



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



ANEXO I – PLANO DE TRABALHO

O presente Plano de Trabalho é parte integrante do Acordo de Cooperação nº 01/2020, nº processo UEL 19813.2019.40.

Título do projeto	Produção de soforolipídeos por <i>Candida bombicola</i> para aplicação cosmética e industrial
Resumo do projeto	<p>Os soforolipídios são biossurfactantes produzidos principalmente pela levedura <i>Candida bombicola</i> e apresentam propriedades semelhantes aos surfactantes de origem petroquímica, com vantagens como: baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, alta seletividade e atividade específica em condições extremas de temperatura, pH e salinidade. Esses compostos apresentam potencial para aplicações em diversas áreas como: biorremediação, alimentos, cosméticos, fármacos entre outras.</p> <p>A barreira econômica ainda é a produção em larga escala, que se torna um obstáculo para se tornarem competitivos no mercado. Para superar este obstáculo algumas estratégias básicas podem ser utilizadas, como o uso de substratos com menor custo e desenvolvimento de processo fermentativo eficiente. Assim, a otimização do meio e das condições de cultivo, por metodologia estatística, permite o aprimoramento e aperfeiçoamento de produtos e processos, aumentando a produtividade e reduzindo os custos.</p> <p>O objetivo deste projeto é estudar a síntese de soforolipídios de <i>Candida bombicola</i> utilizando diferentes substratos, caracterizar as estruturas produzidas, assim, direcionando-os para a aplicação cosmética e industrial, desenvolvendo dados para a mudança de escala de produção e estudo de aplicações.</p>
Proponente do projeto	Prf ^a . Dra Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi
Instituição de Execução	Laboratório de Pesquisa do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina

Instituição financiadora	AQIA QUIMICA INDUSTRIAL LTDA.
Período de vigência	24 (vinte e quatro) meses

1. Identificação da proposta

1.1. Título da proposta

Produção de soforolipídeos por *Candida bombicola* para aplicação cosmética e industrial

1.2. Financiamento total

Valor: R\$97.680,00 (noventa e sete mil e seiscentos e oitenta reais)

1.3. Nome do coordenador

Dr.^a Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

1.4. Nome dos partícipes (pesquisadores)

- M.^a Gabrielly Terassi Bersaneti – Aluna de doutorado no Programa de Biotecnologia – Depto. Bioquímica e Biotecnologia – CCE/UEL.
- M.^a Victória Akemi Itakura Silveira – Aluna de doutorado no Programa de Biotecnologia – Depto. Bioquímica e Biotecnologia – CCE/UEL.
- M.^a Talita de Oliveira Caretta – Aluna de doutorado no Programa de Biotecnologia – Depto. Bioquímica e Biotecnologia – CCE/UEL.

1.5. Setor/Área

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

1.6. Período previsto para execução do projeto

24 (vinte e quatro) meses

2. Justificativa da proposta

Soforolipídios são biossurfactantes da classe dos glicolipídios, constituídos por um dissacarídeo soforose (2'-O-β-Dglicopiranosil-1-β-D-glicopiranosose) e uma cadeia longa de ácido graxo ligado ao carbono 1 da glicose (frequentemente com 16 ou 18 carbonos) (SOLAIMAN; ASHBY; UKNALIS, 2017). São produzidos principalmente pela levedura não patogênica *Candida bombicola*, também chamada de *Starmerella bombicola* (PAULINO et al., 2016). As vantagens relacionadas aos soforolipídios dizem respeito à baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (PINTO et al., 2018).

A biossíntese de SLPs ocorre na fase estacionária sob limitação de nitrogênio e de forma dissociada do crescimento celular (KIM; YUN; KIM, 2009). São produzidos como uma complexa mistura, contendo de 20 a 40 tipos de moléculas e isômeros associados (SMYTH et al., 2010). Esta mistura é formada principalmente pelas formas acídica e lactônica (GLENNS; COOPER, 2006), com diversas variações estruturais como grau de acetilação da sefarose, posição do grupo acetil na soforose, comprimento da cadeia e grau de instauração do ácido graxo e



posição do grupo acetil na porção do ácido graxo (SHAO et al., 2012). Formas diméricas e triméricas de SLPs também foram relatadas (PRICE et al., 2012).

