UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO-UFMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE

BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE

JÉSSICA MAYARA MENDES ARAÚJO

São Luís – MA

2023

JÉSSICA MAYARA MENDES ARAÚJO

BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão- UFMA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof.ª Drª. Andrea de Souza Monteiro.

São Luís – MA

NOVEMBRO / 2023

Mayara Mendes Araújo, Jéssica.
Bioprospecção de Leveduras Com Potencial Biotecnológico Para A Produção de Compostos Ativos de Superfície / Jéssica Mayara Mendes Araújo. - 2023.
147 f.

Orientador(a): Andrea de Souza Monteiro.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. Levedura. 2. Candida Krusei. 3. Bissurfactante. 4. Bioemulsificante. 5. Frutos. I. de Souza Monteiro, Andrea. II. Título.

JÉSSICA MAYARA MENDES ARAÚJO

BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão- UFMA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 07 / 11 / 2023

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br ANDREA DE SOUZA MONTEIRO
Data: 08/01/2025 21:48:21-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª Drª. Andrea de Souza Monteiro (Orientador)
Universidade Ceuma- CEUMA

Documento assinado digitalmente
gov.br ALANA LISLEA DE SOUSA
Data: 08/01/2025 17:19:38-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Drª. Alana Lislea Sousa
Universidade Estadual do Maranhão- UEMA

Documento assinado digitalmente
gov.br ANGELA FALCAI
Data: 19/12/2024 17:48:28-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Drª. Ângela Falcai
Universidade Ceuma- CEUMA

Documento assinado digitalmente
gov.br CRISTINA DE ANDRADE MONTEIRO
Data: 17/12/2024 11:15:54-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Drª. Cristina Andrade Monteiro
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA

Documento assinado digitalmente
gov.br GABRIELLA FREITAS FERREIRA
Data: 17/12/2024 21:45:42-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Drª. Gabriella Freitas Ferreira
Universidade Federal de Juiz de Fora- UFJF

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Jéssica Mayara Mendes Araújo, (X) autorizo ( ) não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada "Bioprospecção de leveduras com potencial biotecnológico para a produção de compostos ativos de superfície" no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Local/Data: São Luís, 06 de janeiro de 2025.

gov.br
Documento assinado digitalmente
JESSICA MAYARA MENDES ARAUJO
Data: 09/01/2025 13:41:29-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Jéssica Mayara Mendes Araújo

CPF: 035.223.493-85

RG: 030964802006-4

Dedico esta Dissertação, aos meus pais, Ana Mendes e Josuel Araujo, e a minha tia Hadma Mendes, pessoas fundamentais em minhas conquistas. Obrigada pela confiança, incentivo, compreensão, carinho e amor. Sem vocês a realização deste sonho não seria possível.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Como já dizia Raul Seixas: “Um sonho sonhado sozinho é sonho. Um sonho sonhado junto é realidade”. Hoje, vivencio uma realidade que parece um sonho, contudo foi preciso muito esforço, determinação, paciência e dedicação para chegar até aqui, e nada disso seria possível se eu estivesse sozinha. Por esta razão, agradeço:

Primeiramente à Deus, pela força e direcionamento nos momentos difíceis dessa longa caminhada, pelas alegrias nas conquistas alcançadas, pela paz que me destes nos momentos de ansiedade e preocupação, e pela presença constante na minha vida. Meu querido Deus, obrigada porque eis mais um propósito que se cumpre.

Aos meus pais, Ana e Josuel, pelo amor incondicional, confiança, motivação e pela torcida incansável. Sem o apoio de vocês não seria possível alcançar os meus objetivos, portanto esta conquista é nossa.

À minha amada tia e mãe Hadma Mendes, que desde o princípio acreditou em meu potencial e não mediu esforços para a concretização de meus sonhos. Isto só me fortaleceu e me fez tentar não ser a melhor, mas fazer o melhor de mim. Embora haja ainda um longo caminho a percorrer, já caminhei bastante e sem o seu apoio não estaria aqui no meio do caminho. A você meu infinito agradecimento.

A toda a minha família (Mendes e Araújo) que sempre acreditou em mim e me ajudou a chegar até aqui.

Aos meus primos João Vitor Mendes, João Victor Rodrigues e Janaina por todo apoio e incentivo.

Às minhas amigas e irmãs, Isadora Diniz e Taiana Tavares, por estarem sempre ao meu lado, me acompanhando, apoiando e principalmente acreditando em mim. Obrigada pelo apoio e amizade de vocês que foi essencial para a concretização desta etapa.

Aos companheiros da turma BIONORTE/2019 em especial aos meus amigos Ennio e Mizael por estarem sempre presente. Agradeço muito por ter compartilhado com vocês momentos de alegrias, desesperos, angústias, aflições e resenhas.

Aos queridos colegas de laboratório Amanda Alencar, Caio, Douglas, Fernanda Ferraz, Kariny, Jéssica Silva, Joveliane Monteiro e Maria Fernanda pela colaboração inestimável, amizade e carinho.

À minha orientadora, Doutora Andrea de Souza Monteiro, pela valiosa orientação, confiança e paciência. Obrigada por todos os ensinamentos, incentivos constantes e dedicação, que foram

fundamentais para o meu crescimento como ser humano e profissional. Sem você este trabalho dificilmente teria seguido a direção que eu pretendia. Meu agradecimento e admiração.

Aos meus queridos professores Dr.Thiago Ferro e Drª. Priscila Sabbadini por toda amizade, paciência, ensinamentos e incentivos oferecidos durante a vida acadêmica. Sem o apoio e ensinamentos de vocês não estaria aqui no meio do caminho. A vocês meu infinito agradecimento.

A todos os docentes do PPG BIONORTE que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos técnicos de laboratório em especial ao Srº. Marinaldo e Hélio pela imprescindível e impagável ajuda.

A FAPEMA e CNPq pelo incentivo e apoio financeiro

À Universidade CEUMA por disponibilizar recursos humanos e materiais para o desenvolvimento da pesquisa

A todos que fizeram parte desta conquista...

Muito obrigada!!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King Jr.

ARAUJO, Jéssica Mayara Mendes. **Bioprospecção de leveduras com potencial biotecnológico para a produção de compostos ativos de superfícies** (Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE) - 2023. 147f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

RESUMO

Os compostos ativos de superfícies (CAS) de origem microbiana, com propriedades biossurfactante e bioemulsificante, tornaram-se um grupo ativo de biomoléculas com uso potencial em uma variedade de aplicações industriais e biotecnológicas. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo isolar a partir de frutos leveduras com potencial para produção de CAS de origem biológica. O ensaios foram realizados utilizando leveduras em cultivo submerso em incubador rotatório. Foi analisada a influência dos fatores de temperatura, pH e concentração de sais. Buscou-se o melhor resultado acompanhando a produção através do consumo de substrato, redução da tensão superficial (método do anel) e atividade de emulsificação (E_{24}). O CAS, foi selecionado e caracterizado por cromatografia gasosa. A cinética de crescimento e produção do CAS foi analisada, além disso foi avaliada a atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotoxicidade do CAS. Os resultados obtidos, demonstraram que as produtoras de CAS foram identificadas como *Candida krusei* (n=6) e *Candida metapsilosis* (n=7). A *Candida krusei* M4CK isolada do fruto *Byrsonima crassifólia* popularmente conhecido como murici, foi mais eficiente na produção de CAS. O composto apresentou uma redução da tensão superficial de 72 mN/m^{-1} para 44 mN/m^{-1} e foi caracterizado como bioemulsificante (BE4CK). Verificou-se uma E_{24} igual ou maior a 50% em todas as fontes de carbono como óleo de oliva, girassol e pós fritura, e hidrocarboneto como querosene, hexano e hexadecano. O BE4CK apresentou em sua composição o ácido 9-octadecenóico como ácido graxo majoritário e os monossacarídeos foram manose e glicose. A E_{24} estava relacionada a fase de crescimento. A estabilidade das emulsões foi mantida em uma ampla faixa de temperaturas, pH e salinidade. O BE4CK (25 mg/mL) não apresentou atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureu*s ATCC 25923. O composto BE4CK apresentou, em todas as concentrações (25 mg/mL a 1,56 mg/mL), atividade inibitória significativa na formação de biofilme por *S. aureu*s ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Além disso, o tratamento com BE4CK demonstrou uma erradicação significativa para biofilmes pré-formados por *S. aureus* ATCC 25923. O composto BE4CK não apresentou toxicidade em células VERO e larvas de *Tenebrio molitor*. A emulsão OMBECK, resultante da combinação entre bioemulsificante BE4CK e óleo essencial de Melaleuca, inibiram o crescimento de *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 35218 e *S. aureus* ATCC 25923. Essa emulsão também foi capaz de reduzir e erradicar a formação de biofilme em superfície de poliestireno e poliuretano de dispositivo médicos. Diante dos resultados, verifica-se que o bioemulsificante BE4CK pode representar uma nova fonte de agentes antimicrobianos e antibiofilme para desenvolvimento biotecnológico.

Palavras-chave: Levedura; *Candida krusei;* Frutos; Biossurfactante; Bioemulsificante; Óleo essencial de Melaleuca.

ARAUJO, Jéssica Mayara Mendes. **Bioprospecting of yeasts with biotechnological potential for the production of surface active compounds** Thesis (Biodiversity and Biotechnology of the Legal Amazon - BIONORTE) – 2023, 147f. Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, 2023.

ABSTRAT

Surface active compounds (CAS) of microbial origin, with biosurfactant and bioemulsifying properties, have become an active group of biomolecules with potential use in a variety of industrial and biotechnological applications. In this sense, the present study aimed to isolate from fermented fruits with potential for the production of CAS of biological origin. The tests were carried out using yeasts in submerged cultivation in a rotating incubator. The influence of temperature, pH and salt concentration factors was proven. The best result was sought by monitoring production through substrate consumption, reduction of surface tension (ring method) and emulsification activity (E_{24}). The CAS was selected and characterized by gas chromatography. The growth and production kinetics of CAS were proven, in addition, the antimicrobial, antibiofilm and cytotoxicity activity of CAS was evaluated. The results obtained found that the CAS products were identified as *Candida krusei* (n=6) and *Candida metapsilosis* (n=7). *Candida krusei* M4CK isolated from the *Byrsonima crassifolia* fruit, popularly known as murici, was more efficient in the production of CAS. The compound showed a reduction in surface tension from 72 mN/m^{-1} to 44 mN/m^{-1} and was characterized as a bioemulsifier (BE4CK). An E_{24} equal to or greater than 50% was found in all carbon sources such as olive, sunflower and post-frying oils, and hydrocarbons such as kerosene, hexane and hexadecane. BE4CK had 9-octadecenoic acid as the main fatty acid and the monosaccharides were mannose and glucose. E_{24} was related to the growth phase. The stability of the emulsions was maintained over a wide range of temperatures, pH and salinity. BE4CK (25 mg/mL) did not show antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The compound BE4CK showed, at all concentrations (25 mg/mL to 1.56 mg/mL), significant inhibitory activity on biofilm formation by *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853. In addition Furthermore, treatment with BE4CK demonstrated significant eradication for pre-formed biofilms by *S. aureus* ATCC 25923. The BE4CK compound showed no toxicity in VERO cells and *Tenebrio molitor* larvae. The OMBECK emulsion, resulting from the combination of BE4CK bioemulsifier and Melaleuca essential oil, inhibited the growth of *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 35218 and *S. aureus* ATCC 25923. This combination was also able to reduce and eradicate the formation of biofilm on polystyrene and polyurethane surfaces of medical devices. Given the results, it appears that the BE4CK bioemulsifier can represent a new source of antimicrobial and antibiofilm agents for biotechnological development.

Keywords: Yeast; *Candida krusei*; Fruits; Biosurfactant; Bioemulsifier; Melaleuca essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Diferentes propriedades de compostos ativos de superfícies de origem microbiana. 22
Figura 2- Tipos de compostos ativos de superfícies de origem microbiana, características e aplicações biotecnológicas. 29
Figura 3-Atividade emulsificante (E_{24}) apresentada por CAS produzidos por *Candida krusei* M4CK em diferentes compostos hidrofóbicos. 57
Figura 4-Cinética de crescimento celular por *Candida Krusei* M4CK e atividade emulsificante por BE4CK. 59
Figura 5- Atividade emulsificante (E_{24}) do BE4CK após aquecimento de 120°C. 60
Figura 6-Atividade emulsificante (E_{24}) de BE4CK em diferentes faixas de pH. 61
Figura 7- Estabilidade da atividade emulsificante em diferentes concentrações de sais. 62
Figura 8- Atividade antimicrobiana do BE4CK e emulsão (OE Melaleuca e BE4CK-OMBE4CK) por difusão em ágar frente *E. coli* ATCC 25922. 63
Figura 9-Atividade inibitória do BE4CK na formação de biofilme por micro-organismos na superfície de poliestireno. 64
Figura 10- Atividade inibitória da emulsão OMBE4CK na formação de biofilme por micro-organismos em superfície de poliestireno. 65
Figura 11- Atividade inibitória da emulsão (OMBE4CK) na formação de biofilme em superfície de cateter por *S. aureus* ATCC 25923. 66
Figura 12- Erradicação de biofilme por Bioemulsificante BE4CK frente micro-organismos. 68
Figura 13- Erradicação de biofilme por emulsão OMBE4CK frente a micro-organismos. 69
Figura 14- Avaliação da citotoxicidade do bioemulsificante BE4CK (1024 µg/mL – 2 µg/mL) em células VERO. 70
Figura 15- Avaliação da citotoxicidade do bioemulsificante BE4CK e emulsão OMBE4CK em *Tenebrio molitor*. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Micro-organismos produtores de compostos ativos de superfície. 27
Tabela 2- Leveduras isoladas de frutos e substrato como única fonte de carbono para crescimento. 57
Tabela 3 - Valores de E_{24} de leveduras isoladas de frutos *Anacardium occidentale, Byrsonima crassifolia, Citrus reticulata* e *Platonia insignis*. 56
Tabela 4 - Determinação da tensão superficial final (mN/m) em meio após cepas de leveduras de crescimento celular. 58
Tabela 5- Composição de ácidos graxos de bioemulsificante (BE4CK) isolado de *Candida krusei* M4CK 58
Tabela 6- Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Melaleuca, bioemulsificante isoladamente e da combinação de BE4CK e OMBE4CK (emulsão) contra micro-organismos. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Bioemulsificantes
BHI	Brain Heart Infusion
BS	Biossurfactantes
CAS	Compostos ativos de superfícies
CMC	Concentração micelar crítica
EMCV	Vírus da encefalomiocardite murina
E24	Atividade de emulsificação
FCV	Calicivírus felino
GLs	Glicolipídios
GRAS	*Status* geralmente considerado seguro
G	Gramas
g/L	Gramas por litro
HSV-1, HSV-2	Vírus herpes simplex
LP	Lipopeptídeo
CBM	Concentração bactericida mínima
MCF-7	Células cancerosas
CIM	Concentração inibitória mínima
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
µg	Micrograma
nm	Nanômetro
OM4CK	Sinergismo entre óleo essencial de Melaleuca e 4CK
pH	Potencial hidrogeniônico
QS	*Quorum sensing*
RLs	Ramnolipídeos
SARS-CoV-2	Novo coronavírus
SFV	Semliki forest
SHV-1	Vírus herpes suid
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SL	Soforolipídeos
sp	Espécie
VSV	Vírus da estomatite vesicular
UFC	Unidade Formadora de Colônias
B**E**4CK	Bioemulsificante produzido por *Candida krusei*
Rpm	Rotação por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 OBJETIVO GERAL 19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
2.1 Surfactantes 20
2.2 Compostos ativos de superfície de origem biológica 22
2.2.1 Biossurfactantes 23
2.2.2 Bioemulsificantes 25
2.2.3 Micro-organismos produtores de compostos ativos de superfície 26
2.2.4 Aplicações biotecnológicas de compostos ativos de superfície de origem microbiana 28
2.2.5 Propriedades biológicas de compostos ativos de origem microbiana 34
2.3 Óleo Essencial de Melaleuca 47
3 MATERIAIS E MÉTODOS 49
3.1 Coleta das amostras 49
3.2 Isolamento e identificação de Leveduras 49
3.3 Identificação de leveduras produtoras de CAS 50
3.3.1 Caracterização da atividade emulsificante (E_{24}) do sobrenadante da cultura 50
3.3.2 Determinação da tensão superficial da água na presença de bioemulsificante 50
3.4 Análise da composição química dos CAS 51
3.5 Cinética de crescimento 51
3.6 Estabilidade do CAS em diferentes concentrações de NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$, autoclavagem e variação de pH 52
3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana 52
3.7.1 Teste de difusão de poço em ágar 52
3.8 Atividade antibiofilme 53
3.8.1. Inibição da Formação de Biofilme em Poliestireno 53
3.8.2 Inibição da formação de biofilme em cateter de poliuretano 53
3.8.3 Erradicação do biofilme 54
3.9 Avaliação de citotoxicidade do bioemulsificante 55
3.9.1 Utilização de células renais de macaco verde africano (VERO) 55
3.9.2 Utilização de modelo alternativo de *Tenebrio molitor* 56

3.10 Analise estatística 56
4 RESULTADOS 56
4.1 Isolamento de leveduras produtoras de compostos ativos de superfícies 56
4.2 Triagem e identificação de micro-organismos produtores de CAS 56
4.2.1 Determinação da atividade emulsificante (E_{24}) 56
4.2.2 Determinação da tensão superficial 57
4.3 Determinação da composição química 58
4.4 Cinética de crescimento 59
4.5 Avaliação da estabilidade do bioemulsificante 59
4.5.1 Efeito da temperatura na atividade emulsificante (E_{24}) 59
4.5.2 Efeito do pH na atividade emulsificante 60
4.5.3 Efeito da salinidade na atividade emulsificante 61
4.6 Determinação da atividade antimicrobiana 62
4.6.1 Atividade antimicrobiana em difusão em ágar 62
4.7 Determinação da atividade antibiofilme 64
4.7.1 Inibição da formação de Biofilme em poliestireno 64
4.7.2 Inibição da formação de Biofilme em cateter de poliuretano 66
4.7.3 Erradicação de Biofilme 67
4.8 Avaliação da citotoxicidade do bioemulsificante 69
4.8.1 Utilização de células renais de macaco verde africano (VERO, ATCC) 69
4.8.2 Utilização de larvas de *Tenebrio molitor* 70
5 DISCUSSÃO 72
6 CONCLUSÕES 79
7 PERSPECTIVAS FUTURAS 80
REFERÊNCIAS 81
ANEXOS 101

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são capazes de produzir diversos compostos ativos de superfícies (CAS), constituídos por porções hidrofílicas e hidrofóbicas. Estas características estruturais permitem-lhes a capacidade de interagir com superfícies e tensões interfaciais, formar micelas e emulsionar substâncias imiscíveis (Ahmadi-Ashtiani *et al*., 2020; Phulpoto *et al*., 2020).

Por apresentarem propriedades de interferir e modificar superfícies, os biossurfactantes (BS) e bioemulsificantes (BE) são denominados de CAS (Adetunji *et al*., 2021). Embora essas biomoléculas sejam anfifílicas e produzidas por diferentes espécies de micro-organismos, apresentam diferenças entre si, principalmente com base em suas propriedades físico-químicas e papéis fisiológicos. A diferença existente na composição química dessas moléculas contribui para o desempenho de funções específicas na natureza e aplicações biotecnológicas (Uzoigwe *et al*., 2015).

Nos últimos anos, a produção de CAS tem atraído a atenção devido às suas diversas aplicabilidades, tais como capacidade de desempenhar um importante papel na solubilidade de compostos insolúveis em água, na ligação de metais pesados, dessorção de contaminantes, na patogenia bacteriana, na adesão e agregação celular (Ceresa *et al*., 2019; Md. Badrul *et al*., 2019; Durval *et al*., 2020; Yamasaki *et al*., 2020; Sun *et al*., 2021). Além dessas características, os CAS apresentam várias vantagens sobre os surfactantes sintéticos, por exemplo, baixa toxicidade, menor Concentração Micelar Crítica (CMC), maior biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica (Sharma *et al*., 2018).

Essas moléculas são capazes de exibirem atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antitumorais (Yuan *et al*., 2018; Ceresa *et al*., 2019; Gaur *et al*., 2019; Kim *et al*., 2021; Guillén-Navarro *et al*., 2023). As propriedades de atividades antiadesivas e antibiofilme também são características importantes, uma vez que podem inibir a adesão e a colonização por micro-organismos patogênicos, bem como para remover biofilmes pré-formados na borracha de silicone e outros instrumentos biomédicos (Ceresa *et al*., 2020).

Por conseguinte, os CAS têm atraído interesse significativo na elaboração de emulsões e nanoemulsões, considerando diversas características físicas e químicas (Huang *et al*., 2021). Esses agentes emulsificantes evitam a coalescência das gotículas, diminuindo a tensão interfacial, assim podem ser usados para reduzir a volatilidade, aumentar a estabilidade, aumentar a bioatividade e prolongar a vida útil de óleos essenciais para diferentes aplicações, como alimentos, cosméticos e preparação de formulações farmacêuticas (Huang *et al*., 2021).

As emulsões óleo-em-água são sistemas de entrega eficientes para compostos oleosos, como óleos essenciais, dispersando a fase lipídica como uma dispersão coloidal (Atakpa *et al*., 2022).

Outro fator relevante em relação aos CAS é a sua produção por uma variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Parthipan *et al*., 2018; Senna *et al*., 2018; Yalçin *et al*., 2018). As leveduras têm sido constantemente utilizadas como agentes fermentadores de CAS, por apresentarem *status* geralmente considerado seguro (GRAS). Organismos pertencentes a essa classe não oferecem riscos de toxicidade ou patogenicidade, o que permite suas aplicações nas indústrias farmacêuticas e alimentícias sem restrições (Santos *et al*., 2016; Yalçin *et al*., 2018).

No cenário atual, as leveduras têm sido consideradas como as moléculas do futuro, por apresentarem um *status* GRAS e sintetizarem CAS que atuam tanto no campo da biorremediação quanto no biológico. Diversos estudos têm demonstrado que os compostos tensoativos produzidos por esses micro-organismos apresentam potenciais aplicações biomédicas, uma vez que exibem atividades antibiofilme, antibacteriana, anticancerígena, larvicida e imunomoduladora (Franco *et al*., 2017; Haque *et al*., 2017; Li *et al*., 2017).

Diante desses potenciais, é importante que se tenha isolados microbianos com grande potencial de produção desses compostos. Anteriormente, foi demonstrado que leveduras isoladas de ambientes podem produzir emulsificantes que apresentam grande estabilidade de emulsões (Monteiro *et al*., 2010).

Considerando a aplicabilidade fúngica em biotecnologia, torna-se necessário estudar a diversidade de leveduras associadas a frutas e o estudo de suas moléculas com potencial para atender diversas áreas de aplicações, principalmente, as biomédicas e farmacológicas. A hipótese deste estudo situa-se no fato de que as leveduras, isoladas de frutos, podem ser um micro-organismo eficiente para a produção de compostos ativos de superfície com potencial biotecnológico. Caso a hipótese esteja correta, a utilização deste micro-organismo na produção de CAS contribuirá para a produção de novos bioprodutos com propriedades biotecnológicas e biológicas, além de acarretar uma redução considerável no custo de produção de biossurfactantes e bioemulsificantes.

Neste contexto, o presente estudo tem o objetivo de avaliar os bioprocessos envolvidos na produção de CAS considerando toda a cadeia de inovação, desde fontes de isolamento e testes de seleção de micro-organismos, parâmetros de cultivo, otimização de processos através de ferramentas estatísticas e além de seu potencial para a formulação de produtos comerciais. Sob essa perspectiva, pretendeu-se descobrir com eficiência novas substâncias e dessas desenvolver novos bioprodutos, agregando dessa forma valor à biodiversidade.

1.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e selecionar leveduras isoladas de frutos com potencial de produção CAS tecnologicamente aplicáveis, considerando suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar leveduras produtoras de CAS presente nos frutos *Anacardium occidentale*, *Byrsonima crassifolia*, *Citrus reticulata* e *Platonia insignis*;
- Selecionar a levedura que produz CAS com maior capacidade emulsificante;
- Caracterizar a composição bioquímica e classificar os CAS como bioemulsificante e/ou biossurfactante;
- Descrever o perfil de ácidos graxos dos CAS produzidos;
- Relacionar o crescimento de leveduras com a atividade emulsificante;
- Caracterizar o CAS com relação estabilidade à diferentes PH, concentrações de sais e a altas temperaturas;
- Verificar a formação de emulsão do CAS com óleo essencial de Melaleuca;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do CAS e de sua combinação com óleo essencial de Melaleuca frente a células planctônicas e sésseis de bactérias;
- Avaliar a toxicidade dos CAS em células VERO e larvas de *Tenebrio molitor*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfifílicas que contêm uma cauda, que é insolúvel em água, apresentando grupos hidrofóbicos e uma cabeça hidrossolúvel com grupos hidrofílicos. Essas moléculas, ao serem produzidas por meios químicos, são conhecidas como surfactantes sintéticos (Aguirre-Ramírez *et al*., 2021). As propriedades anfifílicas desses compostos conferem solubilidade em solventes polares e apolares, resultando em propriedades tensoativas. Os surfactantes são geralmente classificados de acordo com sua carga iônica da cabeça polar, podendo ser dos tipos não iônicos, aniônicos, catiônicos ou zwitteriônicos (anfóteros) (Schinkel *et al*., 2022).

A porção hidrofílica dessas moléculas contém átomos de oxigênio, enxofre, nitrogênio e fósforo, que aparecem em diversos grupos funcionais como álcool, tiol, éter, éster, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, etc., enquanto a parte hidrofóbica é tipicamente uma parafina, cicloparafina ou hidrocarboneto aromático, que pode conter halogênios. Em virtude da bipolaridade, as moléculas anfifílicas não são estáveis em solventes polares ou orgânicos. Para atender a ambos os tipos de afinidades, a porção hidrofílica deve estar rodeada por um solvente polar, enquanto a porção hidrofóbica deve estar em contato com um solvente orgânico. Tais condições existem apenas entre duas fases imiscíveis (Khan *et al*., 2015).

Essas características são determinantes para o aparecimento e estabilidade de emulsões ou espumas, onde os tensoativos são capazes de reduzir a tensão superficial. Tal capacidade permite a mistura de moléculas hidrofílicas com hidrofóbicas, através da formação de estruturas denominadas micelas que permitem a associação de ambos os tipos de moléculas em uma única fase (Poša *et al*., 2019). Essas micelas correspondem a um agregado de surfactantes, que se forma a partir de uma determinada concentração, denominada de concentração micelar crítica (CMC), que constitui uma propriedade intrínseca e característica do surfactante a uma dada temperatura e concentração eletrolítica (Al-Soufi; Novo, 2021).

Em virtude dessas características, os surfactantes são usados em uma ampla gama de aplicações industriais. Na agricultura, os agentes fitossanitários são aplicados na forma de nanoemulsão emulsificante espontânea empregada com concentrações de surfactantes para atividade inseticida (Zeng *et al*., 2019; Feng *et al*., 2020). Há tempo são utilizados nas indústrias cosmética e alimentícia, bem como na área médica, como soluções de limpeza e/ou bactericidas (Adu *et al*., 2020).

Ademais, nos processos de mineração, eles desempenham um papel importante na remediação de ferro, zinco e urânio (Slizovskiy *et al*., 2011; Mao *et al*., 2015). Na indústria petrolífera, têm sido utilizados para auxiliar problemas causados pelas operações de perfuração até o acondicionamento dos produtos acabados; visto que o petróleo bruto extraído chega à superfície na forma de uma emulsão água em óleo, o que torna essencial a remoção ou separação do teor de água (Marquez *et al*., 2019).

Os tensoativos químicos são derivados de componentes não biodegradáveis e, em alguns casos, podem causar sérios problemas ao meio ambiente. Surfactantes em águas residuais são difíceis de remover devido às suas propriedades moleculares, de modo que um teor residual de surfactante permanece após o tratamento e é descartado. Assim, tendem a aumentar a disseminação de outros poluentes, como metais pesados, que causam problemas adicionais ao ecossistema (Johnson *et al*., 2021).

Esses materiais destroem populações microbianas aquáticas, danificam peixes e outras formas de vida aquática e reduzem a eficiência de conversão de energia fotoquímica das plantas. Além disso, a exposição prolongada de bactérias do ambiente a surfactantes, também pode levar à resistência bacteriana de forma semelhante à observada para antibióticos (Johnson et al., 2021).

A produção global de surfactantes foi relatada em 7 milhões de toneladas por ano há 20 anos, aumentando para 12,5 milhões de toneladas em 2006 e para 14,1 milhões em 2017, com um crescimento previsto de 18% até 2022. Em 2019, o tamanho do mercado de surfactantes era de 39.901 milhões de dólares em todo o mundo e deve crescer para 52.417 milhões de dólares até 2025 (Johnson *et al*., 2021). No entanto, esse aumento crescente de tais agentes tensoativos sintéticos é preocupante, visto que são geralmente tóxicos, difíceis de serem decompostos e causam impactos ambientais.

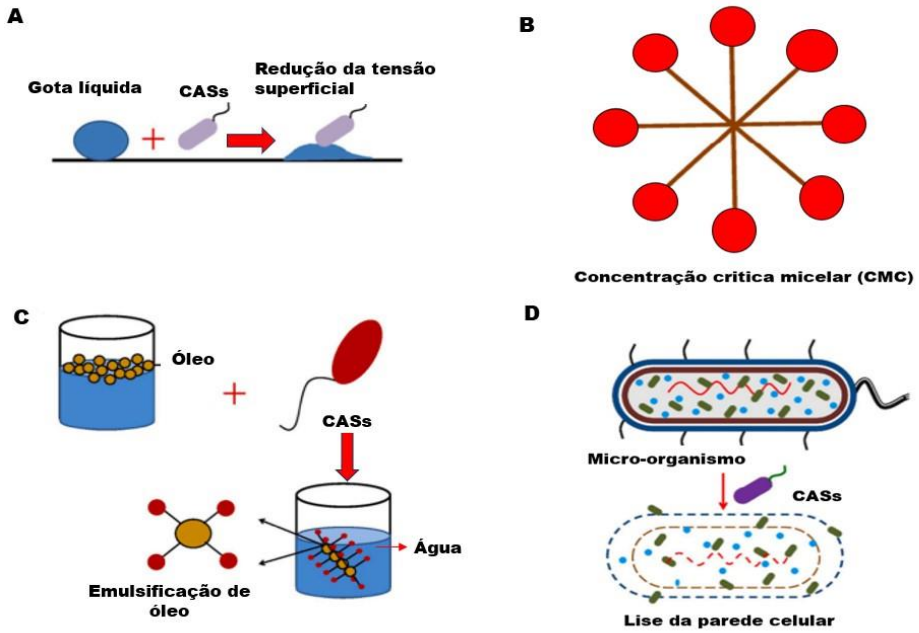
Nos últimos anos, tais problemas têm motivado a comunidade científica a buscar surfactantes mais ecologicamente corretos, como os obtidos por meio da produção microbiana, conhecidos como biossurfactantes (Guillén-Navarro *et al.*, 2023). Em virtude da preocupação com o meio ambiente por parte dos consumidores e da nova legislação de controle ambiental, o desenvolvimento de tensoativos naturais como alternativa aos produtos existentes ganhou destaque.

2.2 Compostos ativos de superfície de origem biológica

Os microrganismos têm a capacidade de fabricar diversos compostos tensoativos (CAS) com componentes hidrofílicos e hidrofóbicos. Essas propriedades estruturais possibilitam a interação com as tensões superficiais e interfaciais, a formação de micelas e a emulsificação de substâncias (Araujo *et al*., 2022).

Assim como mostra a figura 1, os biossurfactantes (BS) e bioemulsificantes (BE) são considerados CAS devido à sua capacidade de interferir e modificar superfícies. Por serem anfifílicas e produzidas por diferentes micro-organismos, essas biomoléculas possuem diferentes propriedades físico-químicas e funções fisiológicas, o que contribui para suas funções específicas na natureza e aplicações biotecnológicas. Recentemente, a produção de CAS tem recebido ampla atenção devido às suas diversas aplicações, como dissolução de compostos insolúveis em água, ligação de metais pesados, dessorção de contaminantes, inibição da patogênese bacteriana, adesão e agregação celular. Além disso, os CAS também apresentam diversas vantagens sobre os surfactantes sintéticos, como baixa toxicidade, menor concentração micelar crítica (CMC), maior biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica (Araujo *et al*., 2022).

Figura 1-Diferentes propriedades de compostos ativos de superfícies de origem microbiana.



A) Atividade de tensão superficial. B) Formação de micelas. C) Atividade de emulsificação. D) Atividade antimicrobiana. Fonte: de autoria própria.

