas sem perda significativa de sua massa.
- O biossurfactante apresenta propriedade antioxidante, tornando-se um potencial aditivo para o setor alimentício.

- O biossurfactante não é adequado para aplicações alimentícias como aditivo com ação bactericida.
- O biossurfactante é atóxico para uso em alimentos frente as condições testadas nessa pesquisa.
- O biossurfactante pode ser utilizado em substituição à gordura vegetal como emulsificante de sobremesas farináceas.
- As propriedades físicas e físico-químicas dos cupcakes formulados com biossurfactante são compatíveis com a formulação padrão.
- O biossurfactante apresenta potencial de utilização como aditivo emulsificante em sistemas alimentares.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; STEPHANOPOULOS, G. Simple glycolipids of microbes: Chemistry, biological activity and metabolic engineering. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 3, 2018, p. 3–19. Doi:10.1016/j.synbio.2017.12.001.
- ADITIVOS alimentares e coadjuvantes de tecnologia. **ANVISA**, 2008. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/aditivos-alimentares-e-coadjuvantes>. Acesso em: 27 de novembro de 2018.
- AKBARI, S.; ABDURAHMAN, N. H.; YUNUS, R. M.; FAYAZ, F.; ALARA, O. R. Biosurfactants - a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, 2018, p. 81-90. Doi: 10.1016/j.biori.2018.09.001.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, 1988, p. 589- 601.
- AL-HAWASH, A. B.; ZHANG, J. LI, S.; LIU, J.; GHALIB, H. B.; ZHANG, X.; MA, F. Biodegradation of n-hexadecane by *Aspergillus* sp. RFC-1 and its mechanism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, 2018, p. 398-408. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.049.
- ALMEIDA, D. G.; SOARES DA SILVA, R. C. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; BANAT, I.M.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016, p. 1718. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01718.
- ANJUN, F.; GAUTAM, G.; EDGARD, G.; NEGI, S. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. **Bioresource Technology**, v. 212, 2016, p. 262-269. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.091.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 17 ed., Washington, DC: 2002.
- BAGES, S.; WHITE, D. A.; WINTERBURN, J. B.; WEBB, C.; MARTIN, P. J. Production and separation of a trehalolipid biosurfactant. **Biochemical Engineering Journal**, v. 139, 2018, p. 85-94. Doi:10.1016/j.bej.2018.07.006.
- BANDYOPADHYAY, K.; CHAKRABORTY, C.; BHATTACHARYYA, S. Fortification of mango peel and kernel powder in cookies formulation. **Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)**, v. 12, 2014, p. 661–664.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Quim Nova**, v. 30, 2007, p. 409-414. Doi: 10.1590/S0100-40422007000200031.
- BASTRZYK, A.; FIEDOT-TOBOLA, M.; POLOWCZYK, I.; LEGAWIEC, K.; PLAZA, G. Effect of a lipopeptide biosurfactant on the precipitation of calcium carbonate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, 2019, p. 145-152. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.009.

BEN AYED, H.; BARDAA, S.; MOALLA, D.; JRIDI, M.; MAALEJ, H.; SAHNOUN, Z.; REBAI, T.; JACQUES, P.; NASRI, M.; HMIDET, N. Wound healing and in vitro antioxidant activities of lipopeptides mixture produced by *Bacillus mojavensis* A21. **Process Biochemistry**, v. 50, 2015, p. 1023–1030. Doi: 10.1016/j.procbio.2015.02.019.

BENTO, F. M.; GAYLARDE C. C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 38, 1996, p.31-33. Doi: 10.1016/S0964-8305(96)00021-2.

BEZERRA, K. G. O.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics. **Biotechnology Progress**, v. 34, 2018, p. 1482-1493. Doi: 10.1002/btpr.2682.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, 1959, p. 911-917. Doi: doi.org/10.1139/o59-099.