A produção é aumentada quando ambas fontes de carbono primária (substratos hidrofílicos) e secundária (substratos hidrofóbicos) são fornecidas ao meio (ASMER et al., 1988;; VANDECASTEELE, 1992). Quanto aos ácidos graxos adicionados ao meio afetam diretamente a produção dos soforolipídios, e de acordo com Felse et al. (2007), a produção é inversamente proporcional ao número de insaturações de sua fonte hidrofóbica. Dentre os ácidos graxos, o ácido oleico (C18:1) é considerado o melhor substrato lipídico para a produção (GUPTA, 2012), porém os soforolipídios produzidos com fonte oleosa de ácido palmítico entre outros pode apresentar propriedades diferentes (OLANYA, et al. 2017).

Além das fontes de carbono, as fontes de nitrogênio e ambientais (temperatura, tempo, pH e oxigenação), bem como o tipo de processo fermentativo empregado (batelada, batelada alimentada, contínua) interferem no tipo de produção e na proporção das formas acídicas e lactônicas produzidas (OLIVEIRA, 2017).

Os SLPs possuem um grande potencial para aplicações em diversas áreas como: biorremediação (XIA; YAN, 2010); indústria alimentícia (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011); cosmetologia (detergentes, umectantes, emulsionantes, solubilizantes, dispersantes e formação de espuma) (NGUYEN et al., 2010, GHARAEI-FATHABAD, 2010); farmacêutica (agente citotóxico (SHAH et al., 2005), anti-inflamatório (SLEIMAN et al., 2009), atividade antimicrobiana (SHAH; BADIA; RATSEP, 2007), atividade Anti-HIV e espermicida (SHAH et al., 2005), imunomoduladora (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011) e carreadores de genes (GHARAEI-FATHABAD, 2010).

Apesar das inúmeras vantagens e aplicações que os biossurfactantes possuem sobre os surfactantes sintéticos, a produção em larga escala e o custo relativamente elevado ainda são um grande obstáculo para a competitividade econômica (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Os altos custos devem-se principalmente ao uso de meios de cultura sintéticos e ao processo de downstream que pode chegar a representar 60% dos custos totais do processo fermentativo (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Nos processos fermentativos industriais a otimização do meio e condições de cultivo são fatores essenciais e críticos afetando diretamente a concentração, produção, produtividade e custos do metabólito que se deseja produzir (WANG; CHIU; HSIEH, 2009; LIU, et al., 2005). A tradicional estratégia de otimização (meios e condições de cultivo) passo a passo (fator a fator) é um processo lento, dispendioso e trabalhoso, além de frequentemente falhar em localizar a região ótima/máxima de produção devido a interação multifatorial em diversos níveis e dos efeitos dos fatores que não são considerados (LIU, et al., 2005; PENG; YANG; ZHANG, 2005).

A otimização estatística através das técnicas de planejamento fatorial e a análise de superfícies de respostas fornecem uma eficiente abordagem na otimização dos processos fermentativos, sendo ultimamente utilizadas por diversos autores (KU; TSAI; PAN, 2009). Estas técnicas permitem aprimorar e aperfeiçoar produtos e processos, reduzindo os custos de desenvolvimento e aumentando a produção, pois diminuem o número de ensaios na etapa de desenvolvimento e avaliam as interações entre os diversos fatores, com isso, obtêm-se níveis ótimos de produção, produtividade e redução de custos (KU; TSAI; PAN, 2009).

Considerando-se: as diversas vantagens que os biossurfactantes apresentam sob os surfactantes; o amplo campo de aplicação dos SLPs; os altos custos para a produção em larga escala e a ampla disponibilidade de matéria prima. O presente estudo tem por objetivo



otimizar a produção de soforolipídios por *Candida bombicola* (ATCC® 22214™) utilizando diferentes substratos, por técnicas de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta.

As empresas parceiras Glyom Pesquisa e Síntese LTDA, com cooperação da Aqia Química Qndustrial LTDA, têm um elevado potencial no desenvolvimento de ingredientes para o mercado de cosméticos e higiene pessoal, é uma indústria química 100 % nacional com amplo portfólio desde 1984. É uma empresa multinacional presente em mais de 20 países. Tem como missão, pesquisa e desenvolvimento de insumos cosméticos, farmacêuticos e de reposição nutricional, aplicando tecnologias inovadoras a partir de materiais seguros e renováveis, promovendo a beleza e o bem-estar dos consumidores.