2.2.1 Biossurfactantes

Biossurfactantes (BS) são compostos microbianos de baixo peso molecular sintetizados extracelularmente ou estão ligados à membrana celular de vários micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Zdarta *et al*., 2019; Silva *et al*., 2021; Lin *et al*., 2022). Eles podem ser produzidos sob condições ambientais versáteis e extremas, sua composição química depende do micro-organismo produtor, das matérias-primas e condições do processo (Md. Badrul *et al*., 2019).

Os BS são moléculas anfifílicas com uma porção hidrofóbica que apresenta uma cadeia de hidrocarbonetos contendo álcoois graxos saturados ou insaturados e hidroxilados ou ácido graxo, e outra porção hidrofílica que é constituída por grupos hidroxila, fosfato ou carboxila, ou por carboidratos (como mono-, oligo- ou polissacarídeos) ou frações peptídicas (Uzoigwe *et al*., 2015; Nayarisseri *et al*., 2019). Independentemente de suas contrapartes químicas, os biossurfactantes são geralmente classificados com base no peso molecular, concentração micelar crítica (CMC), micro-organismo produzido e seu modo de ação (Lin *et al*., 2022).

Esses compostos constituem um grupo produzido biologicamente que apresenta em sua estrutura diversas moléculas anfipáticas, capazes de se agrupar na interface entre duas fases com graus de polaridade diferentes entre si. Essas interfaces podem ser líquidas/líquidas (óleo-água), líquido/gás (água-ar) ou sólido/líquido (metal-água). A natureza anfipática dos BS os torna proficientes na formação de microemulsões, reduzindo a tensão interfacial entre duas fases e, portanto, aumenta a solubilidade de uma fase em outra (Khanna *et al*., 2023).

CAS de baixo peso molecular são reconhecidos pela excelente atividade superficial, redução da tensão superficial e interfacial entre as diferentes fases, baixa CMC e estabilização de emulsões (Eras-Muñoz *et al*., 2022). Conforme a sua natureza bioquímica, classificam-se como glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas ou ácidos graxos e polímeros de fosfolipídios. Os glicolipídeos e lipopeptídeos são os BS mais frequentemente produzidos (Sharma *et al*., 2022; Khanna *et al*., 2023).

Os glicolipídeos (GL) consistem em mono ou oligossacarídeos e uma porção lipídica, em que diferentes açúcares (glicose, manose, galactose, ácido glucurônico ou ramnose) estão ligados a ácidos graxos saturados ou insaturados, ácidos graxos hidroxilados ou álcoois graxos. Desse grupo, os mais bem explorados são soforolipídeos, manosileritritol-lipídeos, trealolipídeos e ramnolipídeos (Takur *et al.*, 2021). Geralmente são produzidos por *Starmerella bombicola* (Qazi *et al*., 2022), *Pseudozyma* spp (Cereza *et al*., 2020; Saika *et al*., 2019),

Rhodococcus (Luong *et al*., 2018) e *Pseudomonas* sp. (Mahjoubi *et al*, 2021; Sabarinathan *et al*., 2020), respectivamente.

Já os lipopeptídeos (LP) são constituídos por ciclopeptídeos com aminoácidos ligados a ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia e os principais BS dessa composição química são surfactina, iturina e fengicina (Hu *et al*., 2019; Habe *et al*., 2019; Carolin *et al*., 2020). Estes BS são produzidos por vários tipos de micro-organismos, principalmente por aqueles que fazem parte dos gêneros *Bacillus* (Denoirjean *et al*., 2021), *Lactobacillus* (Singh *et al*., 2021), *Streptomyces* sp (Zambry *et al*, 2021), *Pseudomonas* (Pardi *et al*., 2022) e *Serratia* (Dos Santos *et al*., 2021).

Os produtores de BS habitam diferentes ambientes, tais como a água (doce, subterrânea e do mar) e a terra (solo, sedimentos e mangues). Além disso, eles podem ser encontrados em ambientes extremos (reservatórios de petróleo) e crescer em diferentes variações de temperaturas, valores de pH e salinidade (Chirwa e Bezza, 2015; Elkhawaga, 2018; Elakkiya *et al*., 2020).

Os micro-organismos produtores de biossurfactantes são geralmente heterótrofos, uma vez que precisam de fontes de carbono, nitrogênio, minerais, vitaminas, fatores de crescimento e água para crescer e produzir seus metabólitos (Nurfarahin *et al*., 2018). Constantemente, fontes de carbono como carboidratos, óleos e gorduras, e grupos de hidrocarbonetos são frequentemente usados na produção de biossurfactantes. Dentre essas fontes, tem-se a glicose, que pode ser facilmente metabolizada por micro-organismos através da via da glicólise para a geração de energia e é comumente relatada como fator de maior rendimento do produto (Elkhawaga, 2018).

Outro aspecto relevante é a sua natureza anfipática, a qual permite aos BS a capacidade de misturar fluidos imiscíveis, reduzir as tensões superficiais e interfaciais, além de causar a solubilidade de compostos polares em solventes não polares (Liu et al., 2015). Tais características exibem inúmeras propriedades, como espuma, dispersão, umedecimento, emulsificação, desemulsificação e revestimento, que os tornam adequados para serem aplicados nas tecnologias de remediação físico-química e biológica de contaminantes orgânicos e metálicos (Almeida *et al*., 2016).Diversos biossurfactantes exibem atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral ou antitumoral, tornando-as alternativas potenciais para agentes terapêuticos convencionais em muitas aplicações biomédicas (Abdelli *et al*., 2020; Ohadi *et al*., 2020).

Apesar de os BS apresentarem uma multifuncionalidade e eficiência na sua aplicabilidade em diferentes áreas, sua produção tem sido um desafio. Visto que muitas vezes

seu bioprocessamento é ineficiente e a utilização de substratos caros torna a sua produção onerosa (Singh, Patil, Rale *et al*., 2019). Assim, estratégias de otimização econômicas de bioprocesso e alto rendimento são essenciais para uma produção de baixo custo e ampla comercialização do produto.

2.2.2 Bioemulsificantes

Diferentemente dos BS, os bioemulsificantes (BE) são compostos de alto peso molecular que não reduzem necessariamente a tensão superficial ou interfacial; porém, são capazes de emulsificar, mesmo em baixas concentrações, dois líquidos imiscíveis (Bhaumik *et al*., 2020). Quimicamente, consistem em misturas complexas de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas, glicoproteínas ou lipoproteínas, que lhe garantem melhor potencial de emulsificação e capacidade de estabilizar emulsões (Rosenberg e Ron, 1999; Uzoigwe *et al*., 2015; Ortega *et al*., 2018).

Os BE são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, isolados de solo contaminado, mangue, água do mar, água doce e pele humana (Patil *et al*., 2001; Fan *et al*., 2017; Adetunji *et al*., 2019; Marques *et al*., 2020). Dentre esses CAS, os mais estudados são emulsano, alasan, liposan, manoproteína e outros complexos de proteína polissacarídica (Rosenberg, 1986; Mujumdar *et al*., 2019).

Embora existam inúmeros relatos sobre a produção de BE e BS por diferentes bactérias, o gênero *Acinetobacter* spp. adquiriu atenção especial entre todos. Isso ocorre porque é o primeiro membro conhecido para a produção de bioemulsionante emulsano, biodispersano e alasan. Esses compostos são os melhores exemplos de BE comercialmente produzido por *Acinetobacter* spp. Esses BEs são usados principalmente na recuperação microbiana de óleo e na biodegradação de compostos tóxicos (Mujumdar *et al*., 2019).

Em contraste com os surfactantes sintéticos, essas biomoléculas apresentam muitas vantagens, uma vez que são ecologicamente corretos, biocompatíveis, menos tóxicos, com maior biodegradabilidade e ativos em temperaturas, pH e salinidade extremos. Além disso, os bioemulsificantes podem ser produzidos a partir de substratos renováveis de baixo custo, como resíduos industriais, óleos vegetais e hidrocarbonetos (Marques *et al*., 2020; Adetunji *et al*., 2021).

Grande variedade de fontes de carbono é utilizada na produção de bioemulsificantes, como etanol, n-hexadecano, petróleo bruto, glicose, ácido láctico, metilnaftaleno, peptona, n-heptadecano, óleo comestível, óleo de azeitona, glicerol e óleo C-pesado (Gudiña *et al*., 2015).

A produção convencional de BE microbiano ainda é onerosa, um dos fatores que mais contribuem para o alto custo corresponde à utilização de fontes nutricionais sintéticas. Diante disso, tem-se procurado por estratégia promissora para viabilizar economicamente o custo do processo, a exemplo da inserção de fontes nutricionais renováveis a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais. Neste sentido, diversos substratos alternativos de baixo custo, como óleo de soja residual de fritura e licor de maceração de milho, são explorados como substitutos de fontes sintéticas de carbono e nitrogênio (Marques *et al*., 2020).

Apesar de suas vantagens potenciais, alguns obstáculos impedem as aplicações práticas de BE, incluindo baixos rendimentos e altos custos de purificação. Para resolver esses problemas, muitos pesquisadores têm se esforçado para produzir e explorar bioemulsificantes mais eficientes, que podem ser usados em baixas concentrações (Tao *et al*., 2019).

Os BE têm a capacidade de formar emulsões e dispersões muito estáveis, além disso, permanecem ligados às interfaces das gotículas e podem reemulsionar mesmo pela adição ou substituição de solvente novo sem se diluir. Devido a estas vantagens, os bioemulsificantes são preferidos aos biossurfactantes para suas aplicações nas indústrias de cosméticos e alimentos (Kumari *et al*., 2023).

Os bioemulsificantes são mais empregados em biorremediação, recuperação aprimorada de óleo, limpeza de tubos contaminados com óleo, entre outros. Além disso, os emulsificantes são amplamente utilizados na indústria de alimentos e medicamentos (Fenibo *et al*., 2019; Sharma *et al*., 2023).

2.2.3 Micro-organismos produtores de compostos ativos de superfície

Ao longo dos anos, tem havido um esforço incessante na busca de micro-organismos com potencial para produzir metabólitos secundários com propriedades tensoativas ou emulsificantes. A quantidade de produção de biossurfactante ou bioemulsificante é influenciada pelo tipo de micro-organismos e suas fontes. A tabela 1 ilustra uma lista de alguns micro-organismos produtores de compostos ativos de superfície.

Tabela 1- Micro-organismos produtores de compostos ativos de superfície.

Micro-organismos	**Biossurfactante / bioemulsificante**	**Referência**
Acinetobacter calcoaceticus RAG-1	Emulsan	Goldman *et al*., 1982
Acinetobacter radioresistens KA53	Alasan	Toren *et al*., 2001
Acinetobacter junii B6	Surfactina / Fengicina	Ohadi *et al*., 2018
Acinetobacter junii BD	Raminolípideos	Dong *et al*., 2016
Acinetobacter calcoaceticus A2	Biodispersano	Rosenberg *et al*., 1988
Bacillus nealsonii cepa S2MT	Surfactina	Phulpoto *et al*., 2020
Bacillus subtilis 3NA	Surfactina	Klausmann *et al*.,2021
Bacillus Tailândiaensis E264	Ramnolipídeos	Diaz *et al*., 2016
Bacillus velezensis	Iturina, surfactina e fengicina	Kim *et al*., 2020
Candida keroseneae GBME-IAUF-2	Soforolipídeos	Ganji *et al*., 2020
Candida lipolytica UCP 0988	Rufisan	Rufino *et al*., 2011
Lactobacillus sp.	Surfactina, iturina e liquenisina	Nelson *et al*., 2020
Pseudomonas aeruginosa SG	Ramnolipídeos	Zhao *et al*., 2020
Pseudomonas fluorescens SBW25	Viscosina	Bonnichsen *et al*., 2015
Pseudomonas sp. S2WE	Ramnolipídeos	Phulpoto *et al*., 2021
Serratia sp. Cepa ZS6.	Serrawettina.	Hu *et al*., 2018
Yarrowia lipolytica IMUFRJ50682	Yansan	Amaral *et al*., 2006
Trichosporon mycotoxinivorans CLA2	Complexo lipídico-polissacarídeo	Monteiro *et al*., 2012

2.2.3.1 Leveduras produtoras de compostos ativos de superfície

As leveduras, micro-organismos eucarióticos, têm sido utilizadas em diferentes indústrias devido a sua diversidade de aplicações, tanto para fermentação quanto para produção de metabólitos específicos. As leveduras, sejam ascomicetos ou basidiomicetos, são definidas como micro-organismos unicelulares geralmente caracterizados por brotamento ou fissão como o principal meio de reprodução assexuada, e com estados sexuais que não são limitados em corpos de frutificação (Kurtzman *et al*., 2011; Shruthi *et al*., 2022).

Esses micro-organismos são capazes de produzir diversos compostos que têm sido utilizados em nosso cotidiano há mais de décadas. As leveduras, por serem unicelulares, livres de endotoxinas e passíveis de manipulações genéticas, merecem atenção especial no desenvolvimento de processos biotecnológicos (Jezierska *et al*., 2018).

Neste contexto estão inseridos os biossurfactantes produzidos por leveduras, uma vez que o critério de vantagem é o baixo risco associado aos produtos obtidos a partir do metabolismo de leveduras, ou seja, todas as moléculas são geralmente consideradas seguras (GRAS). Este parâmetro é utilizado para identificar substâncias que foram avaliadas como ingredientes em produtos e consideradas seguras. A maioria das substâncias que foi classificada como GRAS são ingredientes muito comuns, como cloreto de sódio, que incluem substâncias

como emulsificantes, surfactantes e agentes umectantes ou aderentes. Além disso, a produção de biossurfactantes tem aumentado constantemente. Isso se deve à sua diversidade de atuação, natureza biodegradável e produção por fermentação (Campos-Takaki *et al*., 2010).

Dentre os principais CAS produzidos por espécies fúngicas, incluem-se os glicolipídeos (GL) e os soforolipídeos (SL), sintetizados principalmente por leveduras não patogênicas, por exemplo, *Candida batistae*, *C. apícola*, *Starmerella bombicola*, *Rhodotorula bogoriensis*, *Wickerhamiella domercqiae* e *Rhodotorula babjeyae* (Liu *et al*., 2016; Jezierska *et al*., 2018). Biossurfactantes SL produzidos por leveduras oferecem resistência térmica, atividade antioxidante e nenhum risco de patogenicidade, ilustrando seu uso promissor em formulações de alimentos (Ma *et al*., 2019). Outro grupo de grande relevância de glicolipídeos são os manosileritritol-lípideos, CAS produzidos em grandes quantidades por *Pseudozyma antarctica*, *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa* e *P. parantarctica* (Kitamoto *et al*., 2021).

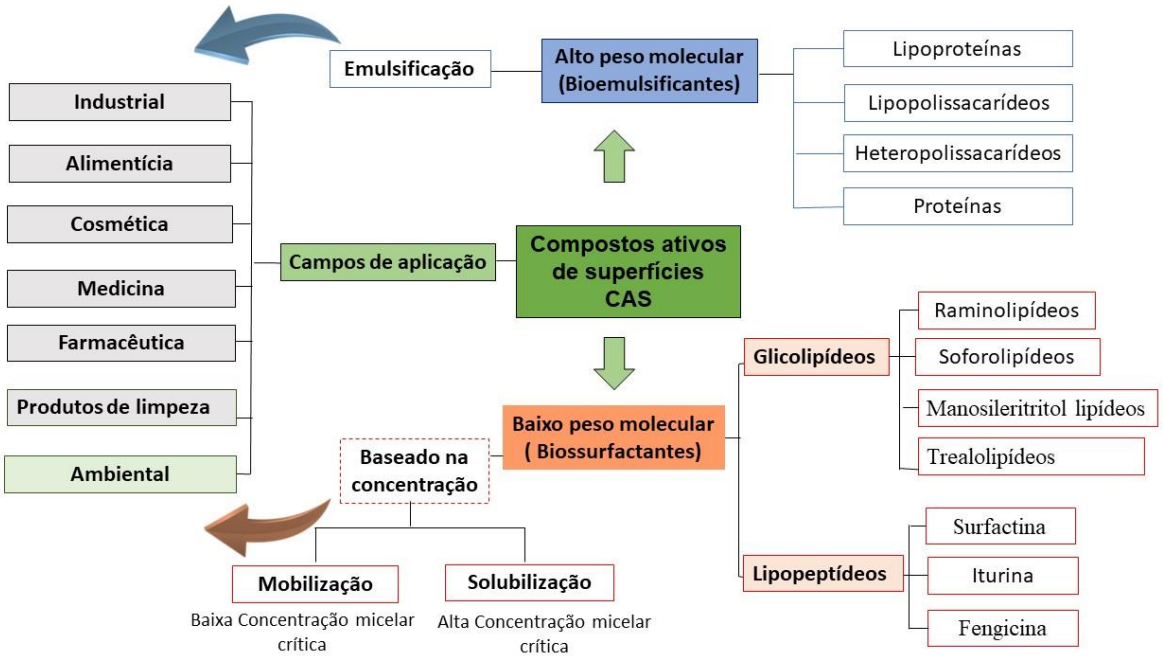
Bioemulsificantes também são sintetizados por leveduras, tais como *Torulopsis petrophilum*, *T. apícola*, *P. rugulosa*, *P. aphidis*, *Kurtzamanomyces* sp., *Kurtzanimyces* sp. I-11, *Debaryomyces polymorphud*, *Saccharomyces cerevisae*, *Kluyveromyces marxianus* e *Rhodotirula glutinis* (Alizadeh-Sani *et al*., 2018).

As características dos CAS serem secretados por leveduras não patogênicas, alto rendimento e excelentes propriedades de redução de superfície e atividades biológicas, os tornam compostos ativos de superfície alternativos ecologicamente corretos comparados aos surfactantes sintéticos (Ma *et al*., 2019).

2.2.4 Aplicações biotecnológicas de compostos ativos de superfície de origem microbiana

Os CAS possuem diversas propriedades funcionais distintas (Figura 2), incluindo emulsificação, umectação, formação de espuma, inibição de corrosão, dispersão, limpeza, atividade de superfície. Estas propriedades os tornam um candidato adequado para diversas aplicações biotecnológicas, como biorremediação, recuperação de óleo aprimorada; como aditivos em produtos de limpeza e formulações para lavanderia, e como agentes estabilizadores de emulsões nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (Adetunji *et al*., 2021). Devido às suas qualidades antibacterianas, antiadesivas e inibidoras de enzimas, os CAS têm sido empregados nos setores médico e farmacêutico para diversos fins terapêuticos (Kumari *et al*., 2023).

Figura 2- Tipos de compostos ativos de superfícies de origem microbiana, características e aplicações biotecnológicas.



Fonte: de autoria própria.

2.2.4.1 Indústria

2.2.4.1.1 Petrolífera

O petróleo é um dos mais importantes recursos energéticos e matéria-prima da indústria química. O mundo depende do petróleo e o seu uso como combustível tem contribuído para um intenso desenvolvimento econômico. Embora as plataformas petroquímicas e as refinarias de petróleo proponham benefícios para a sociedade, elas produzem uma grande quantidade de resíduos perigosos e tóxicos. Além disso, derramamentos de óleo durante a exploração, transporte e refino desse recurso têm causado sérios problemas ambientais (de Cássia *et al*., 2014).

Os biossurfactantes secretados por micro-organismos parecem ser promissores na degradação do petróleo bruto. Várias espécies microbianas foram identificadas para produzir biossurfactantes, cujas estruturas químicas variam amplamente. Esses surfactantes incluem ramnolipídeos (RL) produzidos por *Pseudomonas* sp. (Rehman *et al*., 2021); soforolipídeos produzidos por *Candida bombicola* (Elshafie *et al*., 2015); surfactina de *Bacillus velezensis* (Guimarães *et al*., 2021); lipopolissacarídeos produzidos por *Acinetobacter sp* (Bao *et al*., 2016) entre outros.

Os bioemulsificantes, tensoativos de alto peso molecular, apesar de não serem eficazes na redução de tensões interfaciais, possuem excelente capacidade de estabilizar emulsões óleo em água. Essas biomoléculas se ligam firmemente às gotículas de óleo e formam uma barreira eficaz que impede a coalescência das gotas. Dentre os bioemulsificantes, o emulsano é caracterizado como o mais poderoso e tem aplicações potenciais na indústria do petróleo, incluindo a formação de emulsões óleo-água para redução da viscosidade durante o transporte por dutos (Cássia *et al*., 2014; Fenibo *et al*., 2019).

2.2.4.1.2 Alimentícia, cosmética e farmacêutica

Os compostos ativos de superfícies desempenham papéis importantes em formulações devido às suas diversas propriedades, como capacidade umectante, solubilizante, emulsificante e espumante, além de detergência (Ferreira *et al*., 2017). A emulsificação tem sido uma tecnologia amplamente utilizada pelas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica para estabilizar ou controlar a cinética de liberação de um ingrediente ativo ou aditivo para proteção de produto. As emulsões constituem misturas líquidas baseadas em uma fase aquosa e uma fase oleosa, comumente estabilizadas por moléculas ou macromoléculas anfifílicas que estão bem estabelecidas na indústria como surfactantes e emulsificantes. Esses compostos garantem excelente estabilidade da emulsão ao longo do tempo para aumentar a vida útil dos produtos à base de emulsão, o que é um fator crucial para as indústrias (Ferreira *et al.*, 2023).

Diversos cosméticos são formulados com óleos essenciais (OEs) de plantas em virtude das suas propriedades oclusivas, emolientes e hidratantes na pele (Bialek *et al*., 2016). A maioria desses produtos do ramo da cosmetologia à base de óleo requer a presença de um agente estabilizante, como emulsificantes e/ou surfactantes, para obter boas emulsões (Martin-Piñero *et al*., 2019). Por exemplo, Vecino et al (2015) mostraram que um glicolipopeptídeo extraído de *Lactobaillus pentosus* era um bom agente estabilizante de emulsões óleo em água (O/A) formuladas com óleo de alecrim.

Essa técnica de emulsificação é um dos procedimentos mais eficientes para a preservação de óleos essenciais, visto que a emulsão é uma dispersão termodinamicamente instável de dois líquidos imiscíveis de polaridade diferente, hidrofobicidade e hidrofilicidade diferentes (Martin-Piñero *et al*., 2019). Perante essas características, um dos líquidos forma pequenas gotículas, que se dispersam na fase contínua formada pelo outro líquido. A substância líquida que forma as gotículas é conhecida como fase dispersa (fase interna) e o líquido que contém essas gotículas é a fase contínua (fase externa) (Ferreira *et al*., 2023).

Além de ajudar a preservar as propriedades dos óleos essenciais, as emulsões também ajudam a mascarar o sabor e o cheiro fortes típicos. Essa mistura emulsionante entre óleo e água (O/A) pode ser usada para evitar a evaporação dos componentes voláteis e aumentar sua solubilidade, reduzindo o problema hidrofóbico (Chang *et al*., 2015).

Outra característica importante resultante da combinação de moléculas bioativas naturais com os óleos essenciais é a potencialização de ação antimicrobiana, uma vez que os CAS podem alterar a morfologia e a estrutura das bactérias, resultando em aumento da permeabilidade da membrana e perturbação da integridade da membrana (Cho *et al*., 2022). Isso garante que essas biomoléculas penetrem nas membranas celulares e liberem materiais intracelulares, causando rupturas nas membranas celulares e inibição do crescimento de micro-organismos (Sana *et al*., 2017). Nesse sentido, A estrutura anfifílica dos CAS pode promover melhora na permeabilidade das membranas, favorecendo assim suas atividades biológicas entre CAS e os OEs (Takahashi *et al*., 2012).

Zannoto et al (2023) demonstraram que emulsões preparadas com o BS lipídeo manosileritritol e OEs de *Thymus vulgaris* e *Lippia sidoides* foram capazes de aumentar a capacidade antimicrobiana e antioxidante das emulsões contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium* sp., *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* e *Candida albicans*.

Também há evidências de que o sinergismo entre óleos essenciais de orégano, canela, árvore e lavanda com ramnolípideos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, aumentou o efeito antimicrobiano contra *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Haba *et al*., 2014). Esses dados revelam que os CAS podem ter sua atividade potencializada quando estabelecem uma relação de sinergismo com outros compostos.

Esse tipo de associação também é bastante utilizado na indústria cosmética. Neste ramo, já foi demonstrado que a combinação entre soforolipídeos e óleo essencial de palmarosa resultou numa formulação cosmética autoconservante, com grande estabilidade e atividades antioxidantes e antibacterianas eficazes contra *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Filipe *et al*., 2022). Esses dados demonstraram que os CAS têm potencial de utilização em diversos setores econômicos, comprovando a versatilidade biotecnológica desta biomolécula e sua importância industrial.

Na indústria alimentícia, as propriedades emulsionantes, espumantes, umectantes, solubilizantes e antiadesivas dos CAS são excepcionalmente desejáveis (Silva *et al*., 2020). O uso mais comum é na estabilização de emulsões para criar textura e cremosidade satisfatórias. Além disso, são adicionados para retardar a aglomeração, solubilizar óleos aromáticos,

melhorar as propriedades organolépticas em produtos de panificação e formulações de sorvetes e estabilizar a gordura durante a fritura (Sharma *et al*., 2023). Antes de serem aplicados em produtos alimentícios, os biossurfactantes devem ser avaliados devido às suas propriedades antimicrobianas e antiaderentes e à ausência de toxicidade *in vitro*, numa perspectiva de redução de custos de produção e inovações em surfactantes verdes (Pinto *et al*., 2023, Sharma *et al*., 2023).

2.2.4.2 Agricultura

Pragas, patógenos ou doenças de plantas são algumas das principais preocupações dos agrônomos, pesquisadores e comunidade científica. A fim de minimizar esses problemas, pesticidas químicos ou agroquímicos são bastante utilizados nesse meio. No entanto, o uso não distribuído e contínuo de agroquímicos resulta na deposição de resíduos químicos tóxicos nos alimentos, baixa qualidade de nutrientes e surgimento de patógenos resistentes a agrotóxicos (Kumar *et al*., 2021).

Para mitigar esses desafios, biossurfactantes têm sido frequentemente utilizados na agricultura, principalmente para substituir os tensoativos sintéticos presentes em formulações de defensivos agrícolas e agroquímicos, para favorecer a expansão da "química sustentável" a fim de reduzir e/ou eliminar impactos negativos sobre o meio ambiente e a saúde humana devido ao uso excessivo de compostos químicos (Sarubbo *et al*., 2022). A adição de biossurfactantes modula o mecanismo de ação, como antibiose, resistência sistêmica induzida, competição e parasitismo de agentes de biocontrole (Sachdev *et al*., 2013).

Os patógenos de plantas ameaçam o rendimento das culturas, afetam a qualidade e a segurança dos produtos agrícolas. Para evitar esses danos, atividades antifúngicas de ramnolipídeos têm sido descritas contra os patógenos da espécie de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Penicillum chrysogenum* que afetam as culturas de plantas e causam doenças agrícolas, como doenças em cebola, milho e kiwi (Rodrigues *et al*., 2021; Zhão *et al*., 2021).

Além de garantir proteção aos vegetais, essas biomoléculas podem promover o crescimento de plantas. Lipopeptídeos (LP) produzidos por *Bacillus subtilis* foram caracterizados como potente agente promotor de germinação de sementes e crescimento de plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate), *Pisum sativum* (ervilha), *Capsicum annum* (pimenta) e *Lactuca sativa* (alface) em altas concentrações (Umar et al., 2021).

O uso de biossurfactantes no campo agrícola tem a finalidade de melhorar ou aumentar a disponibilidade de micronutrientes para o solo. Além disso, a microflora nativa do solo ou sistema vegetal usa essas moléculas de biossurfactante como fonte de energia para regular os parâmetros fisiológicos das plantas e manter a saúde e a qualidade do sistema vegetal (Kumar *et al*., 2021). Verifica-se que o uso desses compostos tem contribuído para práticas agrícolas sustentáveis.

2.2.4.3 Biorremediação

A crescente contaminação do solo com metais pesados tóxicos está se tornando uma das principais ameaças ao meio ambiente e constitui uma das preocupações da comunidade científica devido aos seus efeitos indesejáveis e manifestações toxicológicas em todo o mundo.

No solo, os metais pesados são definidos como metais de origem natural ou antropogênica. Os metais pesados mais perigosos liberados no meio ambiente são arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr), mercúrio (Hg), zinco (Zn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e cobre (Cu). Estes são classificados em dois grupos: aqueles que são perigosos para humanos, plantas ou animais, e aqueles que, em baixas concentrações, têm efeitos benéficos (Gutiérrez-Chávez *et al*., 2021).

Para a descontaminação e recuperação de ambientes poluídos por metais pesados, várias abordagens físico-químicas, como adsorção, precipitação química, remoção por nanomateriais, osmose reversa, filtração por membrana e troca iônica, têm sido convencionalmente empregadas. No entanto, essas estratégias têm a sua aplicação limitada e muitas vezes não são adequadas para remediação de metais pesados do ponto de vista ambiental e econômico, visto que são processos de altos custos operacionais e de energia, e geração de grandes quantidades de poluentes secundários tóxicos (Mishra *et al*., 2021).

Assim, estratégias de remediação ecológicas para remoção desses poluentes são essenciais no cenário atual. Neste contexto, inclui-se a remediação de metais pesados por biossurfactante, este procedimento ocorre por associação do complexo com os resíduos metálicos de forma livre ou por acúmulo em uma interface de solução sólida, o que ocasiona a interação direta do metal e do biossurfactante (Miller, 1995). Pelo processo de dessorção, o complexo biossurfactante-metal deixa as superfícies do solo e forma micelas. O biossurfactante pode ser precipitado e separado dos metais (Ravindran *et al*., 2020).

O papel dos LPs na remoção de metais pesados do ambiente tem sido amplamente divulgado. A surfactina, sintetizada por bactérias do gênero *Bacillus*, é capaz de remover cobre,

chumbo, zinco, cromo e cádmio. A precipitação foi causada devido à neutralização de carga sobre a adição de cátions metálicos na solução de biossurfactante aniônico ou vice-versa (Md Badrul *et al*., 2019).

Os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* sp podem ser potencialmente usados na remoção de vanádio presente em solos (San *et al*., 2021). A propriedade de biorremediação também foi descrita para soforolipídeos produzidos por *Starmerella bombicola* OCGMCC 1576. Estas biomoléculas foram mais eficientes na remoção de Cd e Pb na lavagem de solos artificialmente contaminados do que os surfactantes sintéticos (Qi *et al*., 2018).

Além de remover metais pesados do solo, os biossurfactantes são capazes de reduzir metais contidos em soluções aquosas. Tal propriedade foi observada para um biossurfactante produzido por *Candida lipolytica,* o qual promoveu uma redução acentuada de Cd e Pb em solução aquosa (Santos *et al*., 2017). Diante deste contexto, verifica-se que a biorremediação de metais pesados baseada em biossurfactantes é uma abordagem sustentável e promissora devido à sua capacidade de biodegradação, eficácia econômica e natureza ecologicamente correta.

2.2.5 Propriedades biológicas de compostos ativos de origem microbiana

2.2.5.1 Atividades antimicrobiana

A descoberta dos antibióticos no século passado é considerada um grande avanço da medicina, visto que o uso desses agentes antimicrobianos reduziu significativamente a morbidade e a mortalidade associadas às infecções de origem microbiana. Fatores antibacterianos e antifúngicos podem reduzir e eliminar a viabilidade e o crescimento de populações microbianas através de diversos mecanismos: (i) rompimento de membranas extracelulares e / ou sua parede celular, (ii) inibição de expressão do gene, (iii) danos no DNA ou (iv) manipulação de vias metabólicas importantes (Anestopoulos *et al*., 2020).

Aos agentes antimicrobianos, as bactérias adquirem resistência por vários meios: através de transferência horizontal de genes entre elementos genéticos de diferentes cepas e do ambiente que conferem resistência, e por mutações que, além de conferir resistência aos micro-organismos, interferem nas funções celulares básicas (Melnyk *et al*., 2015; Lerminiaux, Cameron *et al*., 2019).

As bactérias mais resistentes associadas a infecções hospitalares graves são *Enterococcus faecalis, S. aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii,*

Pseudomonas aeruginosa e *Enterobacter* sp. o que muitas vezes pode resultar em elevadas taxas de mortalidade (Tacconelli *et al*., 2018). Além disso, outros micro-organismos como *Candida* spp. também podem ser caracterizados como uma ameaça global à saúde por apresentarem resistência aos agentes antimicrobianos (Colombo *et al*., 2017; Kean, Ramage *et al*., 2019; Kumar, 2020).

Taxas crescentes de resistência antimicrobiana, aliadas ao surgimento de novos patógenos microbianos, reforçam a necessidade pela busca de novos compostos antimicrobianos para combater infecções por micro-organismos (Lai *et al*., 2021). Dentre essas novas estratégias, os compostos com propriedades tensoativas são considerados agentes antibióticos e desinfectantes promissores, bem como veículos de liberação de antibióticos devido às suas propriedades físico-químicas (Anestopoulos *et al*., 2020b). A maioria dessas biomoléculas é capaz de romper as membranas externa e interna dos patógenos, explorando assim sua carga e hidrofobicidade. As vantagens do uso de CAS como antimicrobianos englobam sua ação bactericida de amplo espectro e a ausência de mecanismos de resistência dos patógenos (Anestopoulos *et al*., 2020b).