BLOIS, M. Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free Radical. **Nature**. v. 181, 1958, p. 1199-1200. Doi: 10.1038/1811199a0.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of aqueous and ethanol plant extracts. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, 2014, p. 218-225. Doi: 10.1590/1808-1657001192012

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, B. FARROKH, C.; FRISAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B. PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y. SCHURE, E. T.; BOVEN, A. V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS S. HANSEN, E. B. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, 2012, 87-97. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030.

BRASIL, **Portaria nº 540** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde, de 27 de outubro de 1997.

BRASIL, **Resolução RDC nº 234** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde, de 19 de agosto de 2002.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GONZÁLEZ- LOPEZ. Application on bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes future prospects- Review. **Science of total environment**, v. 407, 2009, p. 3634-3640. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.07.008.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, 1998, p. 520-529. Doi: 10.1021/bp00020a004.

CAMPOS, J. M.; SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; BANAT, I. M. **Use of (bio)surfactants in foods**. In: Biotechnological Production of Natural Ingredients for Food

Industry. BICAS, J.L.; MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, G.M. (Eds). **Bentham Science Publishers**, v. 1, 2016, p. 435-459. Doi: 10.2174/9781681082653116010014.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; STAMFORD, T. C. M.; SARUBBO, L. A. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. **Toxicology Reports**, v. 2, 2015, p. 1164-1170. Doi: Doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.08.009.

CAMPOS, J. M., STAMFORD, T. L. M., SARUBBO, L. A., LUNA, J. M., RUFINO, R. D.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, 2013, p. 1097–1108. Doi: 10.1002/btpr.1796.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, 2014, p. 3234-3252. Doi: 10.1007/s12010-014-0761-1.

CAVENDISH, T. A.; LEMOS, P. B.; YOKOTA, R. T.; VASCONCELOS, T. F.; CÔELHO, P. F.; BUZZI, M.; ITO, M. K. Composição de ácidos graxos de margarinas à base de gordura hidrogenada ou interesterificada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, 2010, p. 138-142. Doi: 10.1590/S0101-20612010005000018.

CHAKRABARTI, S. Bacterial biosurfactant: characterization, antimicrobial and metal remediation properties. Ph.D. Thesis, National Institute of Technology, Rourkela, India. 2012.

CHAPRÃO, M. J.; FERREIRA, I. N. S.; CORREA, P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SILVA, E. J.; SARUBBO, L. A. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, 2015, p. 471-479. Doi: 10.1016/j.ejbt.2015.09.005.

CHRISTOVA, N.; LANG, S.; WRAY, V.; KALOYANOV, K.; KONSTANTINOV, S.; STOINEVA, I. Production, structural elucidation and in vitro antitumor activity of trehalose lipid biosurfactant from *Nocardia farcinica* strain. **Journal Microbiological Biotechnology**, v. 25, 2015, p. 439–447. Doi:10.4014/jmb.1406.06025.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, 9^o ed, Wayne, CLSI document M02-A10, 2009.

CÖRMET, E. D.; GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, 2018, p. 76-93. Doi: 10.1016/j.foodres.2017.10.056.

CORONEL-LEÓN, J.; GRAU, G.; GRAU-CAMPISTANY, A.; FARFAN, M.; RABANAL, F.; MANRESA, A.; MARQUÉS, A. M. Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. **Annals Microbiology**, v. 65, 2015, p. 2065–2078. Doi: 10.1007/s13213-015-1045-x.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J.; Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas*

aeruginosa L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, 2010, p. 1511-1516. Doi: 10.1016/j.procbio.2010.05.033.

CROSS, N. Muffins and Bagels. In: **Bakery Products – Science and Technology**. Ed. Hui, Y. H. Oxford: Blackwell, pp. 497–518, 2006.

DAS, A. J.; KUMAR, R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. **Bioresource Technology**, v. 260, 2018, p. 233-240. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.093.

DATTA, P.; TIWARI, P.; PANDEY, L. M. Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing and Oil Degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from Formation Water of Assam Oil Reservoir and Its Suitability for Enhanced Oil Recovery. **Bioresource Technology**, v. 270, 2018, p. 439-448. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.047.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, 2004, p. 641-646. Doi: 10.1016/j.crci.2004.04.002.