Apresenta também em seu portfólio uma linha completa de ingredientes que traz inovações e soluções para o mercado de cuidados pessoais com produtos e matérias-primas adequadas para atender a sua formulação, incluindo as linhas: Hair care, Skin care, Coffe, Micronizados funcionais, Skincolor, Oleoquímicos, Bioex, Bioextract, Proteínas, Bases, Ingredientes funcionais.

3. Objetivo geral

Estudar os efeitos de diferentes substratos e condições de cultivo para a produção de soforolipídios *Candida bombicola* ATCC 22214 e desenvolver os parâmetros e ados para mudança de escala de produção, utilizando metodologia estatística.

3.1. Objetivos específicos

- Estudar a produção de soforolipídios variando os parâmetros de fermentação;
- Selecionar substrato com maior potencial para produção;
- Testar diferentes fontes lipídicas vegetais (castanha do Brasil, cupuaçu; buriti, pequi, argan, café entre outras quanto à produção por metodologia estatística);
- Quantificar e caracterizar os soforolipídios produzidos nas diversas condições;
- A melhor condição será avaliada em biorreator de bancada variando a oxigenação, aeração e pH e temperatura;
- Determinar, separar e caracterizar os soforolipídios produzidos na condição otimizada.
- Desenvolver dados para a mudança de escala de produção
- Estudar as possíveis aplicações

4. Métodos de atuação

Toda metodologia descrita no plano de trabalho será desenvolvida na Universidade Estadual de Londrina, no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia do Centro de Ciências Exatas. Podendo ser utilizada as dependências da empresa para desenvolver possíveis

aplicações com os soforolipídios, um biossurfactante natural com propriedades desejáveis para diferentes setores industriais, com participação do capital intelectual da UEL e da GLYOM.

4.1 Microorganismo e inóculo

O microrganismo utilizado na produção de soforolipídios foi a levedura *Candida bombicola* ATCC 22214, obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA. Meio de preservação em g/L: glicose 10, extrato de levedura 3, peptona 5, extrato de malte 3 e ágar 20. Meio de ativação em g/L: glicose 100, extrato de levedura 10 e ureia 1. Meio de pré-inóculo em g/L: glicose 77,5, extrato de levedura 2,5 e ácido oleico 75 (MINUCELLI et al., 2017).

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

4.2 Produção de soforolipídios

A produção será realizada em concentrações estabelecidas por planejamento Box Behnken 3³ com 12 combinações, três repetições dos pontos centrais, consistindo em 15 ensaios. As variáveis e os níveis testados serão: fonte hidrofóbica (X_1) com os níveis 25, 75 e 125 g.L⁻¹; fonte hidrofílica (X_2) de 10, 55 e 100 g.L⁻¹ e agitação (X_3) 50, 150 e 250 g.L⁻¹, temperatura será fixa a 30°C por 120 h.

As análises estatísticas serão realizadas utilizando o software Statistica 9,0 e diferenças serão consideradas quando p valor for <0,05.

4.3 Fermentação em biorreator de bancada

A condição otimizada será transferida para uma fermentação utilizando biorreator de bancada (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda.) com capacidade de 5,0 L com volume operacional de 4 L do meio de fermentação. O inóculo será de 10 % (v/v), 30 °C, taxa de aeração 1,0 vvm e agitação de 300 rpm. Amostras serão retiradas a cada 12 horas, centrifugadas a 9956 × g por 15 min a 4 °C. A partir das amostras serão quantificados os soforolipídios, crescimento celular e consumo de açúcares. Ao final da fermentação, os soforolipídios produzidos serão separados, purificados e caracterizados.

4.4 Determinações bioquímicas

4.4.1 Quantificação de Biomassa

O meio será centrifugado a 9956 g x 15 min a 4° C. Do sobrenadante serão determinados os açúcares residuais. A biomassa será quantificada gravimetricamente por peso seco a 70 °C.

4.4.2 Quantificação dos soforolipídios

Os soforolipídios serão extraídos do meio de fermentação, após centrifugação para a retirada da biomassa, com acetato de etila (1:1 v/v) 3 vezes em funil de separação. A fase aquosa será descartada e na fase orgânica será adicionado metanol e água (4:1 v/v) e posteriormente hexano com metanol e água (1:1 v/v), formando duas fases, a fase superior (hexânica) contendo a gordura residual e a inferior (metanólica) os soforolipídios. Na fase com soforolipídios serão efetuadas mais 3 lavagens, com acetato de etila e água (1:3 v/v), com



intervalos de 40 min cada a 4°C. O SL será seco em estufa até eliminação completa do solvente e liofilizado (MINUCELLI et al., 2017).