Os surfactantes catiônicos compreendem a maior categoria de surfactantes sintéticos com ação antimicrobiana, uma vez que apresentam um amplo espectro de atividades biotáticas e biocidas contra patógenos planctônicos. A cadeia hidrofóbica dos tensoativos catiônicos pode penetrar na membrana da célula microbiana, o que interfere na continuidade da membrana e nos processos metabólicos, assim ocasionando à morte celular (Zhou *et al*., 2016). Apesar de exibirem eficiência antimicrobiana, principalmente contra as bactérias Gram-positivas (29-32 mm) como *S. aureus* e *Bacillus subtilis*, esses compostos exibem propriedades de biodegradabilidade mais baixas do que os surfactantes naturais (Labena *et al*., 2020).

A literatura relata a eficácia antimicrobiana de CAS glicolipídicos produzidos por micro-organismos. Dentre estes, os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosas* inibiram significativamente o crescimento de *S. mutans* UA159 e *S. sanguinis* ATCC10556, e em concentrações elevadas inibiram completamente o crescimento de *A. actinomycetemcomitans* Y4 (Yamasaki *et al*., 2020).

Da mesma forma, a ação sinérgica de dois biossurfactantes do tipo ramnolipídeo produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* C2 e *Bacillus stratosphericus* A15 demonstrou atividade bactericida através da ruptura da membrana de bactérias Gram-positivos e Gram-negativas, tais como *S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K8813 (Sana *et al*., 2018). Em virtude da ação desses compostos, a membrana se desintegra, levando à penetração na parede

celular e na membrana plasmática pela formação de poros e subsequente vazamento de materiais citoplasmáticos internos, levando à morte celular (Naughton *et al*., 2020).

Soforolipídeos de leveduras *Candida albicans* SC5314 e *Candida glabrata* CBS138 mostraram propriedades antibacterianas contra bactérias patogênicas *Bacillus subtilise* e *Escherichia coli* (Gaur *et al*., 2019). Além de apresentar atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, essa classe de biossurfactante também exibiu atividade antifúngica promissora contra um grupo consideravelmente amplo de fungos patogênicos, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium verticilliodes*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *Corynespora casiicola* e *Trichophyton rubrum* (Sen *et al*., 2017).

A atividade antimicrobiana por CAS glicolipídeos, é descrita como dependente do tipo de glicolipídeo e a forma como interagem com a membrana celular. Diaz de Renzo et al (2016) demonstraram que ramnolipídeos inibem o crescimento bacteriano na fase exponencial enquanto os soforolipídeos inibem o crescimento entre as fases exponencial e estacionária.

CAS lipopeptídicos também têm sido citados como compostos de potencial antimicrobiano. Essas biomoléculas correspondem aos componentes mais importantes dos metabólitos sintetizados por muitas espécies do gênero *Bacillus* spp., que caracterizam as cepas desse gênero como peças fundamentais para o controle de doenças de plantas e segurança de alimentos (Perez *et al*., 2017; Chen *et al*., 2020; Wu *et al*., 2019).

Tipos de lipopeptídeos antimicrobianos, como iturina, fengicina e surfactina, foram identificados em *Bacillus velezensis* HC6. A surfactina mostrou fortes efeitos antibacterianos contra *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, enquanto a fengicina e iturina foram responsáveis por inibir o crescimento de fungos patogênicos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochra-ceus*, *Aspergillus sulphureus*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum* (Liu *et al*., 2019). Os autores verificaram *que B. velezensis* HC6, quando aplicado em milho, além de inibir o crescimento de vários fungos patogênicos, reduz a produção de aflatoxina e ocratoxina por fungos.

Ohadi et al (2020) demonstraram que lipopeptídicos produzidos por *Acinetobacter junii* apresentaram atividade não seletiva contra as cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas. Os dados exibiram que esse bioproduto, em concentrações quase abaixo da concentração micelar crítica (CMC) possui uma atividade antibacteriana eficaz e os valores de CIM foram menores do que o antifúngico padrão, exibindo quase 100% de inibição contra *Candida utilis*.

Outras categorias amplas de metabólitos bacterianos com potencial de superfície ativa e ações antimicrobianas, são glicoproteínas, peptídeos e ácidos graxos (Liu *et al*., 2017; Mouafo

et al., 2018). *Lactobacillus* spp., tendo como substrato melaço de cana-de-açúcar, produziram um surfactante glicolipoproteico bioativo com atividade antimicrobiana contra fungo da espécie *Candida albicans*.LV1, e algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas (Mouafo *et al*., 2018). Um heptapeptídeo cíclico contendo uma fração de ácido graxo produzido por *Bacillus subtilis*, denominado bacaucina 1, demonstrou atividade antibacteriana específica contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) por um mecanismo de ruptura da membrana sem toxicidade detectável a células de mamíferos ou indução de resistência bacteriana e foi verificado que esse peptídeo foi eficiente na prevenção de infecções em ambos os modelos *in vitro* e *in vivo* (Liu *et al*., 2017).

Por fim, alguns micro-organismos excretam misturas de compostos bioativos que têm uma capacidade de redução da superfície e potencial emulsificante. Por exemplo, a fração biossurfactante produzida pelas cepas de actinomiceto de *Streptomyces griseoplanus* NRRL-ISP5009 (MS1) é uma mistura complexa de proteínas, carboidratos e lipídios que possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*B. subtilis*, *S. aureus) e fungos patogênicos (C. albicans* e *Aspergillus fumigatus)*. No entanto, teve atividade moderada contra bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *Salmonella typhimurium* (Elkhawaga, 2018).

2.2.5.2 Atividades antiviral

Os metabólitos secundários com propriedades ativas de superfície têm sido descritos por suas propriedades antivirais contra uma variedade de vírus. A atividade antiviral da surfactina, um antibiótico lipopeptídeo cíclico e biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, foi determinada para um amplo espectro de vírus (envelopados e não envelopados), tais como vírus Semliki Forest (SFV), vírus herpes simplex (HSV-1, HSV-2), vírus herpes suid (SHV-1), vírus da estomatite vesicular (VSV), vírus da imunodeficiência símia (SIV), calicivírus felino (FCV), vírus da encefalomiocardite murina (EMCV). A ação antiviral pela surfactina foi relacionada a uma interação físico-química do BS com a membrana lipídica do vírus, uma vez que foi observado por meio da microscopia eletrônica uma ruptura da membrana lipídica viral e parcialmente do capsídeo (Vollenbroich *et al*., 1997).

A surfactina de *Bacillus subtilis* pode inibir a proliferação dos coronavírus que causam a diarreia epidêmica suína (PEDV) e o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV) em células epiteliais em uma faixa de concentração relativamente baixa (15 a 50 μg / ml). Esse CAS inibiu quase completamente a replicação de qualquer um dos vírus, sem citotoxicidade celular ou

ruptura da membrana viral. Este resultado sugere que a surfactina apresenta um potente efeito antiviral sem prejudicar as células (Yuan *et al*., 2018).

Wu et al (2015) demonstraram que lipopeptídeos inibiram a entrada do vírus Influenza A ao bloquear a fusão da membrana ou a interação do vírus com a subunidade HA2 da hemaglutinina. Assim, a atividade antiviral da surfactina está relacionada aos eventos de fusão da membrana entre o vírus e as células hospedeiras (Yuan *et al*., 2018),

Os LP têm sido avaliados como possíveis aplicações farmacêuticas e biomédicas para o enfrentamento do surto da pandemia atual ocasionada pela síndrome respiratória aguda grave SARS-CoV-2. Um estudo com diferentes tipos de lipopeptídeos, tais como sushimycin, daptomicina, surfactina, bacilomicina, iturina, srfTE e lipopeptídeo detergent-12 (LPD-12), avaliou por meio de ancoragem molecular a interação de cada LP contra glicoproteína (S) do novo coronavírus SARS-CoV-2. A análise in sílico, revelou que o LDP-12 (Lipopeptide detergent-12) era o melhor entre eles, uma vez que foi a molécula apropriada para a ligação adequada com a glicoproteína S de SARS-CoV-2 e, portanto, interrompeu significativamente sua afinidade de ligação com a angiotensina- a enzima conversora 2 (ACE2), que é a única molécula receptora que facilita o desenvolvimento da doença. Esses resultados sugerem que lipopeptídeos LPD-12 podem ser usados como um potencial agente terapêutico para tratar COVID-19 causada pelo SARS-CoV-2 (Chowdhury *et al*., 2021).

Owtlaw et al (2020) descreveram o desenvolvimento de um LP derivado do domínio de repetição do heptal C-terminal (HRC) de SARS-CoV-2 S que potentemente inibe a infecção por SARS-CoV-2. O LP inibe a fusão célula-célula mediada por SARS-CoV-2 S e bloqueia a infecção por SARS-CoV-2 em monocamadas de células Vero E6. O lipopeptídeo SARS-CoV-2 também exibiu atividade de amplo espectro quando inibiu a fusão célula-célula mediada por SARS-CoV-1 e coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e bloqueou a infecção por MERS-CoV em monocamadas de células. Os BS não afetam a replicação viral, mas inativam os efeitos virais antes da adsorção ou penetração (Subramaniam *et al*., 2020).

A atividade antiviral também é relatada para outras classes de BS. Soforolípideos (SLs) produzidos por *Candida bombicolae* apresentaram propriedade virucida contra o HIV, em menos de 2 minutos inativou o vírus e reduziu seu título em mais de 2 unidades logarítmicas (2 logs 10) (Shah *et al*., 2005). O vírus da Herpes, Epstein-Barr, adsorvido em linhagens de células linfóides Daudi, também teve sua atividade viral inibida por SLs (Shah *et al*., 2007).

Os SLs interferem nas estruturas da membrana ou ocasionam a ruptura da membrana dos vírus. Além disso, pode haver outras interações físico-químicas entre o vírus e os SLs, como

a ação direta sobre as proteínas do capsídeo que afetam a fixação do vírus e a penetração na célula (Borsanyiova *et al*., 2016).

Para combater a disseminação de patógenos virais, misturas entre biossurfactantes têm apresentado fortes propriedades antivirais. O BS ramnolipídeo PS-17 produzidos por *Pseudomonas* spp., na forma livre e em combinação com alginato, foi considerado um agente antivírus por inibir significativamente o efeito citopático do herpes vírus, herpes simplex (HSV) tipos 1 e 2. O efeito supressor dos compostos na replicação do HSV foi dependente da dose e ocorreu em concentrações mais baixas do que a CMC do surfactante (Remichkova *et al*., 2008).

A atividade antiviral também foi demonstrada por mistura de ramnolipídeos (M15RL) produzida pela bactéria antártica *Pseudomonas gessardii* M15 contra vírus pertencentes a famílias Coronaviridae e Herpesviridae. O M15RL inibiu completamente o HSV-1 e HSV-2 na concentração de 6 µg/mL, e coronavírus humano (HCoV-229E) e SARS-CoV-2 a 25 e 50 µg/mL, respectivamente (Giuglicano *et al*., 2021).

As infecções virais constituem uma das principais causas de morbidade e mortalidade humana e animal, levando a gastos significativos com saúde (Lozach *et al*., 2020). Portanto, os metabólitos secundários com propriedades ativas de superfície podem ser considerados substâncias promissoras para o desenvolvimento de compostos antivirais.

2.2.5.3 Atividade anti-inflamatória

A resposta inflamatória é um aspecto crucial das respostas dos tecidos a certas lesões, irritantes químicos ou infecções microbianas. Essa resposta é complexa, envolve células leucocitárias, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Em resposta ao processo inflamatório, essas células liberam substâncias especializadas que incluem aminas e peptídeos vasoativos, eicosanóides, citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, que medeiam o processo inflamatório, evitando danos adicionais aos tecidos (Abdulkhaleq *et al*., 2018).

Atualmente, os CAS são estudados como potenciais candidatos a fármacos com atividade anti-inflamatória. Dentre eles, inclui-se a surfactina, que foi capaz de inibir a resposta pró-inflamatória em larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*), reduzindo significativamente a expressão de interleucina-1β (IL-1β), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral-α (TNF-α), óxido nítrico (NO), fator nuclear kappa-B p65 (NF-κBp65), ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e aumentou a expressão de interleucina-10 (IL-10) em modelo *in vivo*. Além disso, foi demonstrado que a surfactina reduziu a migração de neutrófilos e aliviou a lesão hepática (Wang *et al*., 2021).

Outros estudos mostraram que a surfactina induziu sistematicamente CD4 +, CD25 +, FoxP3 + Tregs no baço de camundongos, o que poderia inibir as células T de produzir citocinas pró-inflamatórias, como TNF -α e interferon (IFN) -γ. A atenuação da inflamação crônica por surfactina, além de reduzir TNF-α, aumentou a expressão de IL-10 nas lesões ateroscleróticas da aorta de camundongos. Esses resultados demonstraram que o BS pode restaurar o equilíbrio da resposta Th1/ Th2 em camundongos (GAN *et al*., 2016). Além de atuar na maturação das células dendríticas (DCs) e aumentar a expressão de moléculas MHC-II e outros fatores coestimuladores (Xu *et al*., 2016).

As propriedades anti-inflamatórias relacionadas a biossurfactantes glicolipídicos são poucas relatadas. Soforolipídeos produzidos por levedura *Candida bombicola* reduziram a expressão induzida por lipopolissacarídeos de citocinas inflamatórias, incluindo TNF - α, COX - 2 e interleucina-6 (IL - 6) em células RAW 264.7 (Maeng *et al*., 2018), e são capazes de reduzir o nível de imunoglobulina E (IgE), expressão de mRNA de TLR-2, IL-6 e STAT3 (Hagler *et al*., 2007).

Em um modelo *in vivo*, os soforolipídeos reduziram a mortalidade relacionada à sepse e exibiram efeitos anti-inflamatórios em camundongos ao inibir a produção de óxido nítrico e citocinas inflamatórias (Mueller *et al*., 2006; Hardin *et al*., 2007). Já o complexo glicolipídeo não teve efeito considerável na ação proliferativa dos leucócitos do sangue periférico, uma vez que ativou a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e TNF-α) sem afetar a produção *in vitro* de IL-6 na fração de monócitos (Kuyukina *et al*., 2007).

2.2.5.4 Atividade anticâncer

O câncer é considerado uma doença de múltiplos estágios com etiologia multifatorial associada a altas taxas de incidência global e mortalidade. Drogas quimioterápicas, cirurgia e radiação ainda são as formas de tratamento mais comuns para o enfrentamento da doença em humanos. No entanto, todos eles estão associados a efeitos colaterais graves, indicando a falta de especificidade e a necessidade de descobrir novos agentes antitumorais que podem aumentar a eficácia das drogas quimioterápicas convencionais com menos efeitos colaterais (Anestopoulos *et al*., 2020).

Para esses fins, vários estudos indicaram o potencial antitumoral de vários CAS. Os biossurfactantes são propostos como candidatos a fármacos adequados contra muitas doenças, incluindo o câncer (Thankur *et al*., 2020). Dada a sua ampla utilização, há um interesse crescente em explorar seu papel que é relevante para a promoção da saúde humana.

O efeito de ramnolipídeos em linhagens de células cancerosas MCF-7 de câncer de mama humano foi determinado para o monorhamnolipídeo C10C10 R1 e o dirhamnolipídeo R2 C10C10 produzidos por *P. aeruginosa* MR01. Em células MCF-7 de câncer de mama humano, o monorhamnolipídeo C10C10 R1 era o mais potente dos dois ramnolipídeos e inibiu a divisão celular em concentrações inferiores (IC_{50}) do que o dirhamnolipídeo R2. O mecanismo de inibição parecia ser a indução da apoptose em células de MCF-7 tratadas (Rahimi *et al*., 2019).

Soforolipídeos lactônicos (SLs), têm atraído grande atenção de pesquisadores por suas boas atividades biológicas, dentre elas a anticâncer. Wang et al (2021) demonstraram que o SLs aumenta a taxa de apoptose em células de câncer de fígado HepG2 e também são capazes de regular a expressão de genes e proteínas associados à apoptose através da via da caspase-3. SLs apresentaram efeito citotóxico frente às linhagens de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, quando as concentrações do surfactante estavam na faixa de sua CMC do surfactante, ou seja, houve uma correlação entre o efeito citotóxico e a CMC (Ribeiro *et al*., 2015).

Os SL sintetizados por levedura *Wickerhamiella domercqiae* Y2A, isolada de águas residuais contaminadas com óleo, apresentaram atividade anticâncer frente a linhagens de células cancerosas H7402 (fígado), A549 (pulmão), HL60 e K562 (leucemia) e mostraram um efeito inibidor significativo na proliferação celular em todas as linhas celulares testadas (Chen *et al*., 2006).

Um efeito anticâncer de surfactina por meio da indução de reações alérgicas no câncer de pele melanoma foi descrito por Kim et al (2021). Os autores demonstraram que a administração oral do composto aumentou significativamente a taxa de sobrevivência e reduziu o crescimento e o peso do tumor no modelo *in vivo* de câncer melanoma. O bioproduto, além de aumentar significativamente a infiltração de mastócitos e os níveis de histamina, também foi capaz de elevar os níveis de IgE e mediadores de reforço imunológico, como interferon-γ, interleucina (IL) -2, IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral-α em tecidos de soro e melanoma. No modelo *in vitro*, a surfactina aumentou significativamente a morte das células de melanoma B16F10 por meio da ativação da caspase-3, 8 e 9 de maneira dependente da dose. A surfactina induziu indiretamente ou diretamente a apoptose das células de melanoma B16F10.

Da mesma forma, a surfactina, lipopeptídeo produzido *Bacillus safensis*, mostrou uma atividade antitumoral contra células de câncer de mama T47D e células de melanoma de camundongo B16F10 com IC_{50} de 0,66 mg mL^{-1} e 1,17 mg mL^{-1} respectivamente (Abdelli *et al*., 2019).

Outro surfactante que mostrou atividade anticâncer, foi a iturina A. Este lipopeptídeo foi isolado de *Bacillus megaterium*, inibiu o crescimento das células cancerígenas de mama MDA-MB-231 e MCF-7 através da redução dos níveis de akt quinase fosforilada, e também exerceu uma capacidade anticâncer contra o modelo de xenoenxerto MDA-MB-231 em camundongos. A capacidade anticâncer foi demonstrada como redução do volume do tumor, níveis de expressão reduzidos de Ki-67 (um marcador de proliferação), cluster de diferenciação 31 (CD-31), P-Akt, P-MAPK, glicógeno sintoxico-3 beta (P-GSK3β) e caixa de garfo fosforilado classe O 3α (P-FoxO3α) (Dey *et al*., 2015).

2.2.5.5 Atividade antibiofilme

Biofilmes são comunidades de bactérias fixadas à superfície incorporadas em uma matriz extracelular composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) secretadas pelas células que residem em seu interior. O EPS é geralmente uma mistura de polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular (eDNA) e outros componentes menores. As propriedades físicas e químicas dos constituintes da matriz do biofilme permitem que a matriz proteja as células residentes da dessecação, perturbação química, invasão por outras bactérias e morte por predadores. No entanto, muitas vezes, os biofilmes causam grandes problemas na medicina e constituem a base de infecções crônicas, visto que as comunidades do biofilme podem abrigar células tolerantes e persistentes que podem sobreviver mesmo em tratamento com antibióticos. As bactérias dentro dessas estruturas tendem a ser mais resistentes aos antibióticos em comparação com as bactérias planctônicas (Sharma *et al*., 2019; Yan *et al*., 2019).

Devido à sua configuração, os biofilmes são responsáveis por causar uma ampla gama de doenças crônicas, que, em virtude do surgimento da resistência aos antibióticos em bactérias, tornou-se realmente difícil tratá-los com eficácia. Os antibióticos disponíveis até o momento são ineficazes para o tratamento dessas infecções relacionadas ao biofilme devido aos seus valores mais elevados de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), o que pode resultar em toxicidade *in vivo*. Portanto, é extremamente importante projetar ou rastrear moléculas antibiofilme que possam efetivamente minimizar e erradicar infecções relacionadas ao biofilme (Roy *et al*., 2018).

Os CAS têm se mostrado úteis para neutralizar a formação de biofilmes e o aparecimento de micro-organismos resistentes devido às suas propriedades antimicrobianas, antiadesivas e antibiofilme (Ceresa *et al*., 2021). Essas biomoléculas têm a propensão de agir em sinergia com os antimicrobianos (Rivardo *et al*., 2011; Ceresa *et al*., 2017), que na maioria

dos casos são menos eficazes contra biofilmes em geral e contra biofilmes de multiespécies associados a infecções polimicrobianas extremamente complicadas.

Uma mistura de lipopetideos (surfactina, iturina e fengicina), sintetizado por *Bacillus subtilis*, evitou a formação de biofilme ao inibir a adesão celular até 96,89% de *Trichosporon* spp. e causou a dispersão de biofilmes maduros (até 99,2%), diminuindo sua espessura e viabilidade celular. Esses biossurfactantes reduziram o conteúdo de ergosterol celular e alteraram a permeabilidade da membrana e a hidrofobicidade da superfície das células planctônicas (Cordeiro *et al*., 2018).

Outra mistura de tipos de lipopetídeos como a surfactina, iturina e liquenisina foram identificadas pela primeira vez em *Lactobacillus* spp. vaginais, e apresentaram forte atividade antiadesiva (redução de até 74,4%) contra o produtor de biofilme *Candida albicans* (Nelson *et al*., 2020). Lipopetideos misturados (iturina, fengicina e surfactina), com maior abundância de surfactina produzidos por *Bacillus subtilis* TIM10 e *B. vallismortis* TIM68, inibiram a formação de biofilme de leveduras como *Malassezia* spp., especialmente TIM10, com uma taxa de inibição de aproximadamente 90% (Da Silva *et al*., 2021).

Biossurfactante do tipo surfactina produzido por *Bacillus subtilis* reduziu a adesão e interrompeu a formação de biofilme de *S. aureus* em superfícies de vidro, poliestireno e aço inoxidável. A surfactina teve um efeito significativo na produção de polissacarídeos ao diminuir a sua porcentagem em biofilmes e reduzir a expressão de *icaA* e *icaD*, que são elementos necessários para a estrutura de biofilme estafilocócico. Além disso, foi demonstrado que o lipopeptídeo afetou o sistema *quorum sensing* (QS) em *S. aureus* por meio da regulação da atividade do auto-indutor 2 (Liu *et al*., 2019).

Em relação à atividade antibiofilme dos glicolipídeos, os efeitos de diferentes tipos de ramnolipídeos (RLs) foram relatados por Alegrone et al (2021). Os autores demonstraram que o ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* 89 (R89BS) apresentou grau de pureza de 91,4% e era composto por 70,6% de mono-ramnolipídeos e 20,8% de di-ramnolipídeos. O extrato puro R89BS inibiu a adesão (97%) e a formação de biofilme (85%) de *S. aureus*. Ainda, foi observado que mono-ramnolipídeos purificados (mR89BS) induziram a dispersão do biofilme pré-formado em todas as concentrações (0,06 a 2 mg / mL) testadas, com reduções variando de 80% a 99%, diferindo do extrato puro R89BS e di-ramnolipídeos purificados (dR89BS) que eram dependentes da concentração testada.

Ceresa et al (2019) demonstraram que o R89BS revestindo discos elastoméricos de silicone (SEDs) neutralizaram significativamente a formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. em termos de biomassa acumulada (até 60% de inibição em 72 h) e atividade metabólica

celular (até 68% de inibição em 72 h). Os resultados indicam que os revestimentos ramnolipídicos podem ser possíveis procedimentos de tratamentos antibiofilme eficazes e representam uma estratégia promissora para a prevenção de infecções associadas a dispositivos médicos implantáveis.

Shen et al (2020) demonstraram que RLs comparados a outros agentes antibacterianos, além de inibir a formação de novos biofilmes, foram superiores na erradicação de biofilmes maduros formados por *Helicobacter pylori*, *E. coli* e *Streptococcus mutans* de maneira dose-dependente, mesmo em concentrações abaixo das CIM. RLs podem potencializar o efeito de agentes antimicrobianos, Sidriam et al (2020) observaram que essas moléculas aumentaram significativamente a atividade de meropenem e amoxicilina-clavulanato contra biofilmes maduros de *Burkholderia pseudomallei*.

RLs produzidos por *P. aeruginosa* SS14, também apresentaram efeitos inibitórios nas células planctônicas de fungos filamentosos de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, a formação e ruptura de biofilmes maduros foi dependente da dose, com a atividade mais alta observada em concentrações de 2 × CIM contra ambos os patógenos (Sen *et al*., 2020).

Assim como os raminolipídeos, soforolipídeos demonstraram uma atividade inibitória eficaz contra a formação de biofilmes. Ceresa et al (2020) mostraram que três produtos diferentes de soforolipídeos foram obtidos, como SLA (congêneres ácidos), SL18 (congêneres lactônicos) e SLV (mistura de congêneres ácidos e lactônicos). Todas as três misturas de congêneres mostraram um efeito inibitório de 70%, 75% e 80% para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, respectivamente. Em discos de silicone médicos pré-revestidos, a formação de biofilme de *S. aureus* foi reduzida em 75% usando SLA 0,8% p/v. Em experimentos de co-incubação, SLA 0,05% p / v reduziu significativamente a capacidade de *S. aureus* e *C. albicans* de formar biofilmes e aderir a superfícies em 90-95% em concentrações entre 0,025-0,1% p/v.

Atividades antibiofilme também foram demonstradas para BSs produzidos por bactérias probióticas do gênero *Bacillus* sp. que foram isolados de amostras cervico vaginais. Esse bioproduto, denominado de BioSa3, foi altamente eficaz na formação de biofilme de diferentes cepas patogênicas e multiresistentes, como *S. aureus* e *Staphylococcus haemolyticus*. O efeito antibiofilme pode estar relacionado à capacidade do BioSa3 de alterar a fisiologia da membrana dos patógenos testados para causar uma diminuição significativa da hidrofobicidade da superfície (Haddaji *et al*., 2022).

Assim, os CAS constituem bons candidatos para o surgimento de novas terapêuticas para melhor controlar micro-organismos multirresistentes e inibir infecções associadas a biofilmes, protegendo as superfícies da contaminação microbiana.

2.2.5.6 Cicatrização de feridas

A cicatrização de feridas é um processo importante para reparo tecidual, mas complicado em humanos ou animais, por constituir um processo multifacetado organizado por fases sequenciais e sobrepostas, incluindo hemostasia, fase de inflamação, fase de proliferação e fase de remodelação (Martin *et al*., 2015; Wang *et al*., 2018). A falha de uma dessas fases, devido a uma resposta imunológica desregulada ou oxigenação insuficiente, prejudica o processo de cicatrização, levando a dois resultados principais: defeito ulcerativo da pele (ferida crônica) ou formação excessiva de tecido cicatricial (cicatriz hipertrófica ou queloide) (Yip *et al*., 2015; Tatara *et al*., 2018).

O tratamento de feridas de diferentes etiologias constitui uma parte importante do orçamento total da saúde. O tempo de cura, a frequência da troca de curativos e as complicações são três importantes direcionadores de custos. Além disso, a infecção de feridas crônicas, uma das principais causas de não cicatrização, constitui um contribuinte significativo para o aumento dos custos relacionados à assistência em saúde. O tratamento de uma incisão cirúrgica sem complicações é relativamente barato; no entanto, quando ocorrem infecções, esses custos podem aumentar significativamente (Lindholm *et al*., 2016).

Contribuindo com a infecção, biofilmes são comumente encontrados em feridas crônicas. Neste tipo de ferida, a persistência do biofilme contribui para uma cicatrização lenta. As infecções microbianas em feridas crônicas são causadas por mais de uma espécie de bactéria (Rahim *et al*., 2017), sendo que espécies de *P. aeruginosa* e *S. aureus* são mais comuns. Geralmente, essa comunidade microbiana se forma na camada externa das feridas, mas em alguns biofilmes também estão incorporados nas camadas profundas de uma ferida, como os biofilmes de *P. aeruginosa*, que são difíceis de diagnosticar usando uma cultura de esfregaço de ferida tradicional (Pastar *et al*., 2013; Banu *et al*., 2015). Resistência aos antibióticos de bactérias organizadas em biofilme é um problema crucial na gestão e tratamento de feridas crônicas (Rahim *et al*., 2017).

Em virtude desses motivos, o manejo e o tratamento de feridas, bem como a prevenção do biofilme, são considerados como uma prioridade para médicos e comunidade científica. Nesse contexto, os CAS surgiram recentemente como agentes promissores capazes de

promover a cicatrização de feridas em associação com baixa irritação e alta compatibilidade com a pele humana (Ceresa *et al*., 2021). Além disso, esses bioprodutos promovem a proliferação de fibroblastos e células epiteliais, reepitelização e deposição de colágeno mais rápida, levando assim a um processo de cicatrização acelerado (Zouari *et al*., 2016; Ohadi *et al*., 2017).

Surfactina de *B. subtilis* atuou na promoção da cicatrização de feridas e na inibição de cicatrizes. Durante os mecanismos de cicatrização, ele regulou positivamente a expressão do fator-1α induzível por hipóxia (HIF-1α) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), acelerou a migração de queratinócitos através da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e fator nuclear-κB (NF-κB) vias de sinalização e regulou a secreção de citocinas pró-inflamatórias e troca fenotípica de macrófagos. Além disso, a surfactina mostrou efeito inibitório na formação de tecido cicatricial por afetar a expressão de α-actina de músculo liso (α-SMA) e fator de transformação de crescimento (TGF-β) (Yan *et al*., 2020). Portanto, a potência de cura dos lipopeptídeos *B. subtilis* SPB1 pode ser atribuída ao seu potencial de atividade antioxidante revelada *in vitro* (Zouari *et al*., 2016).

Um lipopeptídeo 78 (LP78) de *S. epidermidis* previamente desconhecido, inibiu a inflamação da pele mediada por TLR3 para promover a cicatrização de feridas. A lesão cutânea ativou TLR3 / NF-κB para promover a interação de p65 e PPAR*γ* nos núcleos e, então, iniciou a resposta inflamatória nos queratinócitos. LP78 ativou TLR2-SRC para induzir fosforilação de *β*-catenina em Tyr. A fosfo – *β*-catenina translocada em núcleos para se ligar ao PPAR*γ*, interrompendo assim a interação entre p65 e PPAR*γ*. A dissociação entre p65 e PPAR*γ* reduziu a expressão de citocinas inflamatórias induzidas por TLR3 em feridas cutâneas de camundongos normais e diabéticos, o que se correlacionou com a cicatrização acelerada de feridas (Li *et al*., 2019).

Como alternativa para melhorar esse processo de cicatrização, a formulação de biossurfactante nanolipopeptídeo (NLPB) a partir do biossurfactante lipopeptídeo (LPB) produzido por *Acinetobacter junii* foi relatada como promissora para a realização de atividade cicatrizante. A porcentagem de fechamento da ferida dos camundongos tratados com hidrogéis NLPB a 2 mg/ mL foi de aproximadamente 80% no 7º dia e 100% no 15º dia. A formulação de hidrogel NLPB mostrou melhor eficácia no fechamento e cicatrização de feridas quando comparada com o controle (Afsharipour *et al*., 2021).

Um BS de natureza gliicolipídica, sintetizados por *Bacillus licheniformis* SV1, mostrou boa citocompatibilidade e proliferação de fibroblastos 3T3 / NIH aumentada *in vitro*. A aplicação de pomada do BS em uma ferida de excisão de pele em ratos promoveu reepitelização,

proliferação de células de fibroblastos e deposição mais rápida de colágeno, indicando assim este produto como um potencial substituto transdérmico para melhorar a cicatrização de feridas cutâneas (Gupta *et al*., 2017).

Uma pomada contendo ramnolipídeo (5 g/L) foi administrada no dorso de cada camundongo wister após criar uma ferida de excisão. Os estudos histopatológicos revelaram um efeito cicatrizante significativo do ramnolipídeo, visto que houve um aumento no fechamento da ferida, colagênese melhorada e redução da inflamação (diminuindo o nível de TNF-α) sem induzir irritação na pele (Sana *et al*., 2018). Tratamento com di-rhamnolipídeo pode ser sugerido como terapia para cicatrizes cutâneas, visto que apresentou função antifibrótica em modelos de cicatriz hipertrófica de orelha de coelho por apresentar redução significativa do índice de elevação da cicatriz, fibras de colágeno tipo I e expressão de α-SMA (Shen *et al*., 2016).

A capacidade de cicatrização de feridas por soforolipídeos tem sido evidenciada em modelo de cultura de células. Um modelo de fibroblasto dérmico humano *in vitro* foi usado como substituto da pele humana e foi evidenciado que os soforolipídeos apresentaram efeitos sobre a capacidade dos fibroblastos da pele humana de expressar o mRNA do colágeno I (Col-I) e a inibição de elastase (IC_{50} = 38,5 μg ml^{-1}) (Maeng *et al*., 2018). Outro ensaio *in vitro* de cicatrização de feridas em linha de células de adenocarcinoma colorretal (HT-29) humano, proposto por Kwak et al (2021), mostrou que 48 horas após o tratamento com SL houve uma expressão da colagenase - 1 significativamente aumentada ($p < 0,05$) e todas as dosagens de SL aumentaram significativamente a expressão de occludina e matrilisina-1 (MMP-7).