DOLMAN, B. M.; KAISERMANN, C.; MARTIN, P. J.; WINTERBURN, J. B. Integrated sophorolipid production and gravity separation. **Process Biochemistry**, v. 54, 2016, p. 162-171. Doi: 10.1016/j.procbio.2016.12.021.

EHINMITOLA, E. O.; ARANSIOLA, E. F.; ADEAGBO, O. P. Comparative study of various carbon sources on rhamnolipid production. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 26, 2018, p. 42–48. Doi: 10.1016/j.sajce.2018.09.001.

ELSHAFIE, A. E.; JOSHI, S. J.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-BEMANI, A. S.; AL-BAHRY, S. N.; AL-MAQBALI, D. BANAT, I. M. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015, p. (1324) 1-11. Doi: 10.3389/fmicb.2015.01324.

ELSHIKH, M., FUNSTON, S., CHEBBI, A., AHMED, S., MARCHANT, R., & BANAT, I. M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New Biotechnology**, v. 36, 2017, p. 26–36. Doi: 10.1016/j.nbt.2016.12.009.

FOOD additives. **WHO - World Health Organization**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-additives>. Acesso em: 27 de novembro de 2018.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de Biossurfactante por levedura. **Quim Nova**, v. 31, 2008, p. 2091-2099. Doi: 10.1590/S0100-40422008000800033.

FREITAS, B. G.; BRITO, J. G. M.; BRASILEIRO, P. P. F.; RUFINO, R. D, LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, e1646, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01646>.

GAHRUIE, H. H.; NIAKOUSARI, M. Antioxidant, antimicrobial, cell viability and enzymatic inhibitory of antioxidant polymers as biological macromolecules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, 2017, 606-617. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.021.

GALLERT, C. WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, v. 89, 2002, p. 483-496. Doi: 10.1007/s00114-002-0372-5.

GAUR, V. K.; BAJAJ, A.; REGAR, R. K.; KAMTHAN, M.; JHA, R. R.; SRIVASTAVA, J. K.; MANICKAM, N. Rhamnolipid from a *Lysinibacillus sphaericus* strain IITR51 and its potential application for dissolution of hydrophobic pesticides. **Bioresource Technology**, v. 272, 2019, p. 19-25. Doi:10.1016/j.biortech.2018.09.144.

GEETHA, S. J.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, 2018, p. 23-32. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.01.010.

GIRI, S. S.; SEN, S. S.; JUN, J. W.; SUKUMARAN, V.; PARK, S. C. Role of *Bacillus licheniformis* VS16-derived biosurfactant in mediating immune responses in carp rohu and its application to the food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017, p. 2-13. Doi: 10.3389/fmicb.2017.00514.

GOMES SILVA, J. A.; SILVA, G. C.; FARIAS SILVA, M. G.; FARIAS DA SILVA, V.; AGUIAR, J. S.; GONÇALVES DA SILVA, T.; LEITE, S. P. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 28, 2017, p. 321-326. Doi: 10.5897/AJPP2017.4798

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, 2018, p. 303-311. Doi: 10.1016/j.acthis.2018.03.007

GUDIÑA, E. J. RODRIGUES, A. I.; FREITAS, V.; AZEVEDO, Z.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. **Bioresource Technology**, v. 212, 2016, p. 144-150. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.027.

GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, 2018, p. 298–304. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.11.008.

GUPTA, M.; BAWA, A. S.; ABU-GHANNAM, N. Effect of barley flour and freezethaw cycles on textural nutritional and functional properties of cookies. **Food and Bioprocess Processing**, v. 89, 2011, p. 520–527. Doi: 10.1016/j.fbp.2010.07.005.

HAN, Y.; LIU, E.; LIU, L.; ZHANG, B.; WANG, Y.; GUI, M.; WU, R.; LI, P. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, 2015, p. 230–237. Doi: 10.1016/j.carbpol.2014.08.044.