As quantificações dos sofrorolipídios serão realizadas por gravimetria (MINUCELLI et al., 2017) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em comparação com o padrão 1',4"-sophorolactona 6', 6"-diacetato (Sigma Aldrich, USA), utilizando detector de arranjo de iodo, utilizando coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] C18 da Shimadzu (4,6 x 250mm; 4,6mm; 12nm) e fase móvel em gradiente composto por 30% de acetonitrila e 70% de água por 5 minutos, aumentando para 80% de acetonitrila e 20% de água por 50 minutos (HU; JU, 2001; WADEKAR et al., 2012).

4.5. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas serão realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, Inc., USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. Resultados esperados

Para a pesquisa que será desenvolvida na UEL espera-se otimizar a produção de sofrorolipídeos por *Candida bombicola* utilizando diferentes substratos promovendo aumento de produção, diminuição de custos e impactos ambientais no processo fermentativo. Também conhecer esses metabólitos para futura aplicação cosmética e industrial, através do levantamento de dados para o escalonamento para planta piloto e industrial, e o estudo de novas aplicações do sofrorolipídeo. Além disso, espera-se que a pesquisa resulte em um pedido de patente para a proteção da propriedade intelectual desenvolvida e posterior licenciamento para a empresa GLYOM.

Para a pesquisa relacionada à empresa espera-se desenvolver novas aplicações para este metabólito, visando incorporá-lo em produtos para aumentar o valor econômico, e que venham a contribuir para a sociedade, trazendo benefícios aos consumidores. Os possíveis riscos podem ser associados por atrasos na entrega de reagentes e quebra de equipamentos.

6. Cronograma detalhado

ATIVIDADES (MESES)	1 a 6	7 a 12	13 a 18	19 a 24
Seleção de Substratos	X	X		
Padronizações	X	X	X	
Fermentações		X	X	
Otimizações			X	X
Métodos analíticos	X	X	X	X
Extrações		X	X	X
Purificações			X	X
Caracterizações			X	X
Análises dos resultados		X	X	X

Leal



9. Percentual de participação

De acordo com a contribuição das partes no desenvolvimento do objeto desta cooperação, a UEL terá 50 % (cinquenta por cento), a GLYOM 25 % (vinte e cinco por cento) e a AQIA 25 % (vinte e cinco por cento) da titularidade da propriedade intelectual resultantes.

10. Se houver recursos

10.1. Justificativa entre os custos e os resultados

O recurso financeiro influenciará positivamente a pesquisa na medida em que as pesquisadoras receberão bolsas mensais como incentivo à pesquisa, podendo se dedicar exclusivamente ao projeto, o que, conseqüentemente, garantirá maior êxito nos resultados. Não apenas isso, bem como também irá proporcionar a aquisição de material de consumo essencial para a elaboração e estruturação da pesquisa.

10.2. Orçamento detalhado em planilha

Mês	Bolsa pesquisador	Bolsa de estudos	Material de consumo	FAUEL (10%)
01	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
02	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
03	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
04	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
05	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
06	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
07	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
08	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
09	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
10	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
11	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
12	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
13	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
14	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
15	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
16				

	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
17	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
18	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
19	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
20	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
21	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
22	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
23	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
24	1.500,00	1.200,00	1.000,00	370,00
Total	36.000,00	28.800,00	24.000,00	8.880,00

VALOR MENSAL DO PROJETO	
<i>Bolsa pesquisador</i>	1.500,00
<i>Bolsa apoio técnico</i>	1.200,00
<i>Material de consumo</i>	1.000,00
<i>Taxa FAUEL (10%)</i>	370,00
TOTAL MENSAL	4.070,00 (quatro mil e setenta reais)

VALOR TOTAL DO PROJETO	
<i>Bolsa pesquisador</i>	36.000,00
<i>Bolsa apoio técnico</i>	28.800,00
<i>Material de consumo</i>	24.000,00
<i>Taxa FAUEL (10%)</i>	8.880,00
TOTAL FINAL	97.680,00 (noventa e sete mil seiscientos e oitenta reais)

10.3. Cronograma de desembolso

Os recursos da tabela acima (10.2) serão pagos até o dia 05 de cada mês.