2.3 Óleo Essencial de Melaleuca

Os óleos essenciais (OEs) são agentes naturais e eficazes no controle de micro-organismos que causam biodeterioração e doenças. Essas substâncias constituem uma importante fonte de compostos biologicamente ativos, que são misturas complexas constituídas principalmente por metabólitos secundários. Mais de 3.000 OEs foram identificados ou comercializados, devido ao seu uso frequente em cosméticos e aromas, bem como nas indústrias alimentícias, como especiarias, ou no preparo de bebidas. Eles também são amplamente conhecidos por seu uso na medicina tradicional como agentes antibacterianos, inseticidas, fungicidas, nematicidas, herbicidas, antioxidantes e anti-inflamatórios (Monzote *et al*., 2020).

Entre os óleos essenciais, o óleo de Melaleuca tem sido um dos mais importantes, uma vez que tem demonstrado um amplo espectro de atividades biológicas. Esse óleo é extraído da

Melaleuca alternifolia (árvore do chá), uma pequena árvore da família Myrtaceae nativa da Austrália. Apesar de toda a sua estrutura, apenas as folhas contribuem para os constituintes do óleo da árvore do chá, que são extraídos por destilação a vapor. O óleo essencial resultante tem um odor medicinal canforáceo único e distinto (Kairey *et al*., 2023).

Embora o óleo da árvore-do-chá possa ser fabricado a partir de outras espécies do gênero *Melaleuca*, a espécie *M. alternifolia* é responsável pela maior parte desse óleo essencial fabricado em todo o mundo, sendo assim, a forma mais comum disponível para compra (Kairey *et al*., 2023).

O óleo essencial da árvore-do-chá pode ser classificado em três quimiotipos principais: terpinen-4-ol, terpinoleno e 1,8-cineol (Borotová et al., 2022), sendo o principal constituinte ativo o terpinen-4-ol. Esse quimiotipo terpinen-4-ol é um álcool monoterpênico natural com boas propriedades antimicrobianas. É eficaz contra *S. aureus* resistente à meticilina (Laughlin *et al*., 2008) e *C. albicans* resistente ao fluconazol (Mertas *et al*., 2015).

Em virtude do potencial antimicrobiano, esse óleo essencial inibiu fortemente o crescimento de diferentes tipos de micro-organismos, incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium italicum Wehmer* e *Penicillium digitatum Sacc*. Além disso, o óleo essencial de *M. alternifolia* demonstrou atividade antioxidante (Zhang *et al*., 2018).

Outra propriedade observada é a atividade antibiofilme contra *Pseudomonas fluorescens* e *Salmonella enterica*, onde foi obtida degradação do espectro proteico após adição desse óleo essencial (Borotová *et al*., 2022). Esse composto também apresentou atividade antitumoral e pró-apoptótica (Di Martile *et al*., 2021).

Diante das propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e analgésicas do óleo da árvore-do-chá e a relativa segurança para uso tópico, o óleo da árvore-do-chá está sendo cada vez mais utilizado em produtos cosméticos e farmacêuticos (por exemplo, shampoos, sabonetes e sabonetes líquidos para o corpo, enxaguatórios bucais, bem como tratamentos sem receita para herpes labial, acne, queimaduras, picadas, piolhos e infecções fúngicas nas unhas) (Cordeiro *et al*., 2020).

Ademais, tem sido utilizado em abordagem nanotecnológica para formular emulsões com propriedades bem definidas para a combinação de medicamentos antifúngicos de tioconazol e óleo essencial *de Melaleuca alternifolia* (Vörös-Horváth *et al*., 2020). Dessa forma, as boas propriedades biológicas do óleo essencial da árvore-do-chá permitem seu uso na indústria alimentícia ou na medicina como agente antioxidante e antimicrobiano (Borotová *et al*., 2022).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Para o isolamento e seleção das leveduras de interesse, durante o horário matutino e período chuvoso, foram coletados frutos das espécies *Anacardium occidentale*, *Byrsonima crassifolia*, *Citrus reticulata* e *Platonia insignis* de plantas presentes em sítios localizados nos Municípios de São José de Ribamar e São Luís, Maranhão. Os frutos selecionados para isolamento de leveduras encontravam-se em estágio intermediário de maturação. Os frutos colhidos foram armazenados em caixas térmicas com gelo e transportados ao Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade CEUMA para posterior processamento.

3.2 Isolamento e identificação de Leveduras

Os frutos foram inicialmente higienizados com hipoclorito de sódio a 5% para isolamento de leveduras produtoras de CAS e lavados três vezes com água destilada estéril para remoção do hipoclorito de sódio. Posteriormente, aproximadamente 20 gramas de amostras de frutas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer com adição de meio mineral mínimo (MM) contendo (em g/L) 1,0g K_2HPO_4; 1,0g KH2PO4; 0,2g MgSO4.7H_2O; 1,0g NH_4NO_3; 0,002g $CaCl_2.2H_2O$; 0,2% de extrato de levedura com adição de 2% de óleo de girassol ou glicerol, como única fonte de carbono. O pH final do meio foi 7,2.

Os frascos foram incubados a 30°C com agitação de 140 rpm durante sete dias. Após a incubação, 1 mL das culturas foi diluído em série em solução salina estéril (NaCl a 0,85%). Alíquotas de 50 µL de diluições decimais foram espalhadas na superfície do meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Difco TM, Detroit, MI, EUA) para isolar, quantificar e caracterizar as colônias.

Amostras de colônias de leveduras foram inoculadas em meio SDA para obtenção de cultura pura; posteriormente, foram realizados microcultivos para caracterização morfológica. As leveduras foram acondicionadas em tubos inclinados com meio SDA e armazenadas em criotubos a –80 ºC em caldo Sabouraud (Difco) com 20% de glicerol.

A identificação de isolados de levedura baseada em MALDI-TOF MS foi realizada de acordo com Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha) usando o protocolo de Aslani et al (2018).

3.3 Identificação de leveduras produtoras de CAS

3.3.1 Caracterização da atividade emulsificante (E_{24}) do sobrenadante da cultura

Os isolados de leveduras foram inoculados a uma concentração inicial de 0,1 DO600 nm (≈ $1X10^7$ UFC/mL) em frascos Erlenmeyer de 50 mL de meio mineral mínimo (MM) contendo (em g/L) 1,0g K_2HPO_4; 1,0g KH2PO4; 0,2g $MgSO_4$. 7H2O; 1,0g NH_4NO_3; 0,002g $CaCl_2.2H_2O$; 0,2% de extrato de levedura com adição de 2% de glicerol ou 2% de óleo de girassol (como fontes de carbono para produção de CAS conforme proposto por Monteiro et al. (2010), com modificações. Cada isolado de levedura foi incubado nas fontes de carbono para avaliar a produção de CAS. As culturas microbianas foram incubadas por até 144 horas a 30°C sob agitação a 140 rpm. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos e os sobrenadantes foram utilizados no teste de atividade emulsificante (E_{24}).

A atividade emulsificante foi determinada pelo índice de emulsificação (E24), no qual o sobrenadante foi aplicado diretamente em tubos de ensaio na proporção de 50% (2 mL) e 50% (2 mL) de diferentes substratos hidrofóbicos (azeite, óleo de girassol e pós-frituras, querosene, hexano e hexadecano). A mistura foi submetida à agitação em vórtex durante 2 min. Após 24 h, a atividade emulsificante (E_{24}) foi determinada dividindo a altura da camada emulsionada pelo tamanho total da mistura, expressa em porcentagem (Cameron *et al.*, 1988, com modificações). Para os testes, ramnolipídeos (100 mg/mL) (Di-rhamnolipid, Sig-ma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foi um controle positivo e o meio MM foi um controle negativo. Os testes de atividade emulsificante foram realizados em triplicata.

3.3.2 Determinação da tensão superficial da água na presença de bioemulsificante

A tensão superficial (TS) foi medida utilizando um tensiômetro tipo anel Du Nouy (Tensiômetro Manual, modelo k6, Krüss GmbH, Alemanha). A medição de TS foi realizada a 20°C (com modificações). Para os testes, o Dodecilsulfato de sódio (SDS, 100 mg/L) foi o controle positivo e o meio MM foi o controle negativo. A medição de TS foi realizada a 20°C com modificações). A concentração de bioemulsificante utilizada variou de 0,01 mg/mL a 10 mg/mL. O anel pendurado no gancho da balança estava imerso no líquido. Então, o anel foi puxado lentamente para cima, baixando a placa de amostra. Finalmente, a força aplicada ao anel durante a tração na superfície foi registrada. A medição foi repetida três vezes; o anel de

platina foi lavado três vezes com água destilada e três vezes com álcool entre as medições (Monteiro *et al*., 2010). Água destilada e meio não inoculado foram utilizados como controle negativo.

3.4 Análise da composição química dos CAS

Métodos padronizados foram utilizados para determinar a composição química do bioemulsificante. O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al (1956), usando D-glicose como padrão. O conteúdo de proteína foi medido conforme descrito por Bradford et al (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão. O conteúdo lipídico foi estimado utilizando o kit de triglicerídeos mono reagente K117 – BIOCLIN. Todos os ensaios foram feitos em triplicata. A composição de carboidratos e lipídios do bioemulsificante (CAS) foi determinada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS), utilizando o protocolo desenvolvido anteriormente por Monteiro et al (2010).

3.5 Cinética de crescimento

O inóculo foi preparado a partir de células de *Candida krusei* incubadas em meio ágar sabouraud por 24 h a 32 ºC, e lavadas com solução salina (NaCl 0,85, p/v). Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em tubos plásticos de 50 mL contendo 20 mL de meio MM. Leituras da DO a 600 nm foram realizadas e os valores obtidos foram utilizados para a determinação do volume a ser transferido aos frascos de ensaio de modo a obter uma concentração final de 0,02 D.O, correspondente ao valor de Log_{10} UFC/mL de 3,32.

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio mínimo mineral adicionado de 2% de glicerol. Os frascos foram incubados a 32 ºC sob agitação contínua de 180 rpm por até 144 h. Amostras foram removidas em diferentes intervalos de tempo para determinação da concentração celular, produção do biossurfactante, taxa de produção volumétrica e atividade emulsificante. Os ensaios foram realizados em três repetições.

Para avaliação da concentração celular, alíquotas foram retiradas, diluídas serialmente e plaqueadas em meio Sabouraud sólido para a determinação de UFC/mL, e os valores obtidos foram convertidos em Log_{10} de UFC/mL (Monteiro *et al*., 2010). Amostras do sobrenadante foram também avaliadas quanto à atividade emulsificante pelo índice de emulsificação (E_{24}) como descrito no item 3.3.1. Os ensaios foram realizados em três repetições.

3.6 Estabilidade do CAS em diferentes concentrações de NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$, autoclavagem e variação de pH

Os efeitos de diferentes concentrações (10%; 30% e 50%) de cloreto de magnésio (MgCl2), cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de cálcio ($CaCl_2$); da temperatura de 121° C por 15 min (autoclavagem) e diferentes pH valores (3-10) foram analisados na atividade do CAS. A atividade emulsificante (E_{24}) foi avaliada após ajuste do pH mínimo (Adetunji *et al*., 2020).

3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.7.1 Teste de difusão de poço em ágar

Os testes foram realizados de acordo com Johnson et al. (1995) com modificações para o estudo da atividade antimicrobiana do CAS. Para os ensaios, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram semeados em Tryptic Soy Agar (TSA, Difco TM, Detroit, MI, EUA) por 24h a 30-37 °C. Posteriormente, os isolados foram suspensos em NaCl 0,9% e ajustados para igualar a turbidez padrão a 0,5 na escala McFarland ($1,5x10^8$ UFC/mL). As suspensões foram utilizadas para semeadura em meio TSA estabilizado a 37°C (0,1 mL de suspensão teste de micro-organismos/10 mL de meio). O meio de cultura TSA foi vertido em placas de Petri de 90 mm (20 mL de meio/placa) e deixado solidificar. Uma vez sólido o meio, foram confeccionados quatro poços de 9 mm de diâmetro e preenchidos com um volume de CAS produzidos por *C. krusei*, óleo essencial de Melaleuca e emulsão (mistura de CAS e óleo essencial de Melaleuca). As placas foram pré-incubadas durante uma hora à temperatura ambiente para assegurar uma difusão adequada e finalmente incubadas a 30-37 °C durante 24h. Halos de inibição avaliados em mm. Todos os testes foram realizados em triplicado.

Para formar a emulsão entre o CAS e o óleo essencial de melaleuca (adquirido comercialmente), foram utilizados 50mg de CAS. Esta quantidade foi dissolvida em água estéril; posteriormente, essa solução foi aplicada diretamente em tubos de ensaio, na proporção (2 mL) da solução e (2 mL) de óleo essencial de Melaleuca. A mistura foi submetida a vórtex por 2 min, e a emulsão (OMBE4CK) formada foi utilizada nos testes.

3.8 Atividade antibiofilme

3.8.1. Inibição da Formação de Biofilme em Poliestireno

Suspensões de isolados formadores de biofilme foram preparadas de acordo com a metodologia estabelecida por Merghini et al (2017) com modificações. Para os ensaios, foram preparadas suspensões de cada isolado de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923 em caldo Mueller-Hinton (Difco TM, Detroit, MI, EUA) acrescidos a 5% de sacarose, na concentração celular de 0,5 na escala de turbidez de McFarland ($1{,}5x10^8$UFC/mL). Os bioemulsificantes foram diluídos em caldo Mueller-Hinton nas concentrações de 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL e 1,56 mg/mL, com volume final de 200 µL. Cada poço contendo o bioemulsificante recebeu 20 µL da suspensão bacteriana padronizada. A placa foi então incubada por 24 horas a 35±2°C.

O conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram lavados suavemente três vezes com 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) e as placas foram mantidas em temperatura ambiente para secar. A biomassa aderida foi fixada com 200 µL de metanol (PA 99% v/v) por 10 min. Em seguida, 200 µL de solução cristal violeta a 0,5% foram adicionados a cada poço. Posteriormente, o cristal violeta foi removido e os poços lavados três vezes com água destilada. Em seguida, foram adicionados 200 µL de álcool 95% (v/v) a cada poço e a DO do extrato de cristal violeta foi determinada em leitor de microplacas a 570 nm. Utilizando a fórmula abaixo, foi calculada a percentagem de inibição do biofilme.

Porcentagem de inibição (%) = 100 - ((DO 570 nm do tratamento) / (DO 570 nm do controle) × 100).

O estudo também avaliou a atividade da emulsão resultante da combinação do bioemulsificante e óleo essencial de Melaleuca (OMBE4CK) na inibição da formação de biofilme para cada bactéria. Para isso, seguiu-se o mesmo procedimento metodológico descrito no item 3.7.1. As concentrações utilizadas de OMBE4CK foram de 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL e 1,56 mg/mL.

3.8.2 Inibição da formação de biofilme em cateter de poliuretano

3.8.2.1 Análise quantitativa

Para a avaliação da inibição da formação de biofilme em cateter de poliuretano (sonda enteral – Embramed SP, Brasil), segmentos estéreis do dispositivo, com aproximadamente 4

cm, foram imersos em TSB contendo 0,5 x10^5UFC/mL de suspensões *S. aureus* 25923 e concentrações da emulsão OM4CK (25 mg/mL-1,56 mg/mL). Os fragmentos de cateter foram incubados por 24 horas a 37ºC. Após a incubação os cateteres foram lavados com 200 µl de salina estéril por 3 vezes e foram agitados no vórtex por 2 minutos. Cerca de 100 µl da última lavagem foram retirados para realização de diluições seriadas em salina estéril. Após as diluições ($10^{-1,}$ 10^{-2} e 10^{-3}) 30 µl da amostra serão transferidas para superfície de placas Petri contendo meio TSA e as amostras homogeneizadas com alças de Drigalsky. Após a secagem das amostras, as placas serão incubadas por 24 horas a 37ºC. Após a incubação, as colônias foram contadas (Souza *et al.*, 2015, com modificações). Todos os testes serão realizados em quadruplicata com 2 testes independentes.

3.8.2.2 Análise semiquantitativa

Análise semiquantitativa da inibição da formação de biofilme em superfície de cateter de poliuretano foi realizada pela técnica de rolamento do segmento de cateter na placa de Petri contendo o meio TSA (Maki *et al.*, 1977).

3.8.3 Erradicação do biofilme

A avaliação da influência do CAS nos biofilmes produzidos por *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923 foi realizada após a formação de biofilmes microbianos na superfície das placas de poliestireno de 96 poços, conforme metodologia estabelecida por Morais et al (2017) com modificações. Foram adicionados 200 µL de Brain Heart Infusion (BHI, Difco TM, Detroit, MI, EUA) com 2% de sacarose a todos os poços, em seguida foram adicionados 10 µL de suspensão bacteriana padronizada na escala de McFarland (~0,5 x10^8 UFC/mL), o controle positivo foi realizado com adição de meio BHI + sacarose, foram adicionados 10 µL de suspensão bacteriana. Para o controle negativo, foi adicionado apenas meio BHI com sacarose.

As placas foram incubadas durante 48 horas a 37°C. Após a incubação, os poços foram lavados suavemente com 200 µL de solução salina estéril três vezes em cada poço, em seguida foram adicionados 200 µL de concentrações de 25 mg/mL; 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml; 3,12 mg/mL; 1,56 mg/mL e incubado por 24 horas. Após a incubação, foi realizada lavagem com 100 µL de solução salina (NaCl, 0,85%). Posteriormente, 100 µL de solução salina foram adicionados aos poços da placa e realizada a homogeneização. Foram retirados 50 µL do poço

e diluições decimais foram realizadas para plaqueamento das amostras. As células viáveis foram determinadas usando plaqueamento de microgotículas, para as quais aproximadamente 10 µL foram transferidos para uma placa Tryptic Soy Agar (TSA, Difco TM, Detroit, MI, EUA) como uma gota; após a secagem, a placa foi incubada corretamente por 24 horas na estufa bacteriológica. Após a incubação das placas, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

O estudo também avaliou a atividade da emulsão resultante da interação entre o bioemulsificante e o óleo essencial de Melaleuca (OMBE4CK) na erradicação do biofilme de cada isolado. Para isso, seguiu-se o mesmo procedimento metodológico 3.7.1. As concentrações utilizadas de OMBE4CK foram 25 mg/mL; 12,5mg/mL; 6,25mg/mL; 3,125 mg/mL e 1,56 mg/mL da emulsão. Todos os testes foram realizados em triplicado.

3.9 Avaliação de citotoxicidade do bioemulsificante

3.9.1 Utilização de células renais de macaco verde africano (VERO)

O ensaio para avaliação da citotoxicidade do bioemulsificante foi realizado utilizando células renais de macaco verde africano (VERO), de acordo com Sieuwerts et al. (1995). Para o ensaio, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato e ressuspensas em solução de Dulbecco meio de cultura Eagle modificado (DMEM, Thermo Scientific, Erlangen, Alemanha) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) com 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina. A contagem celular foi realizada para determinar a célula número com um volume igual de azul de tripano. Resumidamente, 100 µL de DMEM com 10% de SFB foram adicionados à placa de 96 poços (TPP, Suíça). As células foram adicionadas aos poços (1,5 x 10^6 células por poço) e tratadas com BE4CK (1024 µg/mL – 2 µg/mL) diluído em DMEM e PBS para o controle negativo. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO_2 e 90% de umidade em incubadora.

Após a incubação, 20 µL de MTT (Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich) a 5 mg/mL foi adicionado em cada poço na placa de 96 poços e incubado por quatro horas em 37°C, 5% de CO_2 e 90 % umidade incubadora. Após a incubação, 170 µL de meio com MTT foram removidos de cada poço e 100 µL de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados a cada poço para extrair e solubilizar o cristal de formazan. Finalmente, a placa foi lida no comprimento de onda de 570 nm usando TP-Reader Plus (ThermoPlate, China). Cada concentração de extrato (flavonóides) foi testada em triplicata em dois

experimentos independentes. A fórmula a seguir calculou a porcentagem de proliferação: [amostra DO – controle DO] × 100% Proliferação = controle DO.

3.9.2 Utilização de modelo alternativo de *Tenebrio molitor*

Para avaliar o efeito tóxico do CAS e OE Melaleuca em modelo *in vivo* alternativo foram utilizadas larvas do inseto *Tenebrio molitor*, família Tenebrionidae (Edosa *et al*., 2020). As larvas com pesos próximos de 100 mg foram randomizadas em grupos de 10 larvas por grupo. Antes da inoculação do CAS e a emulsão resultante da mistura do bioemulsificante e óleo essencial de Melaleuca, as cutículas das larvas foram higienizadas com álcool 70%. Após todo o procedimento de higienização das larvas, foram inoculados 10µL do OE Melaleuca e, com auxílio de uma seringa de insulina estéril. As larvas foram mantidas em placas de Petri estéril, sendo avaliadas a sobrevivência e melanização diariamente, por 5 dias. A curva de sobrevivência foi determinada com base na ausência de movimento e melanização total das larvas. Para o controle negativo, foram injetados 10µL de tampão fosfato salino (PBS, 1%, pH 7,1) estéril.

3.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos para análise estatística utilizando o procedimento ANOVA unidirecional do GraphPad Prism (versão 8.0.2). Todos os resultados duplicados são expressos como média ± desvio padrão. As diferenças foram examinadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 95%. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento de leveduras produtoras de compostos ativos de superfícies

No presente estudo, foi realizado o isolamento de leveduras (n=13) a partir de frutos identificados como *Anacardium occidentale, Byrsonima crassifólia, Citrus reticulata* e *Platonia insignis* (Tabela 2). MALDI-QTOF-MS identificou as cepas de levedura como *Candida metapsilosis* e *Candida krusei*.

Tabela 2- Leveduras isoladas de frutos e substrato como única fonte de carbono para crescimento.

Fruta	Nome popular	Identificação	Substrato
Anacardium occidentale	Caju	*Candida krusei* C1CK	Glicerol
Anacardium occidentale	Caju	*Candida krusei* C2CK	Glicerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida krusei* M1CK	Glicerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida krusei* M2CK	Glicerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida krusei* M3CK	Glicerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida krusei* M4CK	Glicerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida metapsilosis* M1CM	Óleo de Girassol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida metapsilosis* M2CM	Óleo de Girassol
Citrus reticulata	Tangerina	*Candida metapsilosis* T2CM	Óleo de Girassol
Platonia insignis	Bacuri	*Candida metapsilosis* B1CM	Glicerol
Platonia insignis	Bacuri	*Candida metapsilosis* B2CM	Glicerol
Platonia insignis	Bacuri	*Candida metapsilosis* B3CM	Glicerol
Platonia insignis	Bacuri	*Candida metapsilosis* B4CM	Óleo de Girassol

As leveduras isoladas foram inoculadas separadamente em meio mineral mínimo contendo óleo de girassol e glicerol na concentração de 2%. A tabela 2 demonstra a melhor fonte de carbono e energia para o crescimento.

4.2 Triagem e identificação de micro-organismos produtores de CAS

4.2.1 Determinação da atividade emulsificante (E_{24})

Este estudo teve como objetivo investigar as propriedades de emulsificação do composto ativos de superfícies, portanto o teste E_{24} foi utilizado principalmente para determinar a presença de CAS nas amostras. O isolado de levedura mais eficiente na produção de compostos ativos de superfícies com atividade emulsionante para diversas fontes de carbono foi isolado do fruto *Byrsonima crassi-folia*, popularmente conhecido como murici, e identificado como *Candida krusei* M4CK. E_{24} foi determinado e os valores foram indicados (Tabela 3). Os CAS produzidos por *C. krusei* M4CK foram os únicos que apresentaram atividade emulsificante em todas as fontes de carbono.

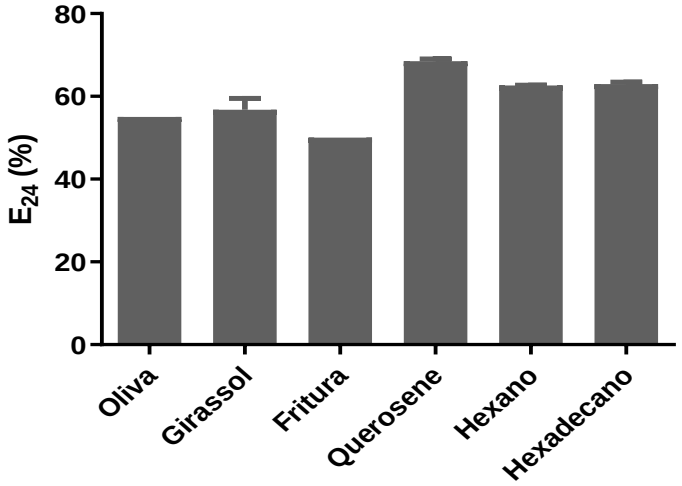
Tabela 3 - Valores de E_{24} de leveduras isoladas de frutos *Anacardium occidentale, Byrsonima crassifolia, Citrus reticulata e Platonia insignis.*

Substratos	**E_{24}**												
	C1CK	C2CK	M1CK	M2CK	M3CK	M4CK	M1CM	M2CM	T2CM	B1CM	B2CM	B3CM	B4CM
Óleo de girassol	50%	50%	N	55%	N	56,75%	N	N	N	N	N	N	N
Óleo de oliva	N	48%	N	56.75%	36%	55%	N	35%	N	N	50%	N	N
Óleo de fritura	N	50%	N	50%	33%	50%	N	33%	N	N	51%	N	N
Querosene	60%	51%	64%	N	46%	68,5%	40%	33%	37%	37%	N	N	N
Hexano	60%	50%	37%	N	N	63,6%	N	N	33%	N	62,5%	N	N
Hexadecano	48%	49%	32.5%	62.9%	N	63,95%	N	N	N	N	62%	N	N

N- Não apresentou E_{24}.

A atividade de emulsificação dos CAS contidos no sobrenadante do meio MM com glicerol como fonte de carbono foi apreciável. Os CAS, denominados *Candida krusei* M4CK, apresentaram valores de E_{24} de 55%; 56,75%; 50%; 68,5%; 63,6% e 63,95% para azeite, óleo de girassol, óleo de fritura (usado), querosene, hexano e hexadecano, respectivamente (Figura 3).

Figura 3-Atividade emulsificante (E_{24}) apresentada por CAS produzidos por *Candida krusei* M4CK em diferentes compostos hidrofóbicos.



Os valores indicam a média, enquanto as barras de erro representam o desvio padrão (DP).

4.2.2 Determinação da tensão superficial

A produção de biossurfactantes e bioemulsificantes por isolados de leveduras pode ser identificada indiretamente através da atividade superficial e da atividade emulsificante. Os valores da tensão superficial final (mN/m), no meio após o crescimento celular, foram determinados utilizando um tensiômetro e variaram de 44 a 62 mN/m (Tabela 4).

Neste estudo, foi observado que o composto produzido por *Candida krusei* M4CK, com melhor E_{24} para todas as fontes de carbono, apresentou redução na tensão superficial de 72 mN/m para 44 mN/m. Este resultado não demonstrou redução na tensão superficial para valores abaixo de 30 mN/m. Por esse motivo foi caracterizado como bioemulsificante (Lin *et al*., 2022) e foi denominado de BE4CK.

Tabela 4 - Determinação da tensão superficial final (mN/m) em meio após cepas de leveduras de crescimento celular.

Leveduras	Substrato	Tensão superficial mN/m
Candida krusei C1CK	Glicerol	55
Candida krusei C2CK	Glicerol	55.2
Candida krusei M1CK	Glicerol	54.5
Candida krusei M2CK	Glicerol	55.2
Candida krusei M3CK	Glicerol	56.2
Candida krusei M4CK	Glicerol	44
Candida metapsilosis M1CM	Óleo de Girassol	45
Candida metapsilosis M2CM	Óleo de Girassol	46
Candida metapsilosis T2CM	Óleo de Girassol	56.4
Candida metapsilosis B1CM	Glicerol	59.3
Candida metapsilosis B2CM	Glicerol	56
Candida metapsilosis B3CM	Glicerol	52
Candida metapsilosis B4CM	Óleo de Girassol	62

mN/m -Milinewton por metro

4.3 Determinação da composição química

As análises da composição química do CAS (BE4CK) revelaram a presença de carboidratos (46%), proteínas (38%) e menor quantidade de partes lipídicas (3%).

As frações cromatográficas do bioemulsificante BE4CK mostraram que o principal ácido graxo foi o ácido 9-octadecenóico (58,43%), seguido pelo estearato de metila (16,72%) e ácido hexadecanóico (13,44%) (Tabela 5). Os ácidos graxos detectados foram fornecidos somente após hidrólise da amostra do BE4CK.

Tabela 5- Composição de ácidos graxos de bioemulsificante (BE4CK) isolado de *Candida krusei* M4CK

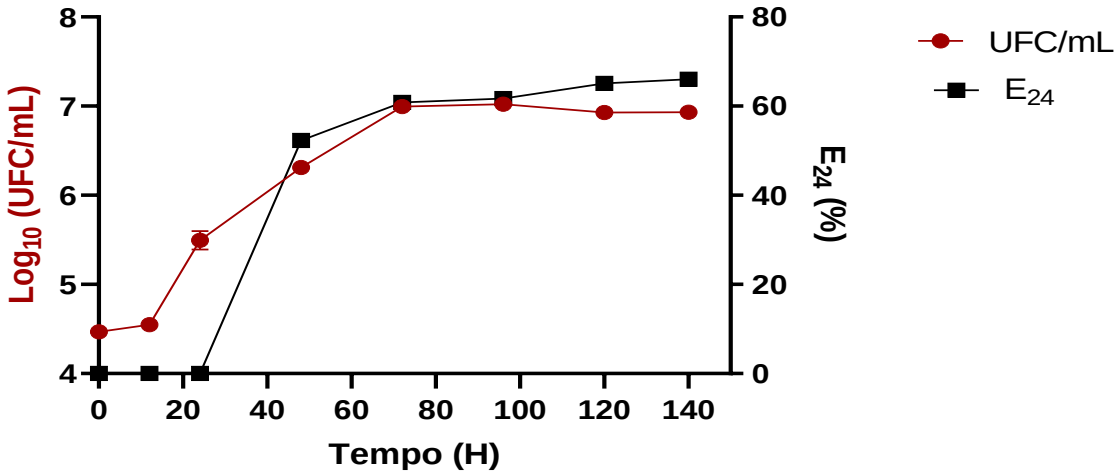
Ácidos graxos	(%)
Ácido hexadecanóico	13,44%
Ácido (9Z,12Z) -Octadeca-9,12-dienóico	9,58%
Ácido 9-octadecenóico	58,43%
Estearato de Metila	16,72

O composto BE4CK apresenta em sua estrutura oito tipos de carboidratos, caracterizados como ramnose, ribose, frutose, arabinose, xilose, manose, glicose e galactose. No entanto, os monossacarídeos como manose (84,26%) e glicose (15,74%) foram mais predominantes (Anexo A).

4.4 Cinética de crescimento

O crescimento de *Candida krusei* M4CK, atividade emulsificante e produção de bioemulsificante em meio mineral suplementado com 2% de glicerol são mostrados na figura 4. Para o isolado, a E_{24} segue um crescimento exponencial da fase de crescimento. Cerca de 52,3% da atividade E_{24} em querosene foram obtidos na fase de crescimento exponencial nas primeiras 40h. Após este período, a atividade E_{24} aumentou, atingindo um percentual ≥ 60% no período de 60h – 144h. Esses resultados indicam que a atividade de emulsificação está associada ao crescimento. A melhor estabilidade e maior atividade de emulsificação foram alcançadas às144 horas (Figura 4).

Figura 4-Cinética de crescimento celular por *Candida Krusei* M4CK e atividade emulsificante por BE4CK.