IONASHIRO, M.; **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**, Giz Editorial: São Paulo, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological Evaluation of Medical Devices: Part 5: Test for Cytotoxicity**, ISO 10.993-5. Geneve, 7p.2013.

JADHAV, J. V.; PRATAP, A. P.; KALE, S. B. Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid. **Process Biochemistry**, v. 78, 2019, p. 15-24. Doi: 10.1016/j.procbio.2019.01.015.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, 2018, 7-11. Doi: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.

JANEK, T.; LUKASZEEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, 2013, p. 379-386. Doi:10.1016/j.colsurfb.2013.05.008.

JIMÉNEZ-PENÁLVER, P.; CASTILLEJOS, M.; KOH, A.; GROSS, R.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; GEA, T. Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, 2018, p. 2735-2747. Doi: 10.1016/j.jclepro.2017.11.138.

KACZOREK, E.; PACHOLAK, A.; ZDARTA, A.; SMULEK, W. The Impact of Biosurfactants on Microbial Cell Properties Leading to Hydrocarbon Bioavailability Increase. **Colloids and Interfaces**, v. 2, 2018, 35. Doi:10.3390/colloids2030035.

KIELISZEK, M.; KOT, A. M.; BZDUCHA-WROBEL, A.; BŁAZEJAK, S.; GIENKA, I.; KURCZ, A. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, p. 185-198, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2017.06.001>

KIRAN, G. S.; NISHANTH, L. A.; PRIYADHARSHINI, S.; ANITHA, K.; SELVIN, J. Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardiopsis* sp. MSA13A. **BMC Biotechnology**, v. 14:48, 2014. Doi: 10.1186/1472-6750-14-48.

KIRAN, G. S.; PRIYADHARSINI, S.; SAJAYAN, A.; PRIYADHARSINI, G. B.; POULOSE, N.; SELVIN, J. Production of lipopeptide biosurfactant by a marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017, p. (1138) 1-11. Doi:10.3389/fmicb.2017.01138

KIRAN, G. S.; SABARATHNAM, B.; SELVIN, J. Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 59, 2010, p. 43-438. Doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00698.x

KIRAN, S.; HEMA, T.A.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN, J.; THOMAS, T.A.; RAVJI, 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, 2009, p. 250-256. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.025.

KOKAL, S. L. Crude oil emulsions a state-of-the-art review. **SPE Production and Facilities**, v. 20, 2005, p. 5-13. Doi: 10.2118/77497-pa.

KOURMENTZA, C.; COSTA, J.; AZEVEDO, Z.; SERVIN, C.; GRANDFILS, C.; DE FREITAS, V.; REIS, M. A. M. *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. **Bioresource Technology**, v. 247, 2017, p. 829-837. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.138.

KUMAR, P. N.; SWAPNA, T. H.; KHAN, M. Y.; REDDY, G.; HAMEEDA, B. Statistical optimization of antifungal iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22 using agro-industrial wastes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, 2017, p. 1722-1740. Doi: 10.1016/j.sjbs.2015.09.014.

LIU, Z.; TIAN, X.; CHEN, Y.; LIN, Y.; MOHSIN, A.; CHU, J. Efficient sophorolipids production *via* a novel *in situ* separation technology by *Starmerella bombicola*. **Process Biochemistry**, v. 81, 2019, p. 1-10. Doi: 10.1016/j.procbio.2018.12.005.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; JARA, A. M. A.T.; BRASILEIRO, P. P. F.; SARUBBO, L. A. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, 2015, p. 413–418. Doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.12.014.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, 2013, p. 202– 209. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.08.00

LUNA, J. M., RUFINO, R. D., SARUBBO, L. A., RODRIGUES, L. R. M., TEIXEIRA, J .A. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Current Microbiology**, v. 62, 2011, p. 1527–1534. Doi: 10.1007/s00284-011-9889-1.