10.4. Plano de aplicação dos recursos financeiros

- 01 (uma) Bolsa de pesquisador
 - Valor: R\$1500,00/mês (mil e quinhentos reais por mês)
- 01 (uma) Bolsa de apoio técnico
 - Valor: R\$1200,00/mês (mil e duzentos reais por mês)
- Material de consumo
 - Valor: 1.000,00/mês (mil reais por mês)

10.5. Indicação da fonte de recursos

Os recursos acima descritos serão derivados do fluxo de caixa da empresa AQIA.

11. Referências

ASMER, H.J., et al. Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion of Sophorose Lipids. **JAACS**, v.65, n.9, p.1460-1466, 1988.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review. **Am. J. Drug Discovery Dev**, p. 1–11, 2010.

GLENNS, R. N.; COOPER, D. G. Effect of substrate on sophorolipid properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 2, p. 137–145, fev. 2006.

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

KIM, Y.-B.; YUN, H. S.; KIM, E.-K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. **Bioresource technology**, v. 100, n. 23, p. 6028–32, dez. 2009.

KU, TW; TSAI, RL; PAN, TM. A simple and cost-saving approach to optimize the production of subtilisin NAT by submerged cultivation of *Bacillus subtilis* natto. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 1, p. 292–6, 2009.

LIU, J. et al. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. **Process Biochemistry**, v. 40, n.8, p. 2757–2762, jul. 2005.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 5, jan. 2011.

MINUCELLI, T., RIBEIRO-VIANA, R. M., BORSATO, D., ANDRADE, G., CELY, M. V. T., DE OLIVEIRA, M. R., CELLIGOI, M. A. P. C. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. **Waste and Biomass Valorization**, 8(3), 743–753. 2017.

NGUYEN, T. T. L. et al. Biocompatible lecithin-based microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: formulation and potential applications. **Journal of colloid and interface science**, v. 348, n. 2, p. 498–504, 15 ago. 2010.

OLANYA, O. M., UKUKU, D. O., SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D., NIEMIRA, B. A., & MUKHOPADHYAY, S. Reduction in *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and on tomato by sophorolipid and sanitizer as affected by temperature and storage time. **International Journal of Food Science and Technology**, 53(5), 1303–1315. 2018

OLIVEIRA, M. R. et al. Sophorolipids a promising biosurfactant and its applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v.6, p.161-174, 2015 .

OLIVEIRA, M.R. **Produção de sofrolipídeos por células imobilizadas de *Candida bombicola***

ATCC22214 em Alginato de Cálcio. 185p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2017.

PAULINO, B. N. et al. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 24, p.10265-10293, 2016.

PINTO, M. I. S. et al. Production in Bioreactor, Toxicity and Stability of a Low-cost Biosurfactant. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 595-600, 2018.

PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 126-32, 2005.

PRICE, N. P. J. et al. Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of Candida yeast. **Carbohydrate research**, v. 348, p. 33–41, 1 fev. 2012.

RIBEIRO, I. A et al. Optimization and correlation of HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS methods for identification and characterization of sophorolipids. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 899, p. 72–80, 15 jun. 2012.

SAHARAN, B.; SAHU, R.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genet Eng Biotechnol J**, v. 2011, p. 1–14, 2011.

SHAH, V. et al. Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4093–100, out. 2005.

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

SHAO, L. et al. Bioactivities of sophorolipid with different structures against human esophageal cancer cells. **The Journal of surgical research**, v. 173, n. 2, p. 286–91, abr. 2012.

SLEIMAN, J. N. et al. Sophorolipids as antibacterial agents. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 39, n. 1, p. 60–3, jan. 2009.

SMYTH, T. J. et al. Directed microbial biosynthesis of deuterated biosurfactants and potential future application to other bioactive molecules. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1347–54, jul. 2010.

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**, 136, 21–29. 2017.

WANG, JK; CHIU, HH; HSIEH, C-S. Optimization of the medium components by statistical experimental methods to enhance nattokinase activity. **Fooyin Journal of Health Science**, v.1, n.1, p.21–27, 2009.

XIA, H.; YAN, Z. Effects of Biosurfactant on the Remediation of Contaminated Soils. **2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering**, p. 1–4, jun. 2010.