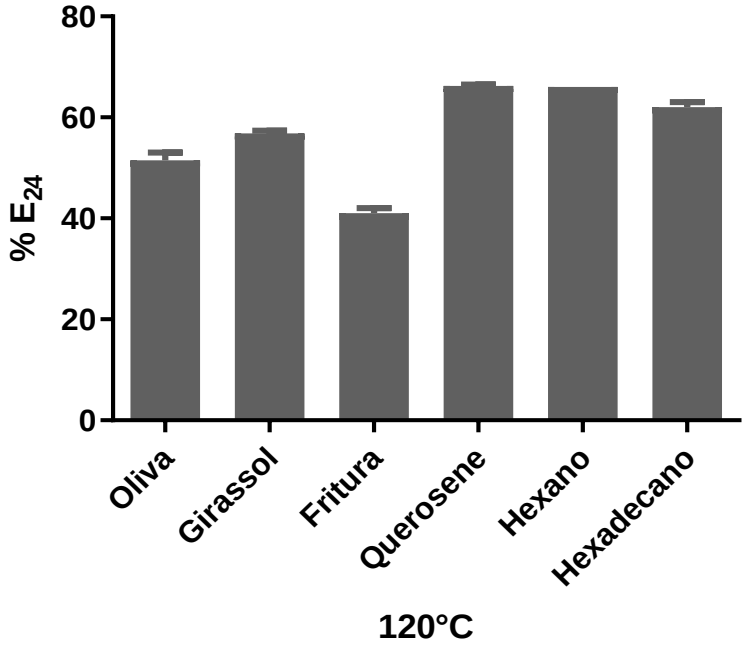


4.5 Avaliação da estabilidade do bioemulsificante

4.5.1 Efeito da temperatura na atividade emulsificante (E_{24})

Após ser submetido ao processo de autoclavagem a 120 °C por 15 minutos, o BE4CK apresentou estabilidade e manutenção de propriedades emulsificantes, uma vez que emulsificou todas as fontes hidrofóbicas utilizadas (Figura 5). A E_{24} do bioemulsificante foi de ≥ 50% em óleo de oliva e girassol, enquanto para os hidrocarbonetos querosene, hexano e hexadecano foi maior que 60%. Verificou-se que, para o óleo de fritura (E_{24} de 40%) houve uma redução de 10% da atividade emulsificante primária (Figura 5).

Figura 5- Atividade emulsificante (E_{24}) do BE4CK após aquecimento de 120°C.

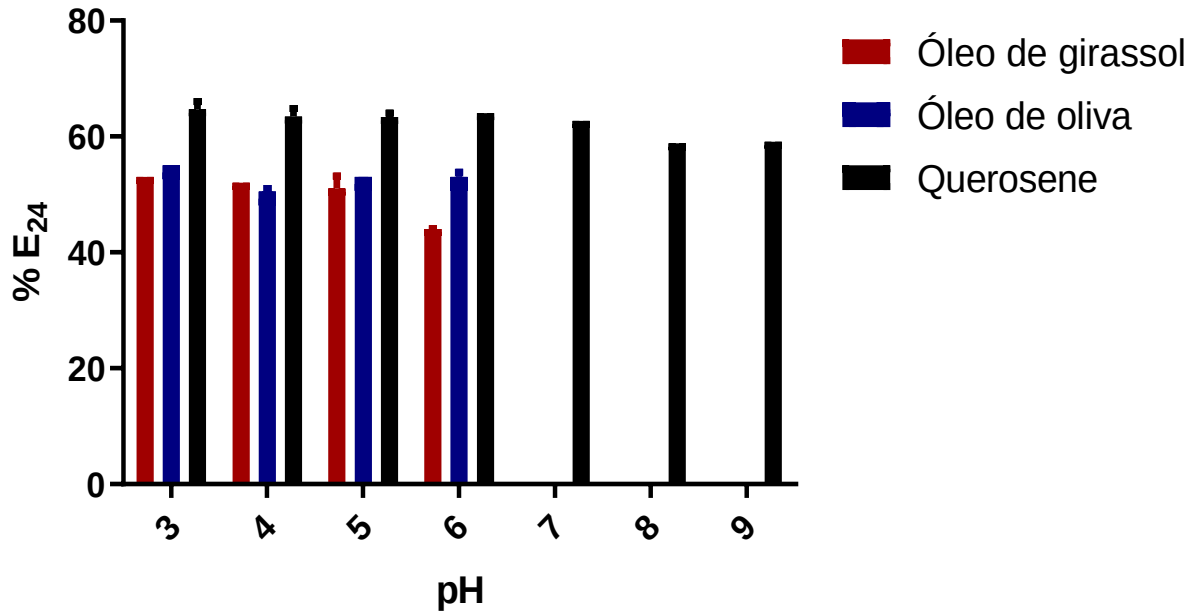


Os valores indicam a média, enquanto as barras de erro representam o desvio padrão (DP).

4.5.2 Efeito do pH na atividade emulsificante

O CAS produzido por *C. krusei* apresentou atividade emulsificante para diferentes fontes em pH ácidos e básicos (figura 6). Em pHs ácidos (3-6), a atividade de emulsificação foi ≥ 44% para todos os substratos (girassol, oliva e querosene), enquanto em pHs básicos a emulsificação foi caracterizada apenas para os hidrocarbonetos de querosene. Nesta fonte, não houve variações acentuadas da E_{24} nas faixas de pH 3 a 9. A partir do pH oito, o bioemulsificante produzido pela linhagem *C. krusei* M4CK conseguiu emulsificar apenas o querosene (Figura 6). Na faixa do pH 10 (dados não demonstrados) não houve estabilidade da emulsificação para nenhuma das fontes.

Figura 6-Atividade emulsificante (E_{24}) de BE4CK em diferentes faixas de pH.



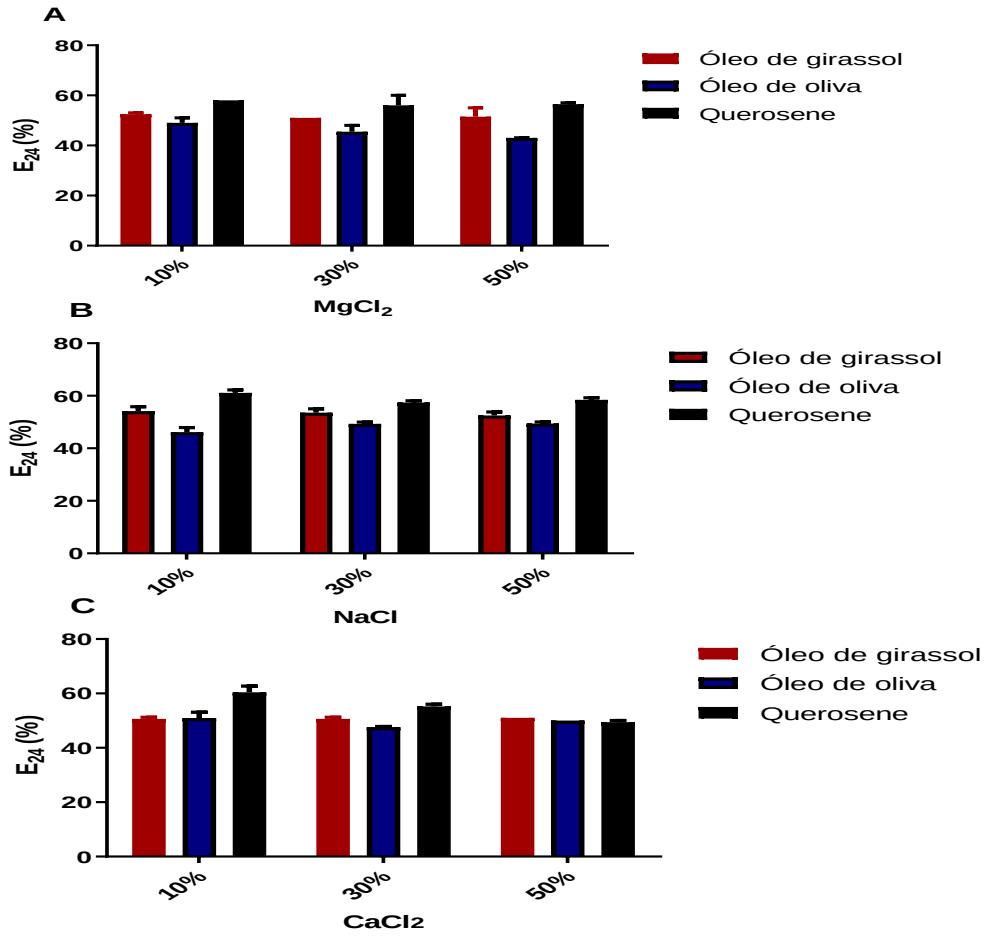
Os valores indicam a média, enquanto as barras de erro representam o desvio padrão. pH: potencial hidrogeniônico.

4.5.3 Efeito da salinidade na atividade emulsificante

Observou-se que a E_{24} do bioemulsificante em concentrações (10%; 30% e 50%) de sais de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de cálcio ($CaCl_2$) teve atividade que variava entre 40% - 55% em óleos vegetais (girassol e oliva) e para o querosene um percentual ≥ 56%. Em todos os tipos e concentrações de sais, o maior valor de E_{24} foi obtido com querosene, enquanto o menor foi registrado com óleo de oliva (Figura 7).

A estabilidade da atividade emulsificante (E_{24}) foi mantida em concentrações de 50% dos sais, porém foi verificado que, à medida que a salinidade aumentava, houve uma pequena redução na taxa de emulsificação. Entretanto, a mudança de concentrações de sais parece não ter impacto significativo nos valores de E_{24} (Figura 7).

Figura7-Estabilidade da atividade emulsificante em diferentes concentrações de sais.



(A) $MgCl_2$: Cloreto de magnésio; (B) NaCl: Cloreto de Sódio; (C) $CaCl_2$: Cloreto de Cálcio. Os valores são a média ± DP de três experimentos independentes.

4.6 Determinação da atividade antimicrobiana

4.6.1 Atividade antimicrobiana em difusão em ágar

Ao avaliar a atividade antimicrobiana através do ensaio de difusão em ágar (Figura 8), constatou-se que os isolados de *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923 foram significativamente sensíveis ao óleo essencial de Melaleuca considerando $p < 0,05$ (Tabela 6). No caso do BE4CK, o crescimento dos micro-organismos não foi afetado.

A emulsão OMBE4CK, resultante da mistura do bioemulsificante e óleo essencial de Melaleuca, apresentou aumento na zona de inibição de crescimento, correspondendo a 34,5 mm para *E. coli* ATCC 25922. Em comparação, o óleo de Melaleuca sozinho formou uma zona de

inibição de 28,5 mm para este micro-organismo. Assim, a combinação dos compostos apresentou atividade antimicrobiana, tornando a *E. coli* ATCC 25922 mais sensível (Tabela 6 e Figura 8).

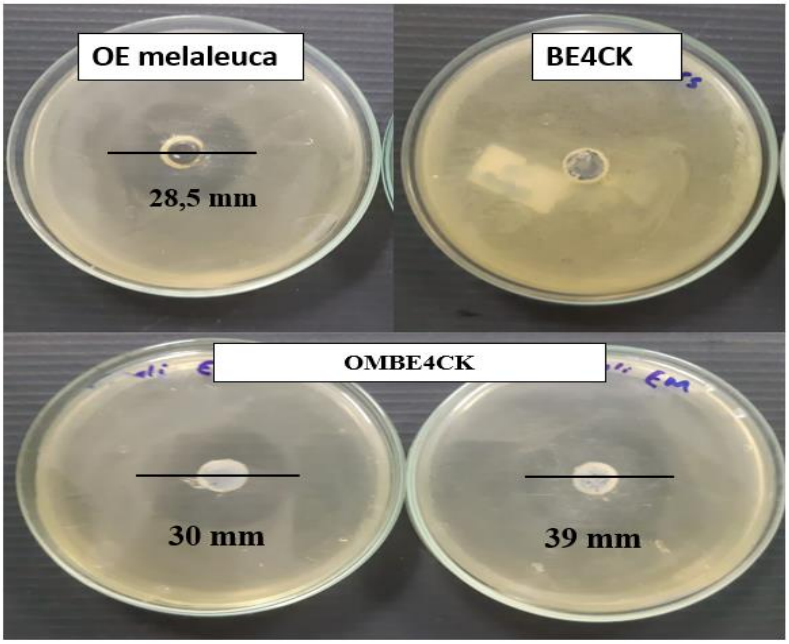
Ao contrário do BE4CK, a emulsão OMBE4CK e o óleo essencial de Melaleuca apresentaram atividade inibitória significativa contra *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 35218 e *S. aureus* ATCC 25923. A emulsão não conseguiu inibir o crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Tabela 6- Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Melaleuca, bioemulsificante isoladamente e da combinação de BE4CK e OMBE4CK (emulsão) contra micro-organismos.

Composto	**Atividade antimicrobiana (mm)**			
	E. coli **ATCC 25922**	***E. faecalis*** **ATCC 35218**	***P. aeruginosa*** **ATCC 27853**	**S. *aureus*** **ATCC 25923**
BE4CK (25 mg/mL)	N	N	N	N
Óleo essencial Melaleuca	28.5 ± 2.1	26 ± 1.4	17 ± 2.8	33.5 ± 0.7
OMBE4CK	34.5 ± 6.3	14.5 ± 2.1	N	24 ± 1.4

N - Sem atividade antimicrobiana. Os valores são a média ± Desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. ($p < 0,05$) – diferença significativa em relação aos compostos.

Figura 8- Atividade antimicrobiana do BE4CK e emulsão (OE Melaleuca e BE4CK- OMBE4CK) por difusão em ágar frente *E. coli* ATCC 25922.



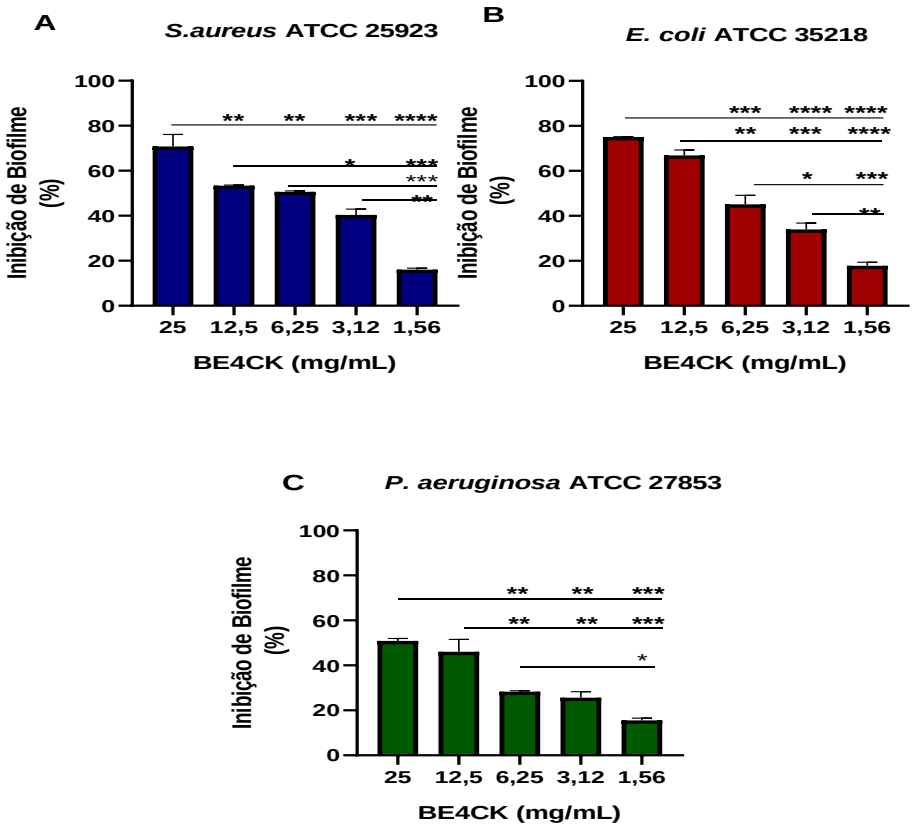
Fonte: de autoria própria.

4.7 Determinação da atividade antibiofilme

4.7.1 Inibição da formação de Biofilme em poliestireno

O potencial antibiofilme do bioemulsificante BE4CK produzido por *C. krusei* M4CK foi determinado pela sua capacidade de prejudicar e inibir a formação de biofilme por *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 9 A, B e C). A atividade mais significativa foi na concentração de 25 mg/mL, aplicado nesta concentração, BE4CK mostrou potencial inibitório significativo (p <0,001) contra *S. aureus* ATCC 25923 (71%), *E. coli* ATCC 25922 (75%) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (51%). Mesmo em concentrações mais baixas (1,56 mg/L–3,12 mg/L), foi capaz de inibir a formação de biofilme por *S. aureus* ATCC 25923 (40% –16%), *E. coli* ATCC 25922 (34%–18%) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (26–16%), respectivamente.

Figura 9-Atividade inibitória do BE4CK na formação de biofilme por micro-organismos na superfície de poliestireno.

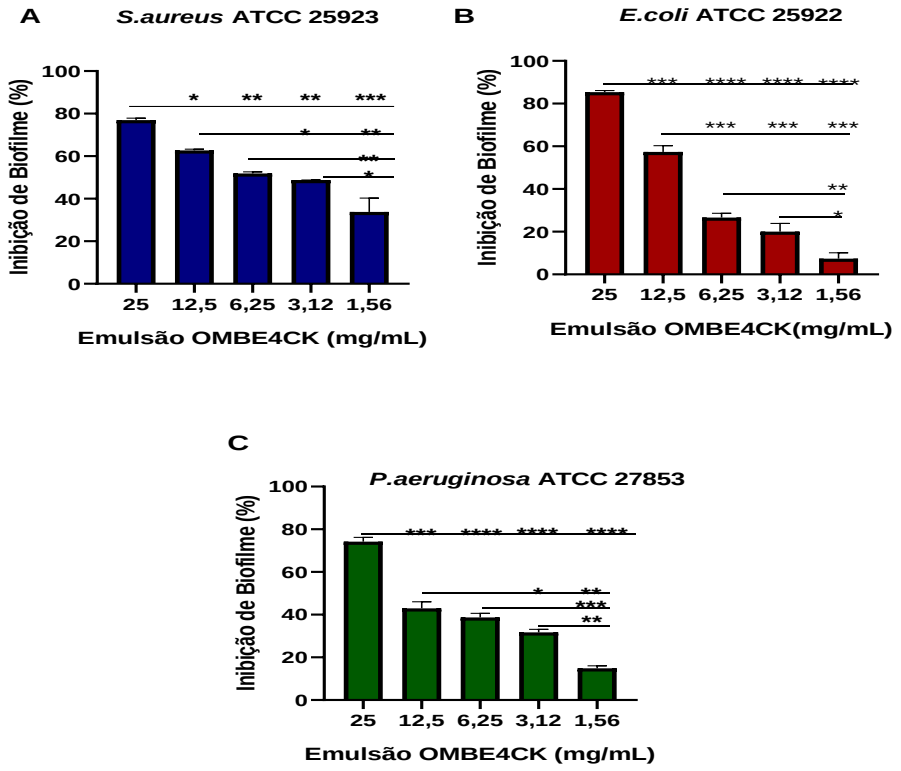


(A) *S. aureus* ATCC 25923; (B) *E. coli* ATCC 25922; (C) *P. aeruginosa* ATCC 27853. Os valores são a média ± DP de três experimentos independentes. * (p < 0,05), **(P< 0,001), *** (p < 0,001), **** (p < 0,0001) - diferença significativa em relação as concentrações.

A capacidade da emulsão OMBE4CK resultante da combinação do bioemulsificante BE4CK e óleo essencial de Melaleuca em reduzir a formação de biofilme por *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi avaliada utilizando placas de microtitulação de 96 poços (Figura 10 A–C).

Para ambos os isolados, o uso de emulsificação em todas as concentrações resultou em inibição significativa da formação de biofilme ($p < 0,05$). Uma inibição de biofilme de 77% para *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 10A), 85% para *E. coli* ATCC 25922 (Figura 10B) e 74% para *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 10C) foi obtida usando a concentração de 25 mg/mL ($p < 0,001$). A atividade antibiofilme da emulsão (25 mg/mL - 1,56 mg/mL) diminuiu gradualmente em baixas concentrações (3,12 mg/mL e 1,56 mg/mL), resultando em um efeito inibitório de 49% e 34% para *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 10A); 20% e 7% para *E. coli* ATCC 25922 (Figura 10B); e 31% e 15% para *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 10C), respectivamente. Com base nestes resultados, a emulsão produziu um efeito antibiofilme significativo contra ambos os patógenos.

Figura 10- Atividade inibitória da emulsão OMBE4CK na formação de biofilme por micro-organismos em superfície de poliestireno.



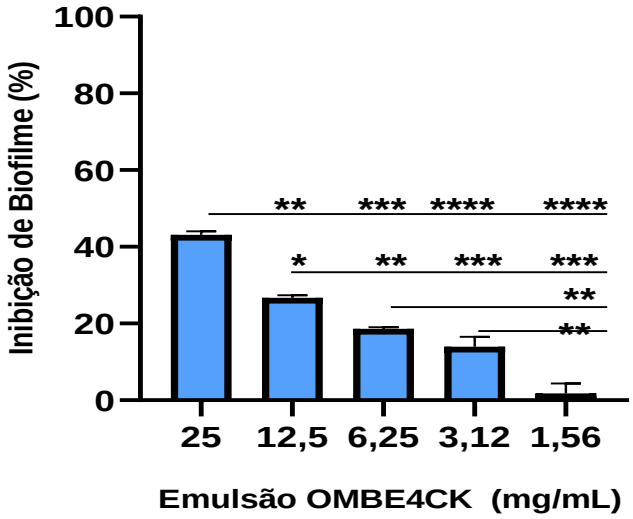
(A) *S. aureus* ATCC 25923, (B) *E. coli* ATCC 25922, (C) *P. aeruginosa* ATCC 27853. OMBE4CK- Bioemulsificante e óleo essencial Melaleuca. Os valores são a média ± DP de três experimentos independentes. * ($p < 0,05$), **($P< 0,001$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) - diferença significativa em relação as concentrações.

4.7.2 Inibição da formação de Biofilme em cateter de poliuretano

4.7.2.1 Análise quantitativa

O potencial antibiofilme da emulsão foi determinado por sua capacidade de inibir a formação de biofilme por *S. aureus* ATCC 25923 em cateter enteral, que corresponde a um dispositivo médico de poliuretano (Figura 11). Na concentração de 25 mg/mL, a emulsão mostrou um potencial inibitório significativo (p <0,001) de 43% para *S. aureus* ATCC 25923. Enquanto em concentrações mais baixas (12,5 mg/mL - 3,12 mg/mL), a atividade antibiofilme da emulsão diminuiu gradualmente, resultando em um efeito inibitório variando significativamente (p < 0,05) entre 14% e 27%. Enquanto na menor concentração (12,5%) da emulsão, não houve um efeito inibitório significativo, apenas 2% do biofilme formado em cateter por *S. aureus* ATCC 25923 foi inibido (Figura 11).

Figura 11- Atividade inibitória da emulsão (OMBE4CK) na formação de biofilme em superfície de cateter por *S. aureus* ATCC 25923.



* (p < 0,05), *** (p < 0,001), **** (p < 0,001) - diferença significativa em relação as concentrações.

4.7.2.2 Análise semiquantitativa

Através do método semiquantitativo de rolamento de cateteres em placa de Petri contendo TSA, fragmentos de cateter expostos à concentração máxima de 25 mg/mL da

emulsão OMBE4CK obtiveram um percentual de 4% de contaminação (com crescimento <15UFC/placa) por *S. aureus* ATCC 25923, enquanto nas concentrações menores (12,5 mg/mL -1,56 mg/mL) houve uma variação de 23% a 94% da colonização (com crescimento ≥15 UFC/placa) de *S. aureus* ATCC 25923 a superfícies de poliuretano de cateter (Tabela 7). Assim, verifica-se que a inibição de biofilme depende da concentração da emulsão.

Tabela 7- Quantitativo de UFC/mL de *S. aureus* ATCC 25923 em superfície de cateter.

Emulsão	**UFC/placa**		**Classificação**
(mg/mL)	**Nº**	**%**	
25 mg/mL	14	4%	Contaminação
12,5 mg/mL	71	23%	Colonização
6,25 mg/mL	83	26%	Colonização
3,12 mg/mL	213	68%	Colonização
1,56 mg/mL	295	94%	Colonização
Controle	314	100%	Colonização

UFC/mL: Unidade Formadora de Colônias por militro.

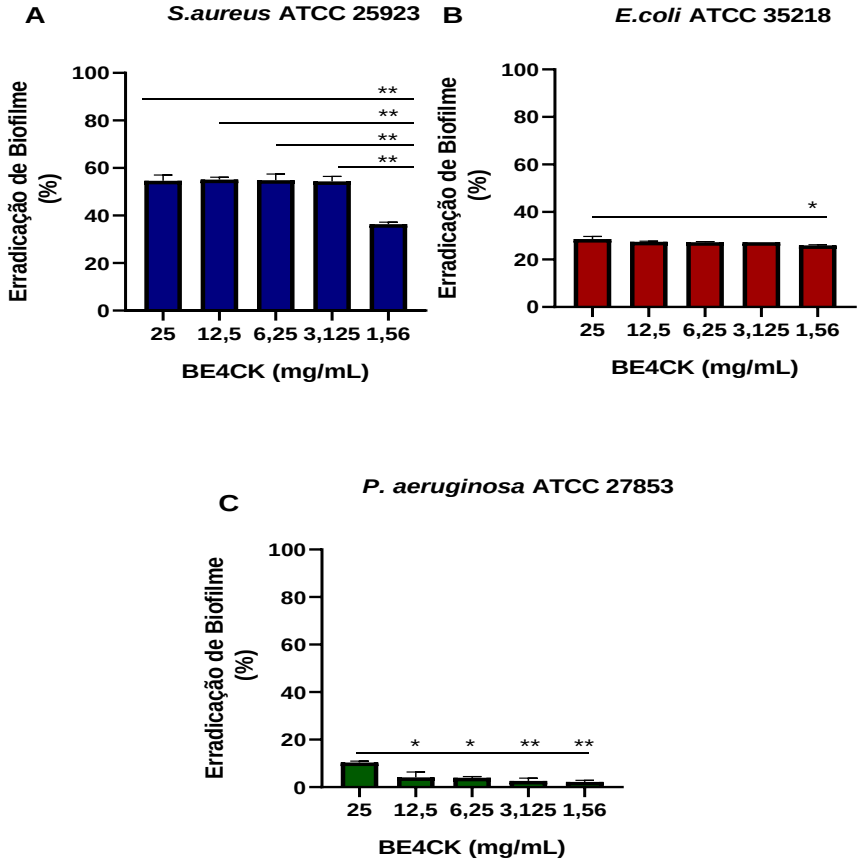
4.7.3 Erradicação de Biofilme

Biofilmes formados por *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 em 48 horas e tratados com bioelmusificante BE4CK foram rompidos efetivamente na concentração mais alta (25 mg/mL). Nesta concentração, a dispersão dos biofilmes formados por esses micro-organismos variou de 55% a 10%, enquanto na concentração mais baixa (1,56 mg/mL) variou de 36% a 2% (Figura 12A, B e C).

O biofilme formado por *S. aureus* ATCC 25923 foi suscetível à ação do BE4CK em todas as concentrações utilizadas (Figura 12A). Nas concentrações de 25 mg/mL a 3,12 mg/mL, o composto promoveu taxas de erradicação variando de 54% a 55%. Enquanto na concentração mais baixa (1,56 mg/mL), removeu 36% do biofilme pré-formado. O aumento na concentração de BE4CK não promoveu diferenças significativas na remoção do biofilme de *S. aureus* ATCC 25923. Assim, a erradicação do biofilme não dependeu da concentração do BE4CK.

A ação do BE4CK no biofilme de *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresentou resultados pouco eficazes comparado a *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 12B, C). Os biofilmes pré-formados foram significativamente ($p < 0,05$) erradicados nas concentrações de 25 mg/mL a 1,56 mg/mL de BE4CK, com redução de biofilme variando de 29 a 26% de *E. coli* ATCC 25922 (Figura 12B) e 10 a 2% para *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 12C).

Figura 7- Erradicação de biofilme por Bioemulsificante BE4CK frente micro-organismos.

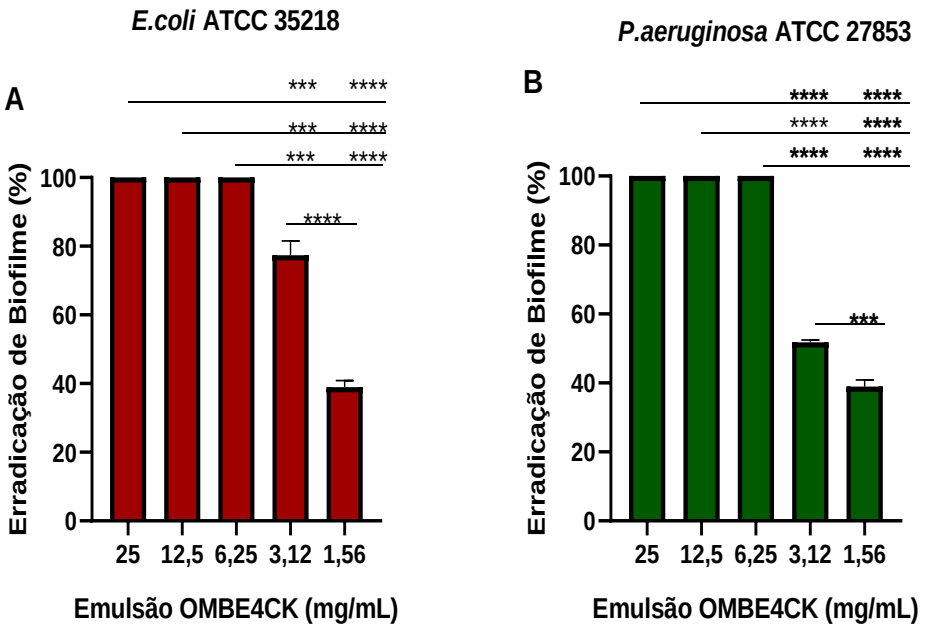


(A) *S. aureus* ATCC 25923, (B) *E. coli* ATCC 25922, (C) *P. aeruginosa* ATCC 27853.OMBE4CK- Bioemulsificante e óleo essencial Melaleuca. Os valores são a média ± DP de três experimentos independentes. * ($p < 0,05$), **($P< 0,001$) - diferença significativa em relação as concentrações.

A emulsão OMBE4CK promoveu dispersão significativa ($p < 0,0001$) do biofilme em todos os micro-organismos testados (Figura 13A-C). Os biofilmes formados por *S. aureus* ATCC 25923 foram totalmente (100%) erradicados em todas as concentrações (1,56 mg/mL a 25 mg/mL) da emulsão (dados não mostrados). O biofilme pré-formado por *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* 27853 foi removido inteiramente ($p < 0,0001$) apenas nas concentrações

de 25 mg/mL – 6,25 mg/mL, enquanto nas concentrações de 3,12 mg/mL e 1,56 mg/mL, a remoção do biofilme variou de 77% a 39% para *E. coli* ATCC 25922 (Figura 13A) e 52% a 39% para *P. aeruginosa* 27853 (Figura 13B).

Figura 13- Erradicação de biofilme por emulsão OMBE4CK frente a micro-organismos.



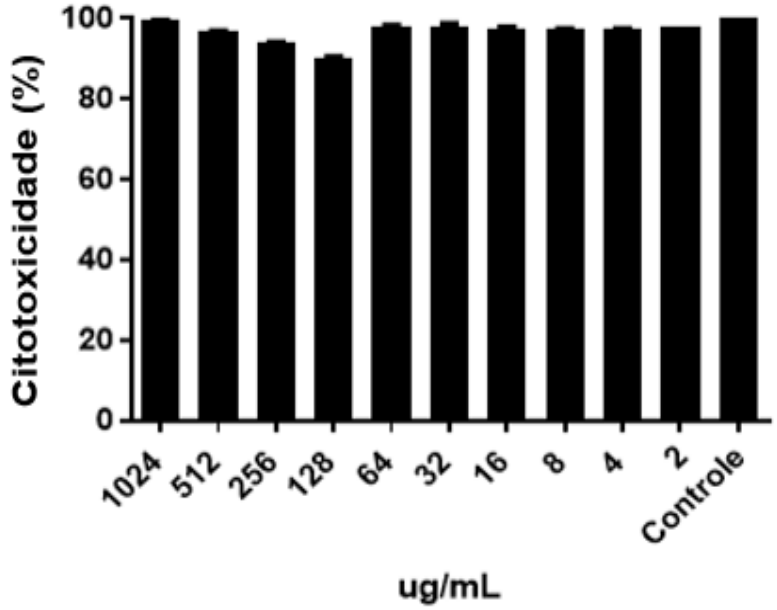
(A) *E. coli* ATCC 25922, (B) *P. aeruginosa* ATCC 27853.Os valores são a média ± DP de três experimentos independentes. *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) - diferença significativa em relação as concentrações.

4.8 Avaliação da citotoxicidade do bioemulsificante

4.8.1 Utilização de células renais de macaco verde africano (VERO, ATCC)

Pelo teste de toxicidade, BE4CK não apresentou toxicidade em células VERO nas concentrações de 1024 µg/mL–2 µg/mL, e o percentual de viabilidade celular foi ≥ 88,89% (Figura 14).

Figura 14- Avaliação da citotoxicidade do bioemulsificante BE4CK (1024 µg/mL – 2 µg/mL) em células VERO.