LUNA, J. M.; SANTOS, F. A. S.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Production of biosurfactant from *Candida bombicola* URM 3718 for environmental applications. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, 2016, p. 583-588. Doi: 10.3303/CET1649098.

LUO, X.; ZHOU, Y.; BAI, L.; LIU, F.; ZHANG, R.; ZHANG, Z.; ZHENG, B.; DENG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Production of highly concentrated oil-in-water emulsions using dual-channel microfluidization: Use of individual and mixed natural emulsifiers (saponin and lecithin). **Food Research International**, v. 96, 2017, p. 103–112. Doi: 10.1016/j.foodres.2017.03.013.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, 2000, p. 625-633. Doi: 10.1007/s002530000443.

MARCELINO, P. R. F.; PERES, G. F. D.; TERÁN-HILARES, R.; PAGNOCCA, F. C.; ROSA, C. A.; LACERDA, T. M.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Biosurfactants production by

yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops and Products**, v. 129, 2019, p. 212-223. Doi: 10.1016/j.indcrop.2018.12.001.

MARTINS, P. C.; MARTINS, V. G. Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, 2018, p. 10-16. Doi: 10.1016/j.ibiod.2017.11.005.

MARQUES, A.; PINAZO, A.; FARFAN, M.; ARANDA, F.; TERUEL, J.; ORTIZ, A.; MANRESA, A.; ESPUNY, M. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 158, 2009, p. 110-117. Doi: 10.1016/j.chemphyslip.2009.01.001

McCLEMENTS, D. J.; GUMUS, C. E. Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 234, 2016, p. 3-26. Doi: 10.1016/j.cis.2016.03.002.

MERGHNI, A.; DALLEL, I.; NOUMI, E.; KADMI, Y.; HENTATI, H.; TOBJI, S.; AMOR, A.; 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, 2017, p. 84-89. Doi: 10.1016/j.micpath.2017.01.017.

MNIF, I.; BESBES, S.; ELLOUZE, R.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Improvement of bread quality and bread shelf-life by *Bacillus subtilis* biosurfactant addition. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, 2012, p.1105–1112. Doi: 10.1007/s10068-012-0144-8

MNIF, I.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Glycolipid biosurfactants, main classes, functional properties and related potential applications in environmental biotechnology. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, 2017, p. 2192-2206. Doi: 10.1007/s10924-017-1076-4.

MONTEIRO, A. S.; BONFIM, M. R. Q.; DOMINGUES, V. S.; CORRÊA JÚNIOR, A.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L.; SANTOS, V. L. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 5186-5193. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.041.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, 1983, p. 55-63. Doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications of biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, 2005, p.183-198. Doi: 10.1016/j.envpol.2004.06.009.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production, and application. **Current Science**, v. 94, 2008, p. 736–747.

NGUYEN, T. T. L.; EDELEN, A.; NEIGHBORS, B.; SABATINI, D. A. Biocompatible lecithin-based microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: Formulation

and potential applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 348, 2010, p. 498-504. Doi: 10.1016/j.jcis.2010.04.053.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, 2007, p. 252-259. Doi: 10.1016/j.tifs.2007.01.002.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant producing using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, 2004, p. 81-85. Doi: 10.1590/S1517-83822004000100013.

NITSCHKE, M.; SILVA, S. S. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, 2017, p. 631-638. Doi: 10.1080/10408398.2016.1208635.

NOOR AZIAH, A. A.; MOHAMAD NOOR, A. Y.; HO, L.-H. Physicochemical and organoleptic properties of cookies incorporated with legume flour. **International Food Research Journal**, v. 19, 2012, p. 1539–1543. Doi: 10.13140/2.1.4554.8164

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANC, I. W. L.; FÉLIZ, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; GIROA, M. E. A.; MELO, V. M. M. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, 2013, p. 34-43. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.06.011.

OLIVEIRA, J. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, 2013, p. 155-160. Doi: 10.1590/S1516-89132013000100020.