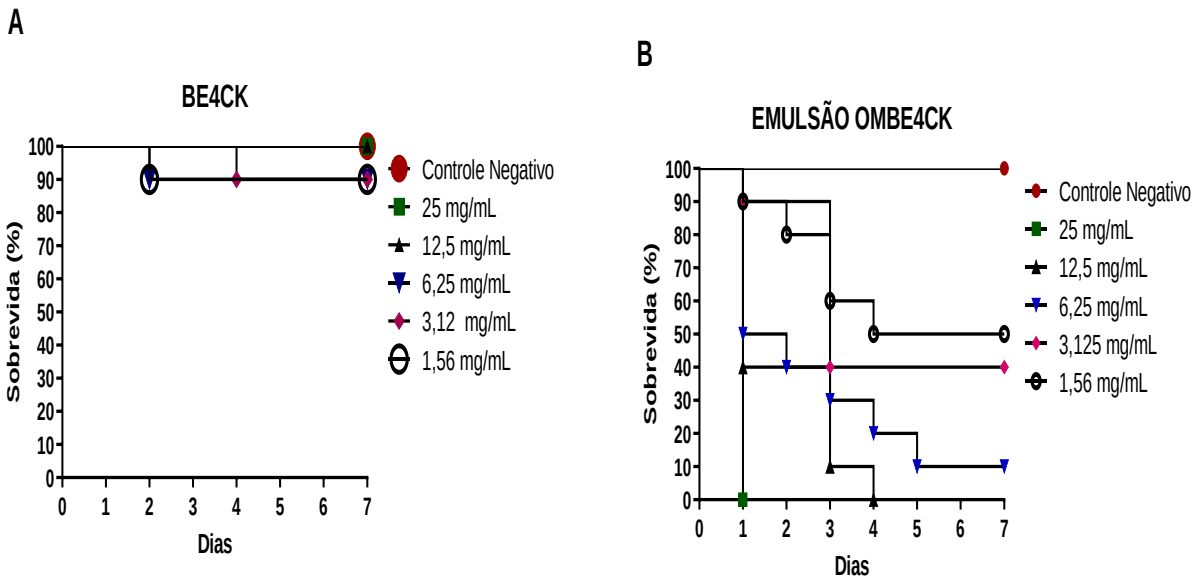
Os valores são a média ± Desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. ($p < 0,05$) – diferença significativa em relação às concentrações.

4.8.2 Utilização de larvas de *Tenebrio molitor*

As taxas de sobrevivência de *T. molitor* foram avaliadas durante 7 dias após a exposição da larva ao BE4CK e OMBE4CK (Figura 15A, B). As taxas de sobrevivência de larvas de *T. molitor* não diferiram significativamente para todas as concentrações de BE4CK (Figura 17A). Nas concentrações de 25 mg/mL e 12,5 mg/mL não houve variação no percentual de sobrevivência, no entanto, nas concentrações de 6,25 mg/mL a 1,56 mg/mL a taxa de sobrevivência foi reduzida de 100% (controle) para 90%. Dessa forma, verificou-se que as diferentes concentrações do BE4CK não apresentaram efeitos tóxicos sobre larvas de *T. molitor* durante os sete dias, após aplicação.

Em contraste, a emulsão OMBE4CK foi significativamente tóxica para larvas de *T. molitor* (Figura 15B), levando uma mortalidade de 100% nas concentrações de 25 mg/mL e 12,5 mg/mL. Enquanto a taxa de sobrevivência nas concentrações de 6,25 mg/mL; 3,125 mg/mL e 1,56 mg/ml, respectivamente, foi de 10%; 40% e 50%; sete dias após a exposição.

Figura 15- Avaliação da citotoxicidade do bioemulsificante BE4CK e emulsão OMBE4CK em *Tenebrio molitor*.



(A) bioemulsificante BE4CK, (B) emulsão OMBE4CK.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi realizado o isolamento de leveduras da espécie *Candida krusei* e *Candida metapsilosis* (n=13) a partir de frutos. As leveduras estão amplamente presentes no ambiente, e muitas delas colonizam solos, alimentos, superfícies de folhas e flores (Gallone *et al*., 2018). Dentre as leveduras, o isolado mais eficiente na produção de compostos ativos de superfície com atividade emulsificante frente a diversos substratos foi *Candida krusei* M4CK.

Candida krusei é uma levedura ascomicética dimórfica, que habita a membrana mucosa de indivíduos saudáveis e são amplamente distribuídos na natureza. Além disso, são frequentemente identificadas na fermentação do cacau em diversos locais (Chagas Junior *et al*., 2021). Apesar de ser a mesma levedura, publicações relacionadas a aplicações industriais geralmente usam os nomes de espécies *P. kudriavzevii*, *E. orientalis* ou *C. glycerinogenes* em preferência a *C. krusei*, em virtude das conotações negativas de segurança do uso de um patógeno em um contexto biotecnológico ou alimentar (Douglas *et al*., 2018).

Neste estudo, o micro-organismo *Candida krusei* M4CK foi isolado do fruto *Byrsonima crassifólia*, popularmente conhecido como murici, fruto originário das Américas Central e do Sul, e tem sido utilizado para produção de alimentos e medicina popular (Pires *et al*., 2021). O isolamento de leveduras com potencial para produzir compostos ativos de superfícies indica que os produtores de CAS estão amplamente distribuídos nas superfícies, encontrados internamente na polpa de diversos frutos e plantas, e têm potencial para uso em sistemas emulsificantes e diferentes processos biotecnológicos (Konish *et al*., 2014; Silva *et al*., 2022).

Para a produção desses compostos, a levedura *Candida krusei* M4CK apresentou melhor crescimento e desempenho na produção de CASs com glicerol como fonte de carbono e energia, como o tipo de fonte de carbono também desempenha um papel crítico na produção de CAS por micro-organismos (Bhaumik *et al*., 2020), verificou-se que a absorção de glicerol pode ajudar a otimizar os processos de produção de biossurfactantes glicolipídios, como a produção de SL por leveduras *S. bombicola* (Claus *et al*., 2021).

Assim como o presente estudo, o glicerol foi relatado como uma das melhores fontes de carbono para a produção de glicolipídeos por *Pseudomonas* sp. *(*Phulpoto *et al*., 2020) e substrato adequado para maior produção e máxima atividade emulsificante de bioemulsificante produzidos por *Bacillus* sp. (Rulli *et al*., 2019). Estes dados indicam que fontes de carbono podem alterar a estrutura dos biosurfactantes e bioemulsificantes produzidos e, consequentemente, suas propriedades emulsificantes (Sarubbo *et al*., 2006).

Tal propriedade foi demonstrada para o bioemulsificante (BE4CK) de *C. krusei* M4CK, o qual apresentou atividade emulsificante igual ou superior a 50% em óleo de oliva, girassol e pós-fritura, e hidrocarbonetos como querosene, hexano e hexadecano. As melhores atividades emulsificantes do CAS foram demonstradas na presença de hidrocarbonetos como querosene, hexano e hexadecano, nos quais um $E_{24} \geq 63,6\%$ foi alcançado. Segundo Willumsen e Karlson (1997), valores de E_{24} iguais ou superiores a 50% são considerados significativos, e para Bosch e colaboradores (1998), uma emulsão com esse valor é considerada estável.

Essa biomolécula BE4CK pode ser classificada como um biopolímero anfifílico que contém monossacarídeos (manose e glicose) e grupos alifáticos de cadeia longa, como ácido 9-octadecenóico e ácido hexadecanóico, em sua estrutura polimérica e é eficaz na emulsificação de querosene. A emulsificação para BE4CK pode ser alcançada através da interação de hidrofóbicos (ácidos graxos) com hidrocarbonetos e da interação de hidrofílicos (monossacarídeos) com moléculas de água. Além disso, por se tratar de um polímero, há maior probabilidade de interação devido ao fenômeno esteárico, que pode levar a uma camada de emulsificação mais significativa dos hidrocarbonetos derivados do petróleo do que dos óleos vegetais. Acredita-se que haja um equilíbrio mais marcante de forças que estabilizam as emulsões de querosene, proporcionando uma camada emulsionada mais elevada (Rehman *et al.*, 2021).

Semelhante aos resultados apresentados, soforolipídeos sintetizados por leveduras do gênero *Meyerozyma* sp. foram capazes de emulsionar hidrocarbonetos (querosene, hexano e hexadecano) e azeite e petróleo bruto, a atividade emulsificante para esses compostos foi mais significativa que 60% (Rehman *et al*., 2021). Emulsões com atividades superiores a $\geq 60\%$ também foram registradas para CAS de levedura da espécie *Yarrowia lipolytica* frente a vários substratos hidrofóbicos, incluindo hexadecano, hexano, benzeno, querosene e óleo diesel (Yalçin *et al*., 2018). Biossurfactantes das linhagens de leveduras *Candida albicans* e *Candida glabrata* mostraram atividade emulsificante variada em diferentes tipos de óleos vegetais. Essas biomoléculas apresentaram atividade E_{24} de 49% para azeite de oliva e 51% para soja (Gaur *et al*., 2019), assemelhando-se aos achados deste estudo, pelo qual foram obtidos valores aproximados de E_{24} frente aos óleos vegetais como óleo de oliva, girassol e fritura.

Além da propriedade emulsificante, o valor de redução de tensão superficial semelhante ao obtido no ensaio com BE4CK, foi observado para *Candida tropicalis* cultivada em n-hexadecano, que produziu um emulsificante extracelular capaz de reduzir a tensão superficial de água de 70 mN/m a 49,5 mN/m. O mesmo composto emulsificou vários hidrocarbonetos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos (Singh e Desai, 1989). Outras leveduras produtoras de

CAS foram identificadas como *Yarrowia lipolytica*, *Trichosporon mycotoxinivorans* e *Meyerozyma caribbica* que, apesar de produzirem potentes bioemulsificantes com altos valores de emulsificação em hidrocarbonetos, não reduziram a tensão superficial de água quando testadas (Souza e Col, 2012; Domingues *et al*., 2017; Bhaumik *et al*., 2020).

E_{24} segue crescimento exponencial para *C. krusei* M4CK desde a fase de crescimento até 144 h, obtendo maior atividade emulsificante entre 60 h e 100 h na fase estacionária. Estes dados mostraram uma correlação linear entre a possível concentração celular e a atividade emulsificante. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que o emulsificante está sendo produzido para melhorar a assimilação da fonte de carbono. Na produção associada ao crescimento, existem relações paralelas entre o crescimento, a utilização de substratos e a produção de compostos tensoativos ou tensoativos (Bhaumik *et al*., 2022; Liepins *et al*., 2021; Desai e Bannat, 1997). A Cinética de produção de bioemulsificantes está associada ao crescimento celular, também foi relatada para as espécies de leveduras *Geotrichum* sp. (Monteiro *et al*., 2010).

A eficácia do bioemulsificante depende da atividade emulsificante em uma ampla faixa de temperatura, pH e salinidade (Souza *et al*., 2016). O bioemulsificante BE4CK manteve emulsões estáveis em uma ampla faixa de temperatura (120 °C) para fontes de óleo de oliva e girassol ($E_{24} \geq 50\%$) e para os hidrocarbonetos ($E_{24} \geq 63\%$) como querosene, hexano e hexadecano. No entanto, para o óleo de fritura (E_{24} de 40%), houve uma redução de 10% da atividade emulsificante. Tais resultados demonstram que o BE4CK é termoestável.

A estabilidade do bioemulsificante produzido por *C. lipolytica* em altas temperaturas também foi relatada em temperaturas de até 100 °C (Souza *et al*., 2016). Da mesma forma, os biossurfactantes soforolipídeos produzidos por *Candida keroseneae* apresentaram alta estabilidade térmica com atividade emulsionante máxima de 60% no querosene e preservaram 97,25% de sua atividade original a 120 °C (Zahra *et al*., 2020). A redução da atividade emulsificante pode estar relacionada à desnaturação do componente proteico do bioemulsificante durante o tratamento térmico. Esta propriedade depende da estrutura química da molécula, pois muitos emulsificantes são estáveis em variações significativas de temperatura ou apresentam pequenos desvios em temperaturas mais elevadas (Bhaumik *et al*., 2020).

A estabilidade da emulsificação por BE4CK foi mantida para fontes de óleo de girassol e óleo de oliva apenas em pH ácido (3–6). Ao mesmo tempo, BE4CK manteve a estabilidade do emulsificante no querosene em todas as faixas de pH (3–9). A inibição da atividade do óleo e a acentuada redução do querosene foram registradas em valores de pH acima de 6,0. A diminuição da atividade emulsificante está provavelmente relacionada a mudanças estruturais

nos bioemulsificantes causadas por condições extremas de pH (Monteiro *et al*., 2012; Daverey *et al*., 2009).

Além de manter a atividade emulsificante em altas temperaturas e faixas de pH, o bioemulsificante BE4CK manteve o E_{24} em diferentes concentrações de $MgCl_2$, NaCl e $CaCl_2$. Devido à sua natureza, o biopolímero anfifílico BE4CK parece ser mais estável e menos suscetível à ação de íons para atividade coalescente. Resultados semelhantes ao presente estudo foram demonstrados para o bioemulsificante produzido por *Pseudomonas stutzeri NJtech* 11-1. O bioemulsificante bruto pode tolerar 50% de NaCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ com apenas 29,8% de perda de E_{24}. Leveduras de *Meyerozyma caribbica* também produziram bioemulsificantes estáveis em altos níveis de salinidade (Fan *et al*., 2001). Em contraste, um bioemulsificante produzido por *Candida lipolytica* usando óleo de motor queimado como substrato hidrofóbico mostrou que sua estabilidade emulsificante na concentração de 10% de NaCl foi inativa (Souza *et al*., 2016).

Ao avaliar a atividade antimicrobiana através do ensaio de difusão, verificou-se que os isolados de *E. coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923 não apresentaram sensibilidade ao bioemulsificante BE4CK. No entanto, quando combinado com o OE de Melaleuca (OMBE4CK), exibiram atividade antimicrobiana para isolados de *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 35218 e *S. aureus* ATCC 25923. A OMBE4CK aumentou a atividade antimicrobiana frente *E. coli* ATCC 25922 e não causou sensibilidade em *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Esses dados indicam que o óleo essencial de Melaleuca pode ser um candidato para a produção de formulações com compostos tensoativos sintetizados por micro-organismos. O óleo essencial de Melaleuca alternifolia é extraído da *Tea Tree* (planta nativa da Austrália) por destilação a vapor das folhas e ramos terminais, possui atividade bactericida e fungicida, incluindo capacidade inseticida. Em sua composição, monoterpenos cíclicos voláteis, que são constituídos por terpinen-4-ol, eucaliptol e α-terpineol (monoterpenos oxigenados) combinados com α-terpineno, γ-terpineno e α-pineno (monoterpenos de hidrocarbonetos). Em virtude da presença desses compostos voláteis, esse OE tem atividade antimicrobiana que leva à inibição dos processos de respiração celular, ruptura da membrana microbiana e vazamento de íons potássio das membranas celulares em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Ferreira *et al*., 2023).

Desempenho antimicrobiano semelhante ao bioemulsificante BE4CK foi demonstrado para soforolipídeos produzidos por leveduras não patogênicas de *Candida bombicola* ATCC 22214, este biossurfactante não conseguiu inibir o crescimento de *E. coli* isoladamente (Joshi-

Navare *et al*., 2013). Mas, em combinação com antibióticos, promoveu uma inibição total do desenvolvimento do micro-organismo. Essa capacidade não está relacionada apenas ao efeito inibitório aumentado pela ação aditiva de dois agentes antimicrobianos; também pode estar associada ao desempenho do SL para facilitar a entrada de moléculas em células bacterianas (Joshi-Navare *et al*., 2013). Assim, o efeito antimicrobiano dos CAS se deve ao seu potencial de formar poros dentro das membranas celulares, essa característica pode aumentar a eficácia dos agentes antimicrobianos (Gudiña *et al*., 2010).

A resistência antimicrobiana aos antibióticos está relacionada à capacidade dos micro-organismos formarem biofilmes, que dentro dessa estrutura exibem dezenas de atributos, tornando-os de difícil eliminação (Rather *et al*., 20021). Diante deste fato e da capacidade antimicrobiana da emulsão (BE4CK e OE Melaleuca), investigou-se a ação do bioemulsificante e da emulsão na inibição e erradicação de biofilmes formados por *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureu*s ATCC 25923.

O composto apresentou um efeito dependente da concentração, com melhor atividade inibitória da formação de biofilme obtida em concentrações de 25 mg/mL contra patógenos bacterianos. Maior atividade de BE4CK foi encontrada em *S. aureus* ATCC 25923, enquanto menor atividade foi demonstrada para *P. aeruginosa* ATCC 27853. O perfil de atividade da BE4CK pode estar relacionado às características da parede celular de ambas as bactérias.

A atividade antibiofilme da emulsão diminuiu gradualmente em concentrações mais baixas. O óleo essencial de Melaleuca já demonstrou atividade antibiofilme contra *S. aureus* e *E. coli* (Budzyńska *et al*., 2011). Por outro lado, há evidências prévias do sinergismo entre CAS e óleos essenciais; este fato reforça a hipótese da capacidade dos CAS em facilitar a entrada de moléculas antimicrobianas nas células (Mukherji *et al*., 2014). Além disso, emulsões de óleo essencial de Melaleuca mostram-se uma excelente estratégia de controle microbiano, uma vez que sua melhor capacidade de infiltração tecidual e capacidade de estabilizar a volatilização de terpenos, seus principais compostos antimicrobianos, são consideradas. Neste estudo, emulsões de OE de Melaleuca (OMBE4CK) foram estáveis até 250 (E_{250}) dias de avaliação (dados não mostrados), o que potencializa seu uso em formulações.

A formação de biofilme em dispositivos médicos é uma das principais causas de infecções nosocomiais e representa um grave problema de saúde pública. Como possível alternativa para solucionar esse problema, também foi avaliado o potencial da emulsão em inibir a formação de biofilme em cateteres de poliuretano em diferentes concentrações. Na concentração mais alta (25 mg/mL), OMBE4CK mostrou uma percentagem significativa de potencial inibitório de 43% para *S. aureus* ATCC 25923. Outros autores também relataram esta

capacidade de interferir na formação de biofilme. Mendes e Cols (2021) mostraram que uma mistura de soforolipídeos produzidos por *Starmerella bombicola* CBS 6009 com o decil sulfato de sódio (SDS, surfactante comercial) demonstrou atividade inibitória da formação de biofilme por *S. aureus* e *E. coli*. Outro estudo proposto por Pontes et al. (2016) determinaram que a presença de soforolipídeos na superfície do cateter (silicone) diminuiu a hidrofobicidade do material e a formação de biofilme por *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922.

A emulsão OMBE4CK apresentou melhor atividade na remoção de biofilmes em comparação à ação isolada de BE4CK. A erradicação do biofilme pode estar relacionada aos efeitos bacteriostáticos e bactericidas da emulsão OMBE4CK.

Biofilmes são comunidades microbianas difíceis de eliminar. O potencial do bioemulsificante BE4CK e da OMBE4CK em emulsão na erradicação de biofilmes foi avaliado visando buscar estratégias para dispersar esta estrutura. O tratamento com o bioemulsificante isolado sobre o biofilme de *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 não apresentou resultados efetivos em todas as concentrações. Em contraste, biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923 foram significativamente erradicados.

A baixa dispersão do biofilme de *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 pode ser atribuída à dificuldade dos CAS em penetrar na matriz do biofilme. Nesse sentido, maiores concentrações de CAS são necessárias para o desprendimento do biofilme pré-formado. Uma substância tensoativa deve penetrar no biofilme e a interface do substrato deve separar-se do biofilme (Abdollahi *et al*., 2020). Após sua penetração, podem alterar as propriedades superficiais, levando à separação dos biofilmes das superfícies (Abdollahi *et al*., 2020).

Na completa erradicação do biofilme de *S. aureus*, provavelmente está relacionada à capacidade do bioemulsificante BE4CK de aumentar a ação do óleo essencial de Melaleuca, facilitando sua entrada pela matriz do biofilme. A matriz de biofilme apresenta uma dinâmica a ser considerada na aplicação de um determinado composto antibiótico. Nesse caso, a ação de disposição das células pode ser melhorada com o uso de CAS que alteram as características superficiais, como hidrofobicidade ou hidrofilicidade, além das características de carga elétrica (repulsão e atração) (Silva *et al*., 2017). Sistemas emulsionados (contendo óleos essenciais) podem ser interessantes no controle de biofilmes microbianos. O presente estudo observou que a emulsão em concentrações mais elevadas foi mais efetiva que o bioemulsificante BE4CK na erradicação do biofilme de *P. aeruginosa*.

Pelo teste de toxicidade, o bioemulsificante BE4CK não apresentou toxicidade nas concentrações. As células permaneceram viáveis e não sofreram morte celular. A viabilidade

celular foi ≥ 88,89%. Da mesma forma, verificou-se que as diferentes concentrações do BE4CK não apresentaram efeitos tóxicos sobre larvas de *T. molitor.* Este resultado pode estar relacionado à capacidade de moduladores da resposta imune, uma vez que a ativação imunológica por biossurfactante mostrou que a fengicina, a iturina A e o ramnolipídeo aumentaram significativamente a capacidade de sobrevivência de larvas de *T. molitor* contra *E. coli* (Edosa *et al*., 2020).

Diferentemente, a emulsão OMBE4CK em altas concentrações foi significativamente tóxica para larvas de *T. molitor*. A toxicidade da emulsão pode ser relacionada à presença do OE Melaleuca, que em doses mais elevadas apresenta efeito tóxico (Bertocchi *et al*., 2020). Testes de toxicidade com CAS de biossurfactantes produzidos a partir de espécies do gênero *Candida* também indicaram a ausência de toxicidade dessas biomoléculas contra bioindicadores marinhos (Rufino *et al*., 2014; Freitas, 2016; Luna, 2016).

6 CONCLUSÕES

Este estudo apresentou pela primeira vez um bioemulsificante derivado de *Candida krusei* isolada de fruto. A levedura apresentou excelente capacidade de utilização de glicerol como substrato para crescimento e produção de bioemulsificante. Esta biomolécula demonstrou propriedades promissoras em termos de emulsificar diferentes fontes de óleo vegetal e hidrocarbonetos, ausência de toxicidade, estabilidade de emulsões em ampla faixa de temperatura, pH e salinidade. Além disso, o bioemulsificante BE4CK e a sua combinação com óleo essencial de Melaleuca inibiram e erradicaram a formação de biofilme por patógenos humanos em superfície de poliestireno. Tais propriedades enfatizam que o bioemulsificante pode representar uma nova fonte de agentes antibiofilme e pode ser uma estratégia de medidas preventivas de infecção e terapia antimicrobiana, para reduzir a colonização de dispositivos médicos e mitigar infecções. Nesse contexto, esperamos que este estudo contribua para fornecer informações para o desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação, no melhoramento das linhagens e dos processos de produção, e devido à sua versatilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, os bioemulsificantes poderão se tornar compostos de uso comum nas indústrias em um futuro próximo.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Acredita-se que esta seja a primeira vez que a espécie *Candida krusei* é citada na literatura como levedura isolada de frutos com potencial para produção de compostos ativos de superfície. Por esta razão, torna-se necessário a investigações futuras para continuação dos estudos, sugerindo-se, particularmente:

- Otimizar a produção do bioemulsificante;
- Estudar a utilização de novos substratos que possibilitem o desenvolvimento do processo;
- Otimizar o processo de extração e de purificação do bioemulsificante;
- Proporcionar melhor condição para *Candida krusei* M4CK produzir a biomolécula de biossurfactante;
- Realizar a identificação do bioemulsificante produzido através da técnica de Infravermelho por Transformação de Fourier (FTIR);
- Ampliar os estudos da combinação do BECK4 com outros óleos essenciais para produção de compostos com atividades biológicas;
- Avaliar outras possibilidades de aplicação do bioemulsificante produzido.

REFERÊNCIAS

ABDELLI, F.; JARDAK, M.; ELLOUMI, J.; STIEN, D.; CHERIF, S.; MNIF, S.; AIFA S. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. **Biodegradation**, v. 30, n. 4, p:287-300, 2019.

ABDOLLAHI, S.; TOFIGHI, Z.; BABAEE, T.; SHAMSI, M.; RAHIMZADEH, G.; REZVANIFAR, H.; SAEIDI, E.; MOHAJERI AMIRI, M.; SAFFARI ASHTIANI, Y.; SAMADI, N. Evaluation of Anti-oxidant and Anti-biofilm Activities of Biogenic Surfactants Derived from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Iran J Pharm Res**, v.19, n.2, p:115-126, 2020.

ABDULKHALEQ, LA; ASSI, MA.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, YH.; HEZMEE, MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Vet World**, v.11, n.5, p:627-635, 2018.

ADETUNJI, AI.; OLANIRAN, AO. Production and characterization of bioemulsifiers from *Acinetobacter* strains isolated from lipid-rich wastewater. **3 Biotech**, v.9, n.4, p:151, 2019.

ADETUNJI, A.I.; OLANIRAN A.O. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. **Saudi J Biol Sci**, v 28, n.1, p: 669-679, 2021.

ADNAN, M.; SIDDIQUI, A.J.; HAMADOU, W.S.; ASHRAF, S.A.; HASSAN, M.I.; SNOUSSI, M.; BADRAOUI, R.; JAMAL, A.; BARDAKCI, F.; AWADELKAREEM, A.M.; SACHIDANANDAN, M.; PATEL, M. Functional and Structural Characterization of *Pediococcus pentosaceus*-Derived Biosurfactant and Its Biomedical Potential against Bacterial Adhesion, Quorum Sensing, and Biofilm Formation. **Antibiotics (Basel)**, v.10, n11, p:1371, 2021.

AFSHARIPOUR, S.; ASADI, A.; OHADI, M.; RANJBAR, M.; FOROOTANFAR, H.; JAFARI, E.; & DEHGHANNOUDEH, G. Preparation and Characterization of Nano-Lipopeptide Biosurfactant Hydrogel and Evaluation of Wound-Healing Properties. **BioNanoScience**, v. 11, n.4, p: 1061-1069, 2021.

AHMADI-ASHTIANI, H. R.; BALDISSEROTTO, A.; CESA, E. et al. Microbial biosurfactants as key multifunctional ingredients for sustainable cosmetics. **Cosmetics**, v.7, n.2, p: 46, 2020.

AGUIRRE-RAMÍREZ, M. et al. “Surfactants: physicochemical interactions with biological macromolecules.” **Biotechnology letters**, v. 43, n.3 202, p: 523-535, 2021.

ALMEIDA, D.G.; SILVA R.C.F.S.; LUNA J.M; RUFINO R.D; SANTOS V.A; BANAT I.M; SARUBBO L.A. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Front Microbiol**, v.7, p:1–14, 2016.

ALIZADEH-SANI, M.; HAMISHEHKAR, H.; KHEZERLOU, A.; AZIZI-LALABADI, M.; AZADI, Y.; NATTAGH-ESHTIVANI, E.; FASIHI, M.; GHAVAMI, A.; AYNEHCHI, A.;

EHSANI, A. Bioemulsifiers Derived from Microorganisms: Applications in the Drug and Food Industry. **Adv Pharm Bull**, v.8, n.2, p:191-199, 2018.

AMARAL, P.F.F.; DA SILVA, J.M.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A.M.V.; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Proc. Biochem**,v. 41, p:1894–1898, 2006.

ANESTOPOULOS, I.; KIOUSI, D.E.; KLAVARIS, A.; et al. Surface Active Agents and Their Health-Promoting Properties: Molecules of Multifunctional Significance. **Pharmaceutics**, v.12, n.7, p:688, 2020.

ANESTOPOULOS, I.; KIOUSI, D.E.; KLAVARIS, A.; et al. Marine-Derived Surface-Active Agents: Health-Promoting Properties and Blue Biotechnology-Based Applications. **Biomoléculas**, v. 10, n.6, p:885, 2020.

ALLEGRONE, G.; CERESA, C.; RINALDI, M.; FRACCHIA, L. Diverse Effects of Natural and Synthetic Surfactants on the Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilm. **Pharmaceutics**, v.13, n.8, p:1172, 2021.

ARAÚJO, H.W.C.; ANDRADE, R.F.S.; MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; RUBIO-RIBEAUX, D.; ALVES DA SILVA, C.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Sustainable biosurfactant produced by Serratia marcescens UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microb Cell Fact**,v. 18, n.1, p:2, 2019.

Araujo J, Monteiro J, Silva D, Alencar A, Silva K, Coelho L, Pacheco W, Silva D, Silva M, Silva L, Monteiro A. Surface-Active Compounds Produced by Microorganisms: Promising Molecules for the Development of Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Healing Agents. **Antibiotics (Basel)**, v.11, n.8, p:1106, 2022.

ASLANI, N.; JANBABAEI, G.; ABASTABAR, M.; MEIS, J.F.; BABAEIAN, M.; KHODAVAISY, S.; BOEKHOUT, T.; BADALI, H. Identification of Uncommon Oral Yeasts from Cancer Patients by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **BMC Infect. Dis**, v., 18, n. 24, 2018.

ATAKPA, E.O.; ZHOU, H.; JIANG, L.; MA, Y.; LIANG, Y.; LI, Y.; ZHANG, D.; ZHANG, C. Improved Degradation of Petroleum Hydro-carbons by Co-Culture of Fungi and Biosurfactant-Producing Bacteria. **Chemosphere**, v. 290, p: 133337, 2020.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.87, n.2, p:427-44, 2010.

BANU, A.; NOORUL HASSAN, M.M.; RAJKUMAR, J.; SRINIVASA, S. Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: a prospective study. **Australas. Med. J**, v.8, p: 280-285, 2015.

BAO, M.; PI, Y.; WANG, L.; SUN, P.; LI, Y.; CAO, L. Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter sp*. D3-2 and its biodegradation of crude oil. Environ **Sci Process Impacts**, v. 16, n.4, p:897-903, 2014.

BEZZA, F.A.; CHIRWA, E.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. **Chemosphere**, v.144, p:635-44, 2016.

BHAUMIK, M.; DHANARAJAN, G.; CHOPRA, J.; KUMAR, R.; HAZRA, C.; SEN, R. Production, partial purification and characterization of a proteoglycan bioemulsifier from an oleaginous yeast. **Bioprocess Biosyst Eng**, v.43, n.10, p:1747-1759, 2020.

BONNICHSEN, L.; BYGVRAA SVENNINGSEN, N.; RYBTKE, M.; et al. Lipopeptide biosurfactant viscosin enhances dispersal of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 biofilms. **Microbiology (Reading)**, v.161, n.12, p:2289-2297, 2015.

BORSANYIOVA, M.; PATIL, A.; MUKHERJI, R.; PRABHUNE, A.; BOPEGAMAGE, S. Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents. **Folia Microbiol (Praha)**, v.61, n.1, p:85-9, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p: 248-254, 1976.

BUDZYŃSKA, A.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; SADOWSKA, B.; KALEMBA, D.; RÓZALSKA, B. Atividade antibiofilme de óleos essenciais vegetais selecionados e seus componentes principais. ***Jornal Polonês de Microbiologia***, v.60, n.1, p:35–41, 2011.

BUONOCORE, C.; GIUGLIANO, R.; DELLA SALA, G.; PALMA ESPOSITO, F.; TEDESCO, P.; FOLLIERO, V.; GALDIERO, M.; FRANCI, G.; DE PASCALE, D. Evaluation of Antimicrobial Properties and Potential Applications of *Pseudomonas gessardii* M15 Rhamnolipids towards Multiresistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutics**, v.19, n.15, p:700, 2023.

CALLAGHAN, B.; LYDON, H.; ROELANTS, S.L.; et al. *Lactonic Sophorolipids* Increase Tumor Burden in Apcmin+/- Mice. **PLoS One**, v.11, n.6, p: e0156845,2016.

CAMPOS-TAKAKI, GM.; SARUBBO, L.A.; ALBUQUERQUE, C.D. Environmentally friendly biosurfactants produced by yeasts. **Adv Exp Med Biol**,v. 672, p:250-60, 2010.

CAROLIN, C. F.; KUMAR, P.S.; NGUEAGNI, PT. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. **J Hazard Mater**, v.5, n.407, p:124827, 2021.

CAZALS, F.; HUGUENOT, D.; CRAMPON, M.; COLOMBANO, S.; BETELU, S.; GALOPIN, N.; PERRAULT, A.; SIMONNOT, M.O.; IGNATIADIS, I.; ROSSANO, S. Production of biosurfactant using the endemic bacterial community of a PAHs contaminated soil, and its potential use for PAHs remobilization. **Sci Total Environ**, v.709, p:136-143, 2020.

CERESA, C.; RINALDI, M.; FRACCHIA, L. Synergistic activity of antifúngicos and lipopeptide AC7 against *Candida albicans* biofilm on silicone. **AIMS Bioeng**, v.4, p:318, 2017.

CERESA, C.; TESSAROLO, F.; MANIGLIO, D.; et al. Medical-Grade Silicone Coated with Rhamnolipid R89 Is Effective against *Staphylococcus spp*. Biofilms. **Molecules**, v.24, n.21, p:3843, 2019.

CERESA, C.; FRACCHIA, L.; WILLIAMS, M.; BANAT, I.M.; DÍAZ DE RIENZO, M.A. The effect of sophorolipids against microbial biofilms on medical-grade silicone. **J Biotechnol**, v.309, p:34-43, 2020.

CERESA, C.; HUTTON, S.; LAJARIN-CUESTA, M.; HEATON, R.; HARGREAVES, I.; FRACCHIA, L.; DE RIENZO, M.A.D. Production of Mannosylerythritol Lipids (MELs) to be Used as Antimicrobial Agents Against *S. aureus* ATCC 6538. **Curr Microbiol**, v.77, n.8, p:1373-1380, 2020.

CERESA, C.; RINALDI, M.; TESSAROLO, F.; MANIGLIO, D.; FEDELI, E.; TAMBONE, E.; CACIAGLI, P.; BANAT, I.M.; DIAZ DE RIENZO, M.A.; FRACCHIA, L. Inhibitory Effects of Lipopeptides and Glycolipids on *C. albicans*-*Staphylococcus* spp. Dual-Species Biofilms. **Front Microbiol**, v.11, p:545654,2021.

CERESA, C.; FRACCHIA, L.; FEDELI, E.; PORTA, C.; BANAT, I.M. Recent Advances in Biomedical, Therapeutic and Pharmaceutical Applications of Microbial Surfactants. **Pharmaceutics**, v.13, n.4, p:466, 2021.

CHAGAS JUNIOR, G.C.A.; FERREIRA, N.R.; ANDRADE, E.H.A.; NASCIMENTO, L.D.D.; SIQUEIRA, F.C.; LOPES, AS. Profile of Volatile Compounds of On-Farm Fermented and Dried Cocoa Beans Inoculated with Saccharomyces cerevisiae KY794742 and *Pichia kudriavzevii* KY794725. **Molecules**, v. 26, n. 2, p:344.

CHEN, M.; WANG, J.; LIU, B.; ZHU, Y.; XIAO, R.; YANG, W.; GE, C.; CHEN, Z. Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. **BMC Microbiol**, v.20, n.1, p:160, 2020.

CHEN, W.C.; JUANG, R.S.; WEI, Y.H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochem Eng J**, v.103, p:158–169, 2015.

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

CHOWDHURY, T.; BAINDARA, P.; MANDAL, S.M. LPD-12: a promising lipopeptide to control COVID-19. **Int J Antimicrob Agents**, v.57, n.1, p:106218, 2021.

CIURKO, D.; CHEBBI, A.; KRUSZELNICKI, M.; CZAPOR-IRZABEK, H.; URBANEK, A.K.; POLOWCZYK, I.; FRANZETTI, A.; JANEK, T. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from a new strain of *Pseudomonas antarctica* 28E using crude glycerol as a carbon source. **RSC Adv**, v.13, n.34, p: 24129-24139, 2023.

CLAUS, S.; JENKINS SÁNCHEZ, L.; VAN BOGAERT, I.N.A. The role of transport proteins in the production of microbial glycolipid biosurfactants. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 105, n.5, p:1779-1793, 2021.

COLOMBO, A.L.; JÚNIOR, J.N.A.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant *Candida species*. **Curr Opin Infect Dis**, v.30, n.6, p:528-538, 2017.

CORDEIRO, R.A.; WESLLEY CARACAS CEDRO, E., RAQUEL COLARES ANDRADE, A.; et al. Inhibitory effect of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* on planktonic and sessile cells of *Trichosporon spp*. **Biofouling**, v.34, n.3, p:309-319, 2018.

DA SILVA, GO.; FARIAS, B.C.S.; DA SILVA, R.B.; TEIXEIRA, E.H.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; HISSA, D.C.; MELO, V.M.M. Effects of lipopeptide biosurfactants on clinical strains of *Malassezia furfur* growth and biofilm formation. **Med Mycol**, myab051, 2021.

DASTGHEIB, S.M.; AMOOZEGAR, M.A.; ELAHI, E.; ASAD, S.; BANAT, I.M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. **Biotechnol Lett**, v.30, n.2, p:263-70, 2008.

DE CÁSSIA, F. S.; SILVA, R.; ALMEIDA, D.G.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **Int J Mol Sci**,v. 15, n.7, p:12523-12542, 2014.

DENOIRJEAN, T.; DOURY, G.; POLI, P.; COUTTE, F.; & AMELINE, A. Effects of *Bacillus* lipopeptides on the survival and behavior of the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.226, p:112840, 2021.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.61, p: 47–64, 1997.

DEY, G.; BHARTI, R.; DHANARAJAN, G.; DAS, S.; DEY, K.K.; KUMAR, B.N.; SEN, R.; MANDAL, M. Marine lipopeptide Iturin A inhibits Akt mediated GSK3β and FoxO3a signaling and triggers apoptosis in breast cancer. **Sci. Rep**, v.5, p:10316, 2015.

DIAZ DE RIENZO, M.A.; KAMALANATHAN, I.D.; MARTIN, P.J. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by B. thailandensis E264 and P. aeruginosa ATCC 9027 using foam fractionation. **Proc. Biochem,** v.51, p:820–827, 2016.

DONG, H.; XIA, W.; DONG, H.; SHE, Y.; ZHU, P.; LIANG, K.; ZHANG, Z.; LIANG, C.; SONG, Z.; SUN, S.; ZHANG, G. Rhamnolipids Produced by Indigenous *Acinetobacter junii* from Petroleum Reservoir and its Potential in Enhanced Oil Recovery. **Front Microbiol,** v.7, p:1710, 2016.

DOS SANTOS, R.A.; RODRÍGUEZ, D.M.; FERREIRA, I.N.D.S.; DE ALMEIDA, S.M.; TAKAKI, G.M.C.; DE LIMA, M.A.B. Novel production of biodispersant by Serratia marcescens UCP 1549 in solid-state fermentation and application for oil spill bioremediation. **Environ Technol**, v.11, p:1-12, 2021.

DOUGLASS, A.P.; OFFEI, B.; BRAUN-GALLEANI, S.; COUGHLAN, A.Y.; MARTOS, A.A.R.; ORTIZ-MERINO, R.A.; BYRNE, K.P.; WOLFE, K.H. Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. **PLoS Pathog**, v.14, n.7, 2018.

DURVAL, I.J.B.; MENDONÇA, A.H.R.; ROCHA, I.V.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; CONVERTI, A.; SARUBBO, L.A. Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. **Mar Pollut Bull**, v.157, p:111357, 2020.

EDOSA, T.T.; JO, Y.H.; KESHAVARZ, M.; KIM, I.S.; HAN, Y.S. Biosurfactants Induce Antimicrobial Peptide Production through the Activation of TmSpatzles in *Tenebrio molitor*. **Int J Mol Sci**, v. 21, n.17, p:6090, 2020.

ELAKKIYA, V.T.; SURESHKUMAR, P.; ALHARBI, N.S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J.M.; GOVINDARAJAN, M. Swift production of rhamnolipid biosurfactant, biopolymer and synthesis of biosurfactant-wrapped silver nanoparticles and its enhanced oil recovery. **Saudi J Biol Sci**. v.27, n.7, p:1892-1899, 2020.

ELSHAFIE, A. E.; JOSHI, S. J.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-BEMANI, A. S.; AL-BAHRY, S. N.; AL-MAQBALI, D.; & BANAT, I. M. (2015). Sophorolipids Production by Candida bombicola ATCC 22214 and its Potential Application in Microbial Enhanced Oil Recovery. **Frontiers in microbiology**, v. *6*, p: 1324, 2015.

ENGLEROVÁ, K.; NEMCOVÁ, R.; BEDLOVIČOVÁ, Z.; STYKOVÁ, E. Antiadhesive, antibiofilm and dispersion activity of biosurfactants isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* 3/22. **Ceska Slov Farm**, v.70, n.5, p:172–178, 2021.

ERAS-MUÑOZ, E.; FARRÉ, A.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; GEA T. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. **Bioengineered**, v.13, n.5, p:12365-12391, 2022.

FAN, Y.; TAO, W.; HUANG, H. et al. Characterization of a novel bioemulsifier from *Pseudomonas stutzeri*. **World J Microbiol Biotechnol**, v.33, p:161,2017.

FENIBO; EMMANUEL, O. et al. “Microbial Surfactants: The Next Generation Multifunctional Biomolecules for Applications in the Petroleum Industry and Its Associated Environmental Remediation.” **Microorganisms**, v. 7, p: 11 581,2019.

FENG, J.; CHEN, W.; LIU, Q.; CHEN, Z.; YANG, J.; YANG, W. Development of abamectin-loaded nanoemulsion and its insecticidal activity and cytotoxicity. **Pest Manag Sci**, v. 76, n.12, p: 4192-4201, 2020.

FERREIRA, G.; DA SILVA, D.J.; SOUZA, A.G.; YUDICE, E.D.C.; DE CAMPOS, I.B.; COL, R.D.; MOURÃO, A.; MARTINHO, H.S.; ROSA, D.S. Eco-friendly and effective antimicrobial Melaleuca alternifolia essential oil Pickering emulsions stabilized with cellulose nanofibrils against bacteria and SARS-CoV-2. **Int J Biol Macromol**, v.243, p:125228, 2023.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, E.; BANAT, I.M. Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. **Adv Exp Med Biol**, v.672, p:121-34, 2010.

FREITAS B. G., BRITO J. G. M., BRASILEIRO P. P. F., RUFINO R. D., LUNA J. M., SANTOS V. A., et al. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Front. Microbiol**, v7, P.1646,2016.

GAN, P.; JIN, D.; ZHAO, X.; GAO, Z.; WANG, S.; DU, P.; QI, G. *Bacillus*-produced surfactin attenuates chronic inflammation in atherosclerotic lesions of ApoE(-/-) mice. **Int Immunopharmacol**, v.35, p:226-234, 2016.

GANJI, Z.; BEHESHTI-MAAL, K.; MASSAH, A.; EMAMI-KARVANI, Z. A novel sophorolipid-producing *Candida keroseneae* GBME-IAUF-2 as a potential agent in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **FEMS Microbiol Lett**, v.367, n.17, p: 144, 2020.

GAUR, V.K.; REGAR, R.K.; DHIMAN, N.; GAUTAM, K.; SRIVASTAVA, J.K.; PATNAIK, S.; KAMTHAN, M.; MANICKAM; N. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida spp*.: Application as food emulsifier and antibacterial agent. **Bioresour Technol**, v.285, p:121314, 2019.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. **Curr Opin Biotechnol**, v.30, p:66-72, 2014.

GIUGLIANO, R.; BUONOCORE, C.; ZANNELLA, C.; CHIANESE, A.; PALMA ESPOSITO, F.; TEDESCO, P.; DE FILIPPIS, A.; GALDIERO, M.; FRANCI, G.; DE PASCALE, D. Antiviral Activity of the Rhamnolipids Mixture from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas gessardii* M15 against *Herpes Simplex* Viruses and *Coronaviruses*. **Pharmaceutics**, v.13, n.12, p:2121, 2021

GOLDMAN, S.; SHABTAI, Y.; RUBINOVITZ, C.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D.L. Emulsan in Acinetobacter calcoaceticus RAG-1: Distribution of Cell-Free and Cell-Associated Cross-Reacting Material. **Appl Environ Microbiol**, v.44, n.1, p:165-70, 1982.

GUDIÑA, E.J.; PEREIRA, J.F.; COSTA, R.; et al. Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. **Microb Cell Fact**, v.14, p:14, 2015.

GUDIÑA, E.J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.; RODRIGUES, L. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paraCASei* ssp. paraCASei A20. **Lett Appl Microbiol**, v.50, n.4, p:419–424, 2010.

GUILLÉN-NAVARRO, K.; LÓPEZ-GUTIÉRREZ, T.; GARCÍA-FAJARDO, V.; GÓMEZ-CORNELIO, S.; ZARZA, E.; DE LA ROSA-GARCÍA, S.; CHAN-BACAB, M. Broad-Spectrum Antifungal, Biosurfactants and Bioemulsifier Activity of Bacillus subtilis subsp. spizizenii-A Potential Biocontrol and Bioremediation Agent in Agriculture. **Plants (Basel),** v.12, n.6, p:1374, 2023.

GUIMARÃES, C.R.; PASQUALINO, I.P.; DE SOUSA, J.S.; NOGUEIRA, F.C.S; SELDIN, L.; DE CASTILHO, L.V.A.; FREIRE, D.M.G. *Bacillus velezensis* H2O-1 surfactin efficiently maintains its interfaciais properties in extreme conditions found in post-salt and pre-salt oil reservoirs. **Colloids Surf B Biointerfaces**,v. 208, p:112072. 2021.

GUPTA, S.; RAGHUWANSHI, N.; VARSHNEY, R.; BANAT, I.M.; SRIVASTAVA, A.K.; PRUTHI, P.A.; PRUTHI, V. Accelerated in vivo wound healing evaluation of microbial glycolipid containing ointment as a transdermal substitute. **Biomed Pharmacother**, v.94, p:1186-1196, 2017.

GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, C.; BENAUD, N.; FERRARI, B.C. The ecological roles of microbial lipopeptides: Where are we going?. **Comput Struct Biotechnol J**,v. 19, p:1400-1413, 2021.

HABA, E.; BOUHDID, S.; TORREGO-SOLANA, N.; MARQUÉS, A.M.; ESPUNY, M.J.; GARCÍA-CELMA, M.J.; MANRESA, A. Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: antimicrobial effect against Candida albicans and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Pharm,** v.476, n.1-2, p:134-41, 2014.

HABE, H.; TAIRA, T.; SATO, Y.; IMURA, T.; ANO, T. Evaluation of Yield and Surface Tension-lowering Activity of Iturin a Produced by *Bacillus subtilis* RB14. **J Oleo Sci,** v.68, n.11, p:1157-1162, 2019.

HADDAJI, N.; NCIB, K.; BAHIA, W.; GHORBEL, M.; LEBAN, N.; BOUALI, N.; & MAHDHI, A. Control of Multidrug-Resistant Pathogenic *Staphylococci* Associated with Vaginal Infection Using Biosurfactants Derived from Potential Probiotic *Bacillus* Strain. **Fermentation**, v.8, n.1, p: 19, 2022.

HAGLER, M.; SMITH-NOROWITZ, T.; CHICE, S.; WALLNER, S.; VITERBO, D.; MUELLER, C. Sophorolipids decrease IgE production in U266 cells by downregulation of BSAP (Pax5), TLR-2, STAT3 and IL-6. **J Allergy Clin Immunol**, v.119, p:263, 2007.

HARDIN, R.; PIERRE, J.; SCHULZE, R.; MUELLER, C.M.; FU, S.L.; WALLNER, S.R. Sophorolipids improve sepsis survival: effects of dosing and derivatives. **J Surg Res**, v.142, p:314–319, 2007.

HOGAN, D. E.; TIAN, F.; MALM, S. W.; OLIVARES, C.; PALOS PACHECO, R.; SIMONICH, M. T.; HUNJAN, A. S.; TANGUAY, R. L.; KLIMECKI, W. T.; POLT, R.; PEMBERTON, J. E.; CURRY, J. E.; & MAIER, R. M. Biodegradability and toxicity of monorhamnolipid biosurfactant diastereomers. **Journal of hazardous materials**, v364, p:600–607, 2019.

HU, X.; CHENG, T.; LIU, J. A novel Serratia sp. ZS6 isolate derived from petroleum sludge secretes biosurfactant and lipase in medium with olive oil as sole carbon source. **AMB Express**, v.8, n.1, p:165, 2018.

HU, F.; LIU, Y.; LI, S. Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. **Microb Cell Fact**, v.18, n.1, p:42, 2019.

JADEJA, N.B.; MOHARIR, P.; KAPLEY, A. Genome Sequencing and Analysis of Strains *Bacillus sp*. AKBS9 and Acinetobacter sp. AKBS16 for Biosurfactant Production and Bioremediation. **Appl Biochem Biotechnol**, v.187, n.2, p:518-530, 2019.

JAMIU, A.T.; ALBERTYN, J.; SEBOLAI, O.M.; POHL, C.H. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Med Mycol**, v. 59, n.1, p:14-30, 2021.

JEZIERSKA, S.; CLAUS, S.; VAN BOGAERT, I. Yeast glycolipid biosurfactants. **FEBS Lett**, v. 592, n.8, p:1312-1329, 2018.

JIANG, R.; SUZUKI, Y.A.; DU, X.; LÖNNERDAL, B. *Lactoferrin* and the *lactoferrin–sophorolipids*-assembly can be internalized by dermal fibroblasts and regulate gene expression. **Biochem. Cell Biol**, v.95, p:110–118, 2017.

JIANG, C.; SHI, J.; LIU, Y.; ZHU, C. Inhibition of Aspergillus carbonarius and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. **Food Control**, v.35n.1, p:41–48, 2014.

JOHNSON, P.; TRYBALA, A.; STAROV, V.; PINFIELD, V.J. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Adv Colloid Interface Sci**,v. 288, p:102340, 2021.

JOSHI-NAVARE, K.; PRABHUNE, A. A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. **Biomed Res Int**, v.2013, p:512495, 2013.

JUMA, A.; LEMOINE, P.; SIMPSON, A.B.J.; MURRAY, J.; O'HAGAN, B.M.G.; NAUGHTON, P.J.; DOOLEY, J.G.; BANAT, I.M. Microscopic Investigation of the Combined Use of Antibiotics and Biosurfactants on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Front Microbiol**, v.11, p:1477, 2020.

KEAN, R.; RAMAGE, G. Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: The Global Threat of *Candida auris*. **mSphere**, v.4, n.4, p: e00458-19, 2019.

KHAN, T.A.; MAHLER, H.C.; KISHORE, R.S.K. Key interactions of surfactants in therapeutic protein formulations: a review. **Eur J Pharm Biopharm**,v. 97, p: 60–67, 2015.

KHANNA, A.; HANDA, S.; RANA, S. et al. Biosurfactant from Candida: sources, classification, and emerging applications. **Arch Microbiol**, v. 205, n.149, 2023.

KIM, Y.T.; KIM, S.E.; LEE, W.J.; FUMEI, Z.; CHO, M.S.; MOON, J.S.; OH, H.W.; PARK, H.Y.; KIM, S.U. Isolation and characterization of a high iturin yielding *Bacillus velezensis* UV mutant with improved antifungal activity. **PLoS One**, v.15, n.12, p: e0234177, 2020.

KIM, H.Y.; JUNG, H.; KIM, H.M.; JEONG, H.J. Surfactin exerts an anti-cancer effect through inducing allergic reactions in melanoma skin cancer. **Int Immunopharmacol**, v.99, p:107934, 2021.

KITAMOTO, D.; FUKUOKA, T.; SAIKA, A.; MORITA, T. Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids: Distinctive Interfacial Properties and Applications in Cosmetic and Personal Care Products. **J Oleo Sci**,v. 71, n.1, p:1-13, 2021.

KLAUSMANN, P.; HENNEMANN, K.; HOFFMANN, M.; TREINEN, C.; ASCHERN, M.; LILGE, L.; MORABBI HERAVI, K.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R. *Bacillus subtilis* High Cell Density Fermentation Using a Sporulation-Deficient Strain for the Production of Surfactin. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.105, n.10, p:4141-4151, 2021.

KONISHI, M.; MARUOKA, N.; FURUTA, Y.; et al. Biosurfactant-producing yeasts widely inhabit various vegetables and fruits. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.78, n.3, p:516-523, 2014.

KUBICKI, S.; BOLLINGER, A.; KATZKE, N.; JAEGER, K.E.; LOESCHCKE, A.; & THIES, S. Biossurfactantes Marinhos: Biossíntese, Diversidade Estrutural e Aplicações BiotecnológiCAS. **Drogas marinhas**, v.17, n.7, p:408, 2019.

KUMAR, A.; NAIR, R.; KUMAR, M.; BANERJEE, A.; CHAKRABARTI, A.; RUDRAMURTHY, S.M.; BAGGA, R.; GAUR, N.A.; MONDAL, A.K.; PRASAD, R. Assessment of antifungal resistance and associated molecular mechanism in *Candida albicans* isolates from different cohorts of patients in North Indian state of Haryana. **Folia Microbiol (Praha)**, v.65, n.4, p:747-754, 2020.

KUMARI, A.; KUMARI, S.; PRASAD, G.S.; PINNAKA, A.K. Production of Sophorolipid Biosurfactant by Insect Derived Novel Yeast *Metschnikowia churdharensis* f.a., sp. nov., and Its Antifungal Activity Against Plant and Human Pathogens. **Front Microbiol**, v.12, p:678668, 2021.

KUMARI, R.; SINGHA, L.P.; SHUKLA, P. Biotechnological potential of microbial bio-surfactants, their significance, and diverse applications. **FEMS Microbes**, v.4, 2023.

KUMAR, A.; SINGH, S.K.; KANT, C., et al. Microbial Biosurfactant: A New Frontier for Sustainable Agriculture and Pharmaceutical Industries. **Antioxidants (Basel)**, v. 10, n.9, p:1472, 2021.

KURTZMAN, C.P.; PRICE, N.P.; RAY, K.J.; KUO, T.M. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. **FEMS Microbiol Lett**, v.311, n.2, p:140-6, 2010.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. As leveduras: um estudo taxonômico. 5. **Amsterdã: Elsevier Science Ltd**; 2011.

KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; GEIN, S.V.; BAEVA, T.A.; CHERESHNEV, V.A. In vitro immunomodulating activity of biosurfactant glycolipid complex from *Rhodococcus ruber*. **Bull. Exp. Biol. Med**, v.144, p:326–330, 2007.

KWAK, M.J.; PARK, M.Y.; KIM, J.; LEE, H.; WHANG, K.Y. Curative effects of sophorolipid on physical wounds: In vitro and in vivo studies. **Vet Med Sci**, v.7, n.4, p:1400-1408, 2021.

LABENA, A.; HEGAZY, M.A.; SAMI, R.M.; HOZZEIN, W.N. Multiple Applications of a Novel Cationic Gemini Surfactant: Anti-Microbial, Anti-Biofilm, Biocide, Salinity Corrosion Inhibitor, and Biofilm Dispersion (Part II). **Molecules**, v.25, n.6, p:1348, 2020.

LAI, C.C.; CHEN, S.Y.; KO, W.C.; HSUEH, P. R. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. **Int J Antimicrob Agents**, v.57, n.4, p:106324, 2021.

LERMINIAUX, N.A.; CAMERON, A.D.S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Can J Microbiol**, v.65, n.1, p:34-44, 2019.

LI, D.; WANG, W.; WU, Y.; MA, X.; ZHOU, W.; LAI, Y. Lipopeptide 78 from *Staphylococcus epidermidis* Activates β-Catenin to Inhibit Skin Inflammation. **J Immunol**, v.202, n.4, p:1219-1228, 2019.

LIN, X.; ZHOU, H.; ZENG, F.; JIANG, L.; ATAKPA, E.O.; CHEN, G.; ZHANG, C.; XIE, Q. A biosurfactant-producing yeast *Rhodotorula* sp.CC01 utilizing landfill leachate as nitrogen source and its broad degradation spectra of petroleum hydrocarbons. **World J Microbiol Biotechnol**. 2022 Mar 5;38(4):68.

LINDHOLM, C.; SEARLE, R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. **Int Wound J**, v.13, p:5-15, 2016.

LIU, J.F.; MBADINGA, S.M.; YANG, S.Z.; GU, J.D.; Mu, B.Z. Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. **Int. J. Mol. Sci**, v.16, p:4814–4837, 2015.

LIU, J.; LI, W.; ZHU, X.; ZHAO, H.; LU, Y.; ZHANG, C.; LU, Z. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.103, n..11, p:4565-4574, 2019.

LIU, Y.; DING, S.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAUER, E.; ZHU, K. A Biosurfactant-Inspired Heptapeptide with Improved Specificity to Kill MRSA. **Angew Chem Int Ed Engl**, v.56, n.6, p:1486-1490, 2017.

LIU, Y.; TENG, K.; WANG, T.; DONG, E.; ZHANG, M.; TAO, Y.; ZHONG, J. *Antimicrobial Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. **J Appl Microbiol**, v.128, n.1, p:242-254, 2020.

LIU, X.G.; MA, X.J.; YAO, R.S.; PAN, C.Y.; HE, H.B. Sophorolipids production from rice straw via SO3 micro-thermal explosion by Wickerhamiella domercqiae var. sophorolipid CGMCC 1576. **AMB Express**,v. 6, n.1, p: 60, 2016.

LOETO, D.; JONGMAN, M.; LEKOTE, L.; MUZILA, M.; MOKOMANE, M.; MOTLHANKA, K.; NDLOVU, T.; ZHOU, N. Biosurfactant production by halophilic yeasts isolated from extreme environments in Botswana. **FEMS Microbiol Lett**, v.368, n.20, p:146, 2021.

LOZACH, P.Y. Cell Biology of Viral Infections. **Cells**, v.9, n.11, p:2431, 2020.

MA, X.; MENG, L.; ZHANG, H. *et al.* Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates. **Appl Microbiol** Biotechnol, v. 104**,** p: 77–100, 2020.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends Biotechnol. England**, v.30, p: 558–565, 2012.

MAENG, Y.; KIM, K.T.; ZHOU, X.; et al. A novel microbial technique for producing high-quality sophorolipids from horse oil suitable for cosmetic applications. **Microb Biotechnol**, v.11, n.5, p:917-929, 2018.

MAO, X.; JIANG, R.; XIAO, W.; YU, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. **J Hazard Mater**,v. 285, p:419-35, 2015.

MARQUES, N.S.A.A.; SILVA, I.G.S.D.; CAVALCANTI, D.L.; et al. Eco-Friendly Bioemulsifier Production by *Mucor circinell*oides UCP0001 Isolated from Mangrove Sediments Using Renewable Substrates for Environmental Applications. **Biomolecules**, v.10, n.3, p:365, 2020.

MARQUEZ, R.; ANTON, R.; VEJAR, F.; et al. New interfacial rheology characteristics measured using a spinning drop Rheometer at the optimum formulation. Part 2. Surfactant–oil–water systems with a high volume of middle-phase microemulsion. **J Surfactants Deterg**,v. 22, p:177–188, 2019.

MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute.Marchant R, Banat IM. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends Biotechnol. England**, v.30, p: 558–565, 2012. and chronic wound healing. **Br J Dermatol**, v.173, n.2, p:370-378, 2015.

MD. BADRUL HISHAM, N.H.; IBRAHIM, M.F.; RAMLI, N.; ABD-AZIZ, S. Production of Biosurfactant Produced from Used Cooking Oil by *Bacillus sp*. HIP3 for Heavy Metals Removal. **Molecules**, v.24, n.14, p:2617, 2019.

MELNYK, A.H.; WONG, A.; KASSEN, R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. **Evol Appl**, v.8n.3, p:273-283, 2015.

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

MONTEIRO, A.S.; BONFIM, M.R.Q.; DOMINGUES, V.S.; CORRÊA, A., JR; SIQUEIRA, E.P.; ZANI, C.L.; SANTOS, V.L. Identification and Characterization of Bioemulsifier-Producing Yeasts Isolated from Effluents of a Dairy Industry. Bioresour. **Technol**, v. 101, p:5186–5193, 2010.

MONTEIRO, A.S.; DOMINGUES, V.Z.; SOUZA, M.V.D.; LULA, I.; GOLCALVES, D.B.; DE SIQUEIRA, E.P.; DOS SANTOS, V.L. Bioconversion of biodiesel refinery waste in the bioemulsifier by *Trichosporon mycotoxinivorans* CLA2. **Biotechnol**. Biofuels, v.5, p:29, 2012.

MORAIS, I.M.C.; CORDEIRO, A.L.; TEIXEIRA, G.S.; DOMINGUES, V.S.; NARDI, R.M.D.; MONTEIRO, A.S.; ALVES, R.J.; SIQUEIRA, E.P.; SANTOS, V.L. Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P6A and *Lactobacillus gasseri* P65. **Microb Cell Fact**, v.16, n.1, p:155, 2017.

MILLER, R. M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. **Environ. Health Perspect**, v. 103, p: 59–62, 1995.

MOUAFO, T.H.; MBAWALA, A.; NDJOUENKEU, R. Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus spp*. **Biomed Res Int**, v.2018, p:5034783, 2018.

MUELLER, C.M.; LIN, Y.; VITERBO, D.; PIERRE, J.; MURRAY, S.A.; SHAH, V. 2006. Sophorolipid treatment decreases inflammatory cytokine expression in an in vitro model of experimental sepsis. **The FASEB Jour**, v.20, 2006.

MUJUMDAR, S.; JOSHI, P.; KARVE, N. Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter spp*.: A review. **J Basic Microbiol**, p:1–11, 2019.

MUKHERJI, R.; PRABHUNE, A. Novel glycolipids synthesized using plant essential oils and their application in quorum sensing inhibition and as antibiofilm agents. **ScientificWorldJournal**, v.2014, p:890709, 2014.

NAYARISSERI, A.; SINGH, P.; SINGH, S. Screening, isolation and characterization of biosurfactant-producing *Bacillus tequilensis* strain ANSKLAB04 from brackish river water. **Int J Sci Environ Technol**, v.16, n.11, p:7103–7112, 2019.

NAUGHTON, P.; MARCHANT, R.; NAUGHTON, V.; BANAT, I. Microbial biosurfactants: Current trends and applications in agricultural and biomedical industries. **J. Appl. Microbiol**, v.127, p:12–28, 2019.

NELSON, J.; EL-GENDY, A.O.; MANSY, M.S.; RAMADAN, M.A.; AZIZ, R.K. The biosurfactants iturin, lichenysin and surfactin, from vaginally isolated *lactobacilli*, prevent biofilm formation by pathogenic Candida. **FEMS Microbiol Lett**, v.367, n.15, p: 126, 2020.

NGUYEN, B.V.G.; NAGAKUBO, T.; TOYOFUKU, M.; NOMURA, N.; UTADA, A.S. Synergy between Sophorolipid Biosurfactant and SDS Increases the Efficiency of *P. aeruginosa* Biofilm Disruption. **Langmuir**, v.36, n.23, p:6411-6420, 2020.

NURFARAHIN, A.H.; MOHAMED, M.S.; PHANG, L.Y. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production-An Overview. **Molecules**, v.23, n.5, p:1049, 2018.

OHADI, M.; FOROOTANFAR, H.; RAHIMI, H.R.; JAFARI, E.; SHAKIBAIE, M.; ESLAMINEJAD, T.; DEHGHANNOUDEH, G. Antioxidant Potential and Wound Healing Activity of Biosurfactant Produced by *Acinetobacter junii* B6. **Curr Pharm Biotechnol**, v.18, n.11, p:900-908, 2017.

OHADI, M.; DEHGHANNOUDEH, G.; FOROOTANFAR, H.; SHAKIBAIE, M.; RAJAEE, M. Investigation of the structural, physicochemical properties, and aggregation behavior of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. **Int J Biol Macromol**, v.112, p:712-719, 2018.

OHADI, M.; FOROOTANFAR, H.; DEHGHANNOUDEH, G.; ESLAMINEJAD, T.; AMERI, A.; SHAKIBAIE, M.; ADELI-SARDOU, M. Antimicrobial, anti-biofilm, and anti-proliferative activities of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. **Microb Pathog**, v.138, p:103806, 2020.

OHADI, M.; SHAHRAVAN, A.; DEHGHANNOUDEH, N.; ESLAMINEJAD, T.; BANAT, I.M.; DEHGHANNOUDEH, G. Potential Use of Microbial Surfactant in Microemulsion Drug Delivery System: A Systematic Review. **Drug Des Devel Ther**, v.14, p: 541-550, 2020.

OSTENDORF, T.A.; SILVA, I.A.; CONVERTI, A.; SARUBBO, L.A. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. **J Biotechnol**, v.295, p:71-79, 2019.

ORTEGA DE LA ROSA, N.D.; VÁZQUEZ VÁZQUEZ, J.L.; HUERTA OCHOA, S.; GIMENO, M.; GUTIÉRREZ ROJAS, M. Stable bioemulsifiers are produced by Acinetobacter bouvetii UAM25 growing in different carbon sources. **Bioprocess. Biosyst. Eng**, v.41, p:859–869, 2018.

OUTLAW, V.K.; BOVIER, F.T.; MEARS, M.C.; et al. Inhibition of Coronavirus Entry In Vitro and Ex Vivo by a Lipid-Conjugated Peptide Derived from the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein HRC Domain. **mBio**, v.11, n.5, p: e01935-20, 2020.

OTZEN, D.E. (2017) Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: same but diferent? **Biochim Biophys Acta**, p:639–649, 1859.

OTTO, M. *Staphylococcal* biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.322, p:207-28, 2008.

OTTO, M. *Staphylococcal* Biofilms. **Microbiol Spectr**., v.6, n.4, p:10.1128, 2018.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA S.S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **Int. J. Mol. Sci**, v.12, p:633–654, 2011.

PARDHI, D.S.; PANCHAL, R.R.; RAVAL, V.H.; RAJPUT, K.N. Statistical optimization of medium components for biosurfactant production by *Pseudomonas guguanensis* D30. **Prep Biochem Biotechnol**, v.52, n.2, p:171-180, 2022.