ONAOLOPO, A. Y.; ONAOLOPO, O. J. Food additives, food and the concept of ‘food addiction’: Is stimulation of the brain reward circuit by food sufficient to trigger addiction? **Pathophysiology**, v. 25, 2018, p. 263-276. Doi: 10.1016/j.pathophys.2018.04.002.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008, p. 301-307. Doi: 10.1590/S0102-695X2008000200026.

PACHECO, G. J.; CIAPINA, E. M. P.; GOMES, E. B.; JUNIOR N. P. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, 2010, p. 685-693. Doi: 10.1590/S1517-83822010000300019.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, S.; CAMEOTRA, S.S. Environmental of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, 2011, p.633-654. Doi: 10.3390/ijms12010633.

PATINO, J. M. R.; SÁNCHEZ, C. C.; NIÑO, M. M. R. Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 140, 2008, p. 95-113. Doi: 10.1016/j.cis.2007.12.007.

PATOWARY, K.; PATOWARY, R.; KALITA, M. C.; DEKA, S. Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil as Sole Source of Carbon. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. Doi:10.3389/fmicb.2017.00279.

PELE, M. A.; RIBEAUX, D. R.; VIEIRA, E. R.; SOUZA, A. F.; RODRÍGUEZ, D. M.; ANDRADE, R. F. S.; ALVIANO, D. S.; SILVA, C. S. A.; BARRETO-BERGTER, E.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2018. Doi: 10.1016/j.ejbt.2018.12.003.

PIETRO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, 1999, p. 337-341. Doi: 10.1006/abio.1999.4019.

PINTO, M. I. S.; RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; SANTOS, V. A.; LUNA, J. M. Production in bioreactor, toxicity and stability of a low-cost biosurfactant. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, 2018, p. 595-600. Doi: 10.3303/CET1864100.

PRASANNA, P. H. P.; BELL, A.; GRANDISON, A. S. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subs. *Infantis* and CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, 2012, p. 533-540. Doi: 10.1016/j.carbpol.2012.05.075

RADHAKRISHNAN, N.; KAVITHA, V.; MADHAVACHARYULU, E.; GNANAMANI, A.; MANDAL, A. B. Isolation, production and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria of coastal Tamil Nadu. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 40, 2011, p. 76-82.

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants- Review. **Biotechnology**, v. 7, 2008, p. 360-370. Doi: 10.3923/biotech.2008.360.370.

RANASALVA, N.; SUNIL, R.; POOVARASAN, G. Importance of Biosurfactant in Food Industry. In: *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 2014, p. 6-9. e-ISSN: 2319-2380.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 26, 1999, p.1231-1237. Doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

REIS, C. B. L.; MORANDINI, L. M. B.; BEVILACQUA, C. B.; BUBLITZ, F.; UGALDE, G.; MAZUTTI, M. A.; JACQUES, R. J. S. First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, 2018, p. 185-192. Doi: 10.1016/j.bjm.2018.04.004.

RIBEIRO, B. G.; SANTOS, M. M.; PINTO, M. I. S.; MEIRA, H. M.; DURVAL, I. J. B.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Production and optimization of the extraction conditions of the biosurfactant from *Candida Utilis* UFPEDA1009 with potential application in the food industry. *Chemical Engineering Transactions*, v. 74, 2019, 1477-1482. Doi: 10.3303/CET1974247.

ROCHA E SILVA, N. M. P.; MEIRA, H. M.; ALMEIDA, F. C. G.; SILVA, R. C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry. **Separation & Purification Reviews**, v. 47, 2018, p. 1-15. Doi: 10.1080/15422119.2018.1474477.

ROCHA E SILVA, F. C. P.; ROQUE, B. A. C.; ROCHA E SILVA, N. M. P.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M.; SARUBBO, L. A. Yeasts and bacterial biosurfactants as demulsifiers for petroleum derivative in seawater emulsions. **AMB Express**, v. 7, 2017, DOI: 10.1186/s13568-017-0499-6.

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 Petroleum Science Engineering**, v. 109, 2013, p. 117-122. Doi:10.1016/j.petro.2013.08.014.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; BENICIO, B. N.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Experimental design for the production of tension-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, 2008, p. 907-914. Doi: 10.1007/s10295-008-0364-3.

RULLI, M. M.; ALVAREZ, A.; FUENTES, M. S.; COLIN, V. L. Production of a microbial emulsifier with biotechnological potential for environmental applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, 2019, 459-466. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.052.

SALEK, K.; EUSTON S. R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. **Process Biochemistry**, v. 85 p. 143–155, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.027>

SALIHU, A.; ABDULKADIR, I.; ALMUSTAPHA, M.N. An investigation for potential development on biosurfactants. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, 2009, p. 111-117.

SANTOS, D. K. F.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, 2016, p. 401-430. Doi: 10.3390/ijms17030401.

SANTOS, D. K. F.; MEIRA, H. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process Biochemistry**, v. 54, 2017, p. 20-27. Doi: 10.1016/j.procbio.2016.12.020.

SANTOS, E. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.. SARUBBO, L. A. Production of a new lipoprotein biosurfactant by *Streptomyces* sp. DPUA1566 isolated from

lichens collected in the Brazilian Amazon using agroindustry wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, 2019, p. 142-150. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.10.014.

SARAFIN, Y.; DONIO, M. B.; VELMURUGAN, S.; MICHAELBABU, M. CITARASU, T. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing holophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal Biological Science**, v. 21, 2014, p. 511-519. Doi:10.1016/j.sjbs.2014.01.001.000

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. P. C.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, 2001, p. 59-67. Doi: 10.1385/ABAB:95:1:59.

SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, 1999, p. 423-426. Doi: 10.1139/w99-025.

SARUBBO, L. A.; ROCHA JUNIOR, R. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, 2015, p. 707-723. Doi: 10.1080/02757540.2015.1095293.

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, 2010, p. 436-450. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.006.

SATPUTE, S. K.; ZINJARDE, S. S.; BANAT, I. M. *Recent updates on biosurfactant/s in Food industry*. In: Microbial Cell Factories. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2018, pp. 1-20. ISBN 9781138061385.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, 2015, p. 111-125. Doi: 10.1016/j.jff.2015.01.043.

SENA, H. H.; SANCHES, M. A.; ROCHA, D. F. S.; SEGUNDO, W. O. P. F.; SOUZA, E. S.; SOUZA, J. V. B. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, 2018, p. 1-8. Doi: 10.1155/2018/5684261.

SHAH M. U. H.; SIVAPRAGASAM M.; MONIRUZZAMAN, M; TALUKDER, M. M. R.; YUSUP, S. B.; GOTO, M. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 127, 2017, p. 60-67. Doi: 10.1016/j.bej.2017.08.005.

SHARMA, D. Applications of Biosurfactants in Food. In: *Biosurfactants in Food, SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition*, D. Sharma (ed.), 2016, p. 43-80. Doi: 10.1007/978-3-319-39415-2_3.

SHARMA, G.; SHARMA, S.; KUMAR, A.; AL-MUHTASEB, S. H.; NAUSHAD, M. GHFAR, A. A.; MOLA, G. T.; STADLER, F. J. Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A Review. *Carbohydrate Polymers*, v. 199, 2018, p. 534-545. Doi: 10.1016/j.carbpol.2018.07.053.

SILVA, E. J.; CORREA, P. F.; ALMEIDA, D. G.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, 2018, p. 127-135. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.034.

SILVA, R. C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; LUNA, J. M., RUFINO, R. D., SANTOS, V. A., SARUBBO, L. A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, 2014, p. 12523-12542. Doi: 10.3390/ijms150712523.

SILVA, R. C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; MEIRA, H. M.; SILVA, E. J.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, 2017, p. 206-215. Doi: 10.1016/j.bcab.2017.09.004.

SINGH, P.; TIWARY, B. N. Isolation and characterization of glycolipid biosurfactant produced by a *Pseudomonas otitidis* strain isolated from Chirimiri coal mines, India. **Bioresources Bioprocessing**, v. 3, 2016, p. 1-16. Doi: 10.1186/s40643-016-0119-3. SKRBIC, B.; CVEJANOV, J. The enrichment of wheat cookies with high-oleic sunflower seed and hull-less barley flour: Impact on nutritional composition, content of heavy elements and physical properties. **Food Chemistry**, v. 124, 2011, p. 1416–1422. Doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.101.

SOBRINHO, H. B. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SALGUEIRO, A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LEITE, L. F. C.; SARUBBO, L. A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, 2008, p. 912-917. Doi: 10.1016/j.procbio.2008.04.013.

SODAGARI, M.; INVALLY, K.; JU, L. Maximize rhamnolipid production with low foaming and high yield. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 110, 2017, p. 79-86. Doi:10.1016/j.enzmictec.2017.10.004.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; UKNALIS, J. Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 136, 2017, p. 21-29. Doi: 10.1016/j.mimet.2017.02.012.

SOUZA, K. S. T.; GUDINA, E. J.; AZEVEDO, Z.; FREITAS, V.; SCHWANA, 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, 2017, p. 373-382. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.041.

TABBENE, O.; GHARBI, D. SLIMENE, I. B.; ELKAHOUI, S.; ALFEDDY, N. M.; COSETTE, P.; MANGONI, M. L.; JOUENNE, T.; LIMAM, F. Antioxidative and DNA

protective effects of bacillomycin D-like lipopeptides produced by b38 strain. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 168, 2012, p. 2245-2256. Doi: 10.1007/s12010-012-9933-z.

VADIVEL, V.; STUETZ, W.; SCHERBAUM, V.; & BIESALSKI, H. K. Total free phenolic content and health relevant functionality of Indian wild legume grains: Effect of indigenous processing methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, 2011, p. 935–943. Doi:10.1016/j.jfca.2011.04.001.

VANDANA, P.; SINGH, D. Review on biosurfactant production and its application. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, 2018, p. 4228-4241. Doi: 10.20546/ijcmas.2018.708.443.

VAN-HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, 2006, p. 604-620. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.08.001.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, 2017, p. 389-397. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.02.047.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, 2015, p. 181-192. Doi: 10.3923/jm.2015.181.192.

WILLIAMS, W.; TRINDADE, M. T. C. **Functional Metagenomics: Tools and Applications**. Springer International Publishing AG, T.C. Charles, M.R. Liles, A. Sessitisch (eds.), 2017, 253 p.

WOLF, D. C.; GAN, J. Influence of rhamnolipid biosurfactant and Brij-35 synthetic surfactante on ¹⁴C-Pyrene mineralization in soil. **Environmental Pollution**, v. 243, 2018, p. 1846-1853. Doi: 10.1016/j.envpol.2018.10.031.

YAN, X.; GU, S.; CUI, X.; SHI, Y.; WEN, S.; CHEN, H.; GE, J. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, 2019, p. 12-20. Doi: 10.1016/j.micpath.2018.11.039.

YALÇIN, E.; ÇAVUŞOĞLU, K. Structural analysis and antioxidant activity of a biosurfactant obtained from *Bacillus subtilis* RW-I. **Turkish Journal Biochemistry**. v. 35, 2010, p. 243–247.

YULIANI, H.; PERDANI, M. S.; SAVITRI, I.; MANURUNG, M.; SAHLAN, M.; WIJANARKO, A.; HERMANSYAH, H. Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. **Energy Procedia**, v. 153, 2018, p. 274-278. Doi: 10.1016/j.egypro.2018.10.043.

ZAHN, S.; PEPKE, F.; ROHM, H. Effect of inulin as a fat replacer on texture and sensory properties of muffins. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, 2010, p. 2531–2537. Doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02444.x.

ZOUARI, R.; BESBES, S.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI-AYDI, D. Cookies from composite wheat–sesame peels flours: Dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. **Food Chemistry**, v. 194, 2016, p. 758-769. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.064.