PASTAR, I.; NUSBAUM, A.G.; GIL, J.; PATEL, S.B.; CHEN, J.; VALDES, J.; et al. Interactions of methicillin resistant Staphylococcus aureus USA300 and Pseudomonas aeruginosa in polymicrobial wound infection. **PLoS One**, v.8, p: e56846. 102, 2013.

PATEL, S.; HOMAEI, A.; PATIL, S. *et al.* Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 103**,** p: 27–37, 2019.

PATIL, J.R.; CHOPADE, B.A. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. **J Appl Microbiol**, v.91, n.2, p:290-8, 2001.

PEREZ, K.J.; VIANA, J.D.; LOPES, F.C.; PEREIRA, J.Q.; DOS SANTOS, D.M.; OLIVEIRA, J.S.; VELHO, R.V.; CRISPIM, S.M.; NICOLI, J.R.; BRANDELLI, A.; NARDI, R.M. Bacillus spp. Isolated from Puba as a Source of Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides. **Front Microbiol**, v.8, p:61, 2017.

PHULPOTO, I.A.; WANG, Y.; QAZI, M.A.; HU. B.; NDAYISENGA, F.; YU, Z. Bioprospecting of rhamnolipids production and optimization by an oil-degrading *Pseudomonas sp*. S2WE isolated from freshwater lake. **Bioresour Technol**,v. 323, p:124601, 2021.

PHULPOTO, I.A.; YU, Z.; HU, B.; et al. Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and it's potential for oil contaminated soil remediation. **Microb Cell Fact**, v.19, n.1, p:145, 2020.

PHULPOTO, I.A.; WANG, Y.; QAZI, M.A.; HU, B.; NDAYISENGA, F.; YU, Z. Bioprospecting of rhamnolipids production and optimization by an oil-degrading Pseudomonas sp. S2WE isolated from freshwater lake. **Bioresour Technol**, v.323, p:124601, 2021.

PINTO, M.I.S.; CAMPOS, J.M.; MEIRA, H.M.; SARUBBO, L.A.; DE LUNA, J.M. A Biosurfactant from Candida bombicola: Its Synthesis, Characterization, and its Application as a Food Emulsions. **Foods**, v. 11, n.4, p:561, 2022.

PIRES, F.C.S.; OLIVEIRA, J.C.; MENEZES, E.G.O et al. Bioactive Compounds and Evaluation of Antioxidant, Cytotoxic and Cytoprotective Effects of Murici Pulp Extracts (*Byrsonima crassifolia*) Obtained by Supercritical Extraction in HepG2 Cells Treated with H_2O_2. **Foods**. v.10, n.4, p: 737, 2021.

PONTES, C.; ALVES, M.; SANTOS, C.; RIBEIRO, M.H.; GONÇALVES, L.; BETTENCOURT, A.F.; RIBEIRO, I.A. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? **Int J Pharm**, v.513, n.1-2, p:697-708, 2016.

POŠA, M.; PILIPOVIĆ, A.; TOROVIĆ, L.; et al. Co-solubilisation of a binary mixture of isoflavones in a water micellar solution of sodium cholate or cetyltrimethylammonium bromide: influence of micelle structure. **J Mol Liq**,v. 273, p:134–146, 2019.

QI, X.; XU, X.; ZHONG, C.; JIANG, T.; WEI, W.; SONG, X. Removal of Cadmium and Lead from Contaminated Soils Using Sophorolipids from Fermentation Culture of *Starmerella bombicola* CGMCC 1576 Fermentation. **Int J Environ Res Public Health**,v. 15, n. 11, p:2334, 2018.

RAHIMI, K.; LOTFABAD, T.B.; JABEEN, F.; MOHAMMAD GANJI, S. Cytotoxic effects of mono- and di-rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa MR01 on MCF-7 human breast cancer cells. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.181, p:943-952, 2019.

RAHIM, K.; SALEHA, S.; ZHU, X.; HUO, L.; BASIT, A.; FRANCO, O.L. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. **Microb Ecol**, v.73, n.3, p:710-721, 2017.

RATHER, M.A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Braz J Microbiol**, v.52, n.4, p:1701-1718, 2021.

RAVINDRAN, A.; SAJAYAN, A.; PRIYADHARSHINI, G.B.; SELVIN, J.; KIRAN, G.S. Revealing the Efficacy of Thermostable Biosurfactant in Heavy Metal Bioremediation and Surface Treatment in Vegetables. **Front Microbiol**,v. 11, p: 222, 2020.

REHMAN, R.; ALI, M.I.; ALI, N.; BADSHAH, M.; IQBAL, M.; JAMAL, A.; HUANG, Z. Crude oil biodegradation potential of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Meyerozyma sp*. **J Hazard Mater**,v, 418, p:126276, 2021.

RIBEIRO, B.G.; GUERRA, J.M.C.; SARUBBO, L.A. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. **Front Bioeng Biotechnol**.v.8, p:434, 2020.

RIBEIRO, I.A.; FAUSTINO, C.M.; GUERREIRO, P.S.; FRADE, R.F.; BRONZE, M.R.; CASTRO, M.F.; RIBEIRO, M.H. Development of novel sophorolipids with improved cytotoxic activity toward MDA-MB-231 breast cancer cells. **J. Mol. Recognit**, v.28, p:155–165, 2015.

RIVARDO, F.; MARTINOTTI, M.G.; TURNER, R.J.; CERI, H. Synergistic effect of lipopeptide biosurfactant with antibiotics against *Escherichia coli* CFT073 biofilm. **Int J Antimicrob Agents**, v.37, n.4, p:324-31, 2011.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.52, n.2, p:154-62, 1999.

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; GOTTLIEB, A.; ROSENHAK, S.; RON, E.Z. Production of Biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. **Appl Environ Microbiol**, v.54, n.2, p:317-322, 1988.

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v.9, n.1, p:522-554, 2018.

RUFINO R. D., LUNA J. M., TAKAKI G. M. C., SARUBBO L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by Candida lipolytica UCP 0988. Electron. **J. Biotechnol**, V. 17, P. 34–38., 2014.

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

RULLI, M.M.; ALVAREZ, A.; FUENTES, M.S.; COLIN, V.L. Production of a microbial emulsifier with biotechnological potential for environmental applications. **Colloids Surf B Biointerfaces**,v. 174, p: 459-466, 2019.

SANA, S.; DATTA, S.; BISWAS, D.; SENGUPTA, D. Assessment of synergistic antibacterial activity of combined biosurfactants revealed by bacterial cell envelop damage. **Biochim Biophys Acta Biomembr**, v.1860, n.2, p:579-585, 2018.

SARWAR, A.; BRADER, G.; CORRETTO, E.; et al. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity [published correction appears in PLoS One. 2018 Jul 26;13(7): e0201624]. **PLoS One**, v.13, n.6, p: e0198107, 2018.

SAN MARTÍN, Y.B.; TOLEDO LEÓN, H.F.; RODRÍGUEZ, A.Á.; MARQUÉS, A.M.; LÓPEZ, M.I.S. Rhamnolipids Application for the Removal of Vanadium from Contaminated Sediment. **Curr Microbiol**,v. 78,n.5, p:1949-1960, 2021.

SANTOS, D.K.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **Int J Mol Sci**,v. 17, n.3, p: 401, 2016.

SANTOS; DANYELLE, K. F. et al. *Candida lipolytica* UCP0988 Biosurfactant: Potential as a Bioremediation Agent and in Formulating a Commercial Related Product. **Frontiers in microbiology**, vol. 8, n.767, 2017.

SCHINKEL, L., LARA-MARTÍN, P.A.; GIGER, W.; HOLLENDER, J.; BERG, M. Synthetic surfactants in Swiss sewage sludges: Analytical challenges, concentrations and per capita loads. **Sci Total Environ**,v. 808, p:151-361, 2022.

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

SEN, S.; BORAH, S.N.; BORA, A.; DEKA, S. Rhamnolipid exhibits anti-biofilm activity against the dermatophytic fungi *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Biotechnol Rep (Amst)**, v.27, p:e00516, 2020.

SHAH, V.; DONCEL, G.F.; SEYOUM, T.; EATON, K.M.; ZALENSKAYA, I.; HAGVER, R.; AZIM, A.; GROSS, R. Sophorolipids, Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. **Antimicrob. Agents Chemother**. V. 49, p: 4093–4100, 2005.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A.U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrob Resist Infect Control**, v.8, p:76, 2019.

SHARMA, N.; LAVANIA, M.; LAL, B. Biosurfactant: A Next-Generation Tool for Sustainable Remediation of Organic Pollutants. **Front Microbiol**, v.21, n.12, p:821531, 2023.

SHARMA, D.; SINGH, D.; SUKHBIR-SINGH, G.M.; KARAMCHANDANI, B.M.; ASERI, G.K.; BANAT, I.M.; SATPUTE, S.K. Biosurfactants: Forthcomings and Regulatory Affairs in Food-Based Industries. **Molecules**, v.28, n.6, p:2823, 2023.

SHAQ, U.; AKRAM, M.S.; IQBAL, Z.; RAFIQ, M.; AKREM, A.; NADEEM, M.; SHAFI, F.; SHAFIQ, Z.; MAHMOOD, S.; BAIG, M.A. Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. **J Appl Microbiol**, v.119, n.4, p:1035-45, 2015.

SHEN, C.; JIANG, L.; SHAO, H.; et al. Targeted killing of myofibroblasts by biosurfactant di-rhamnolipid suggests a therapy against scar formation. **Sci Rep**, v.6, p:37553, 2016.

SHEN, Y.; LI, P.; CHEN, X.; ZOU, Y.; LI, H.; YUAN, G.; HU, H. Activity of Sodium Lauryl Sulfate, Rhamnolipids, and N-Acetylcysteine Against Biofilms of Five Common Pathogens. **Microb Drug Resist**, v.26, n.3, p:290-299, 2020.

SHRUTHI, B.; DEEPA, N.; SOMASHEKARAIAH, R.; ADITHI, G.; DIVYASHREE, S.; SREENIVASA, M.Y. Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. **Biotechnol Rep (Amst)**, v. 34, p: 716, 2022.

SIDRIM, J.J.; OCADAQUE, C.J.; AMANDO, B.R.; DE M GUEDES, G.M.; COSTA, C.L.; BRILHANTE, R.S.; A CORDEIRO, R.; ROCHA, M.F.; SCM CASTELO-BRANCO, D. Rhamnolipid enhances *Burkholderia pseudomallei* biofilm susceptibility, disassembly and production of virulence factors. **Future Microbiol**, v.15, p:1109-1121, 2020

SILVA, G.F.D; GAUTAM, A.; DUARTE, I.C.S; DELFORNO, T.P.; OLIVEIRA, V.M.; HUSON, D.H. Interactive analysis of biosurfactants in fruit-waste fermentation samples using BioSurfDB and MEGAN. **Sci Rep**. 2022, v. 12, n.1, p:7769, 2022.

SILVA, I.A.; VERAS, B.O.; RIBEIRO, B.G.; et al. Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. **PeerJ**, v.8, p: e9064, 2020.

SILVA, M.E.T.; DUVOISIN, S. Jr.; OLIVEIRA, R.L.; BANHOS, E.F.; SOUZA, A.Q.L.; ALBUQUERQUE, P.M. Biosurfactant production of Piper hispidum endophytic fungi. **J Appl Microbiol**, v.130, n.2, p:561-569, 2021.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **J Appl Microbiol**, v.126, n.1, p:2-13, 2019.

SILVA, S.S.; CARVALHO, J.W.P.; AIRES, C.P.; NITSCHKE, M. Disruption of *Staphylococcus aureus* Biofilms Using Rhamnolipid Biosurfactants. **J. Dairy Sci**, v.100, p: 7864–7873, 2017.

SOUZA, F. A. S. D.; SALGUEIRO, A. A. and ALBUQUERQUE, C. D. C. Production of bioemulsifiers by Yarrowia lipolytica in sea water using diesel oil as the carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 61-67, 2012.

SOUZA, M.C.; DOS SANTOS, L.S.; SOUSA, L.P et al. Biofilm formation and fibrinogen and fibronectin binding activities by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* invasive strains. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, n.6, p:1387-99, 2015.

SUBRAMANIAM, M.D.; VENKATESAN, D.; IYER, M.; et al. Biosurfactants and anti-inflammatory activity: A potential new approach towards COVID-19. **Curr Opin Environ Sci Health**, v.17, p:72-81, 2020.

SUN, W.; ZHU, B.; YANG, F.; DAI, M.; SEHAR, S.; PENG, C.; ALI, I.; NAZ, I. Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas sp*. CQ2 and its application for remediation of heavy metal contaminated soil. **Chemosphere**, v.265, p:129090, 2021.

TAO, W.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, H.; LI, S. Designer bioemulsifiers based on combinations of different polysaccharides with the novel emulsifying esterase AXE from *Bacillus subtilis* CICC 20034. **Microb Cell Fact**, v.18, n.1, p:173, 2019.

TATARA, A.M.; KONTOYIANNIS, D.P.; MIKOS, A.G. Drug delivery and tissue engineering to promote wound healing in the immunocompromised host: Current challenges and future directions. **Adv Drug Deliv Rev**, v.129, p:319-329, 2018.

TACCONELLI, E.; MAGRINI, N.; CARMELI, Y.; HARBARTH, S.; KAHLMETER, G.; KLUYTMANS, J.; MENDELSON, M.; PULCINI, C.; SINGH, N.; THEURETZBACHER,

U. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, **Discovery and Development of New Antibiotics**, 2021.

THAKUR, P.; SAINI, N.K.; THAKUR, V.K.; GUPTA, V.K.; SAINI, R.V.; SAINI, A.K. Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. **Microb Cell Fact**, v.20, n.1, p:1, 2021.

TOREN, A.; NAVON-VENEZIA, S.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Emulsifying activities of purified Alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. **Appl Environ Microbiol**, v.67, n.3, p:1102-6, 2001.

UMAR, A.; ZAFAR, A.; WALI, H.; SIDDIQUE, M.P.; QAZI, M.A.; NAEEM, A.H.; MALIK, Z.A.; AHMED, S. Low-cost production and application of lipopeptide for bioremediation and plant growth by *Bacillus subtilis* SNW3. **AMB Express**, v.11, n.1, p:165, 2021.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J.G.; ENNIS, C.J.; RAHMAN, P.K.S.M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Front Microbiol. Frontiers Media S.A.**, v.6, p: 245, 2015.

VAN BOGAERT, I.N.A.; et al. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochem**, v.46, p:821–833, 2011.

VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R.M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, v.25, n.3, p:289-97, 1997.

WANG, P.H.; HUANG, B.S.; HORNG, H.C.; YEH, C.C.; CHEN, Y.J. Wound healing. **J Chin Med Assoc**, v.81, n.2, p:94-101, 2018.

WANG, X.; XU, N.; LI, Q. et al. Lactonic sophorolipid–induced apoptosis in human HepG2 cells through the CASpase-3 pathway. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.105, p:2033–2042,2021.

WANG, Y.; TIAN, J.; SHI, F.; LI, X.; HU, Z.; CHU, J. Protective Effect of Surfactin against Copper Sulfate-induced Inflammation, Oxidative Stress and Hepatic Injury in Zebrafish. **Microbiol Immunol**, 2021.b Jun 7. doi: 10.1111/1348-0421.12924. Epub ahead of print. PMID: 34101233.

WU, S.; LIU, G.; ZHOU, S.; SHA, Z.; SUN, C. Characterization of Antifungal Lipopeptide Biosurfactants Produced by Marine *Bacterium Bacillus sp*. CS30. **Mar Drugs**, v.17, n.4, p:199, 2019.

WU, W.; WANG, J.; LIN, D.; CHEN, L.; XIE, X.; SHEN, X.; YANG, Q.; WU, Q.; YANG, J.; HE, J.; LIU, S. Super short membrane-active lipopeptides inhibiting the entry of *influenza A* virus. **Biochim Biophys Acta**, v.1848, n.10, p:2344-50, 2015.

XU, W.; LIU, H.; WANG, X.; YANG, Q. Surfactin Induces Maturation of Dendritic Cells in vitro. **Biosci Rep**, v.36, n.5, p: 387, 2016.

YAN, J.; BASSLER, B.L. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. **Cell Host Microbe**, v.26, n.1, p:15-21, 2019.

YAN, L.; LIU, G.; ZHAO, B.; PANG, B.; WU, W.; AI, C.; ZHAO, X.; WANG, X.; JIANG, C.; SHAO, D.; LIU, Q.; LI, M.; WANG, L.; SHI, J. Novel Biomedical Functions of Surfactin A from *Bacillus subtilis* in Wound Healing Promotion and Scar Inhibition. **J Agric Food Chem**, v.68, n.26, p:6987-6997, 2020.

YAMASAKI, R.; KAWANO, A.; YOSHIOKA, Y.; ARIYOSHI, W. Rhamnolipids and surfactin inhibit the growth or formation of oral bacterial biofilm. **BMC Microbiol**. v.20, n.1, p:358, 2020.

YIP, W.L. Influence of oxygen on wound healing. **Int Wound J**, v.12, n.6, p:620-4, 2015.

YUAN, L.; ZHANG, S.; WANG, Y.; LI, Y.; WANG, X.; YANG, Q. Surfactin Inhibits Membrane Fusion during Invasion of Epithelial Cells by Enveloped Viruses. **J Virol**, v.92, n.21, p:809-18, 2018.

ZAMBRY, N.S.; RUSLY, N.S.; AWANG, M.S.; MD NOH, N.A.; YAHYA, A.R.M. Production of lipopeptide biosurfactant in batch and fed-batch *Streptomyces sp*. PBD-410L cultures growing on palm oil. **Bioprocess Biosyst Eng**, v.44, n.7, p:1577-1592, 2021.

ZENG, L.; LIU, Y.; PAN, J.; LIU, X. Formulation and evaluation of norcanthridin nanoemulsions against the Plutella xylostella (Lepidotera: Plutellidae). **BMC Biotechnol**,v. 19, n. 1, p:16, 2019.

ZDARTA, A.; SMUŁEK, W.; TRZCIŃSKA, A.; CYBULSKI, Z.; KACZOREK, E. Properties and potential application of efficient biosurfactant produced by *Pseudomonas sp*. KZ1 strain. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng**, v.54, n.2,p:110-117, 2019.

ZHAO, F.; HAN, S.; ZHANG, Y. Comparative studies on the structural composition, surface/interface activity and application potential of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* using hydrophobic or hydrophilic substrates. **Bioresour Technol**, v.295, p:122269, 2020.

ZHAO, F.; YUAN, M.; LEI, L.; LI, C.; XU, X. Enhanced production of mono-rhamnolipid in Pseudomonas aeruginosa and application potential in agriculture and petroleum industry. **Bioresour Technol**,v. 323, p:124-605, 2021.

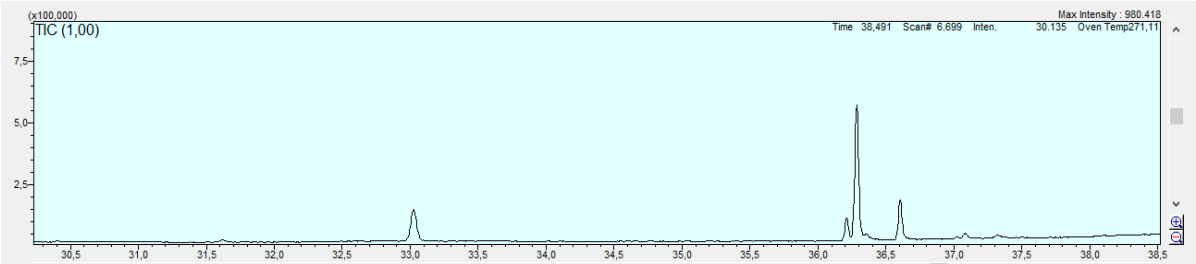
ZHOU, C.; WANG, F.; CHEN, H.; LI, M.; QIAO, F.; LIU, Z.; HOU, Y.; WU, C.; FAN, Y.; LIU, L.; WANG, S.; WANG, Y. Selective Antimicrobial Activities and Action Mechanism of Micelles Self-Assembled by Cationic Oligomeric Surfactants. **ACS Appl Mater Interfaces**, v.8, n.6, p:4242-9, 2016.

ZOUARI, R.; MOALLA-REKIK, D.; SAHNOUN, Z.; REBAI, T.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI-AYDI, D. Evaluation of dermal wound healing and in vitro antioxidant efficiency of Bacillus subtilis SPB1 biosurfactant. Biomed. **Pharmacother**, v.84, p:878–891, 2016.

ANEXOS

ANEXO A - Cromatografia Gasosa do bioemulsificante BE4CK bruto

1 Análise de ésteres metílicos dos ácidos graxos

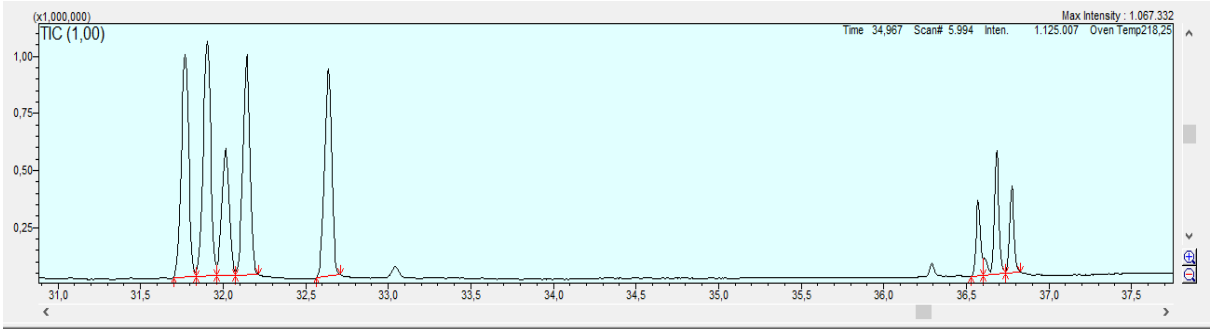


Peak#	Ret.Time	Start Tm	End Tm	m/z	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	33,025	32,965	33,090	TIC	368680	18,27	125734	13,44	2,93		Hexadecanoic acid, methyl ester
2	36,210	36,165	36,245	TIC	181290	8,99	89674	9,58	2,02		9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester
3	36,284	36,245	36,340	TIC	1126135	55,82	546772	58,43	2,06	V	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-
4	36,365	36,340	36,405	TIC	40022	1,98	17212	1,84	2,33	V	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-
5	36,604	36,560	36,660	TIC	301358	14,94	156453	16,72	1,93		Methyl stearate

Figura A1 e Tabela A1 – Resultado das análises de ácidos graxos expressos na forma de metil ésteres e as respectivas concentrações relativas.

2 Análise dos açúcares na forma de poliacetato alditóis

2.1 Cromatograma do padrão de 5 carboidratos



Peak#	Ret.Time	Start Tm	End Tm	m/z	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	31,770	31,700	31,835	TIC	3036446	18,73	976514	17,16	3,11		Ramnose
2	31,904	31,835	31,960	TIC	3283090	20,25	1029712	18,09	3,19	V	Ribose
3	32,015	31,960	32,075	TIC	1752709	10,81	556569	9,78	3,15	V	Fucose
4	32,144	32,075	32,215	TIC	2847691	17,56	965052	16,95	2,95	V	Arabinose
5	32,639	32,565	32,710	TIC	2798612	17,26	906838	15,93	3,09		Xilose
6	36,572	36,530	36,600	TIC	631505	3,89	332099	5,83	1,90		Manose
7	36,684	36,600	36,735	TIC	1157738	7,14	543662	9,55	2,13	V	Glicose
8	36,775	36,735	36,825	TIC	707188	4,36	381538	6,70	1,85	V	Galactose

Figura A2 e tabela A2 – cromatograma e composição relativa de um padrão constituido de 8 carboidratos na forma de poliacetato.

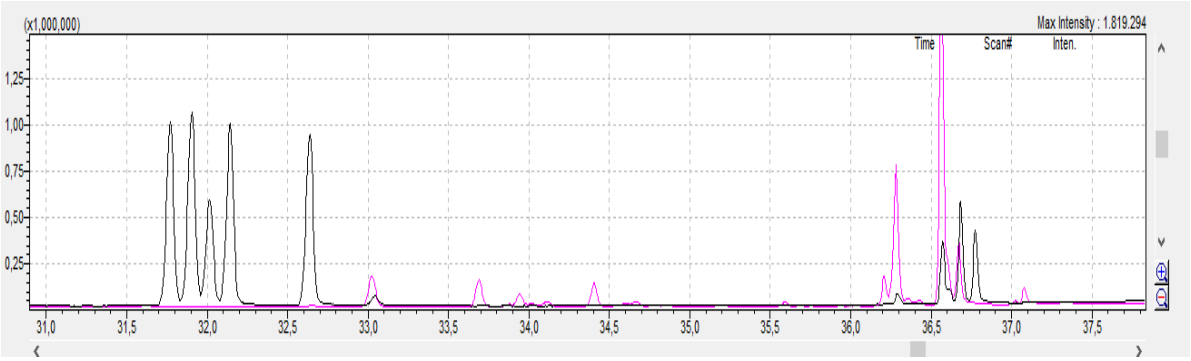
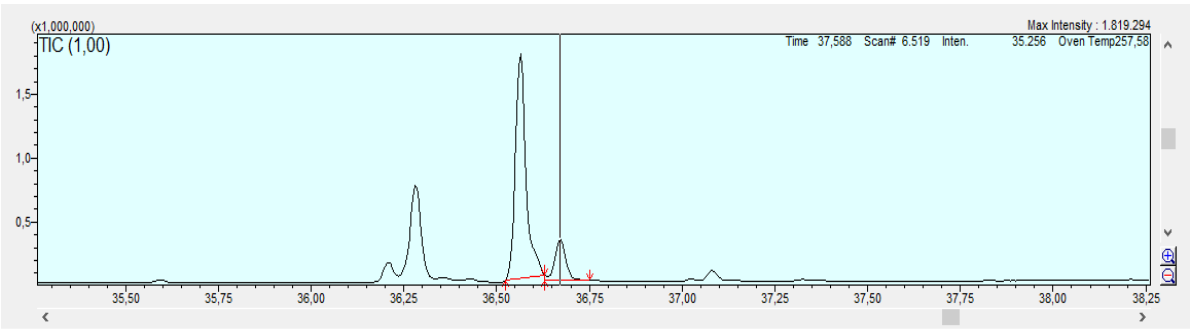


Figura A3 – padrão de carboidratos (linha preta) e amostra (linha rosa) revelando a maior quantidade de Manose e glicose em menor quantidade.



Peak#	Ret.Time	Start Tm	End Tm	m/z	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	36,564	36,525	36,630	TIC	3530974	84,25	1761391	84,26	2,00		Manose
2	36,672	36,630	36,750	TIC	660091	15,75	329122	15,74	2,01	MI	Glicose

Figura A4 - Quantidade de Manose e glicose da amostra BE4CK.

ANEXO B

CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO- ARTIGO I

antibiotics

an Open Access Journal by MDPI

Indexed in: PubMed | CITESCORE 5.5 | IMPACT FACTOR 4.8

CERTIFICATE OF PUBLICATION

Certificate of publication for the article titled:

Surface-Active Compounds Produced by Microorganisms: Promising Molecules for the Development of Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Healing Agents

Authored by:

Jéssica Araujo; Joveliane Monteiro; Douglas Silva; Amanda Alencar; Kariny Silva; Lara Coelho; Wallace Pacheco; Darlan Silva; Maria Silva; Luís Silva; Andrea Monteiro

Published in:

Antibiotics **2022**, Volume 11, Issue 8, 1106

MDPI Academic Open Access Publishing since 1996

Basel, October 2023

antibiotics

MDPI

Review

Surface-Active Compounds Produced by Microorganisms: Promising Molecules for the Development of Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Healing Agents

Jéssica Araujo [1,2,†], Joveliane Monteiro [1,2,†], Douglas Silva [2], Amanda Alencar [2], Kariny Silva [2], Lara Coelho [2], Wallace Pacheco [2], Darlan Silva [3], Maria Silva [3], Luís Silva [1,4] and Andrea Monteiro [1,2,*]

1 Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, BIONORTE, São Luis 65055-310, MA, Brazil
2 Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade CEUMA, São Luis 65075-120, MA, Brazil
3 Laboratório de Ciências do Ambiente, Universidade CEUMA, São Luis 65075-120, MA, Brazil
4 Laboratório de Patogenicidade Microbiana, Universidade CEUMA, São Luis 65075-120, MA, Brazil
* Correspondence: andreasmont@gmail.com
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Surface-active compounds (SACs), biomolecules produced by bacteria, yeasts, and filamentous fungi, have interesting properties, such as the ability to interact with surfaces as well as hydrophobic or hydrophilic interfaces. Because of their advantages over other compounds, such as biodegradability, low toxicity, antimicrobial, and healing properties, SACs are attractive targets for research in various applications in medicine. As a result, a growing number of properties related to SAC production have been the subject of scientific research during the past decade, searching for potential future applications in biomedical, pharmaceutical, and therapeutic fields. This review aims to provide a comprehensive understanding of the potential of biosurfactants and emulsifiers as antimicrobials, modulators of virulence factors, anticancer agents, and wound healing agents in the field of biotechnology and biomedicine, to meet the increasing demand for safer medical and pharmacological therapies.

Keywords: surface-active compounds; biosurfactants; bioemulsifier; biological properties; biotechnology

check for updates

Citation: Araujo, J.; Monteiro, J.; Silva, D.; Alencar, A.; Silva, K.; Coelho, L.; Pacheco, W.; Silva, D.; Silva, M.; Silva, L.; et al. Surface-Active Compounds Produced by Microorganisms: Promising Molecules for the Development of Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Healing Agents. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1106. https://doi.org/10.3390/antibiotics11081106

Academic Editor: Carlos M. Franco

Received: 3 July 2022
Accepted: 2 August 2022
Published: 16 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Microorganisms can produce several surface-active compounds (SACs) with hydrophilic and hydrophobic moieties. These structural features allow them to interact with the surface and interfacial tensions, form micelles, and emulsify immiscible substances [1,2].

Biosurfactants (BSs) and bioemulsifiers (BEs) are considered SACs because of their ability to interfere and with modifying surfaces. Because these biomolecules are amphiphilic and are produced by different microorganisms, they have different physicochemical properties and physiological roles, which contribute to their specific functions in nature and biotechnological applications [3].

Recently, the production of SACs has received extensive attention because of their diverse applications, such as dissolving water-insoluble compounds, heavy metal binding, contaminant desorption, inhibiting bacterial pathogenesis, adhesion, and cell aggregation [4–8]. In addition, SACs also have several advantages over synthetic surfactants, such as low toxicity, lower critical micelle concentration (CMC), higher biodegradability, and ecological acceptability [9].

Moreover, these compounds exhibit antibacterial [5,10], antifungal [11], antiviral [12], and antitumor activities [13]. Their antiadhesive properties and antibiofilm activities are also important in inhibiting the adhesion and colonization of pathogenic microorganisms and removing preformed biofilms on silicone discs and other biomedical instruments [14].

The present use of these biomolecules has aroused interest from several sectors because of their numerous functions and sustainable properties, allowing various applications in

petroleum, food, medicine, pharmaceuticals, chemicals, pulp and paper, textiles, and cosmetics. Furthermore, because of their application in soil bioremediation, they are considered the "green molecules" of the 21st century [15].

2. Surface-Active Compounds

2.1. Biosurfactants

Biosurfactants (BSs), which are low molecular weight microbial compounds, are synthesized extracellularly or linked to the cell membrane of bacteria [16], yeasts [17], and filamentous fungi [18]. Produced under various extreme environmental conditions, their chemical compositions depend on the microorganism that produces them, raw materials, and process conditions [6].

Surfactants are amphiphilic molecules with a hydrophobic moiety comprising a hydrocarbon chain with saturated or unsaturated and hydroxylated fatty alcohols or fatty acids, and a hydrophilic moiety comprising hydroxyl, phosphate, or carboxyl groups, or carbohydrates (such as mono-, oligo-, or polysaccharides) or peptide fractions [3,19]. Depending on their biochemical nature, these compounds are classified as glycolipids, lipopeptides, lipoproteins or fatty acids, and phospholipid polymers, with glycolipids and lipopeptides being the most abundant [20,21].

Glycolipids consist of mono- or oligosaccharides and lipids, where different sugars (glucose, mannose, galactose, glucuronic acid, or rhamnose) link to form saturated or unsaturated fatty acids, hydroxylated fatty acids, or fatty alcohols. The most studied groups include sophorolipids (SLs), mannosylerythritol lipids, trehalolipids, and rhamnolipids (RLs) [22,23], which are usually produced by the yeast *Starmerella bombicola* [24], *Pseudozyma* sp. [25,26] *Rhodococcus erythropolis* [27] and *Pseudomonas aeruginosa* [28], respectively.

On the other hand, lipopeptides (LP) consist of cyclopeptides with amino acids linked to fatty acids of different chain lengths [29]. The most common among these are surfactin, iturin, and fengycin [29–31] which are produced by different microorganisms, such as the genera *Bacillus* [32], in turn, other lipopeptides have been detected in *Bacillus amyloliquefaciens* [33], *Streptomyces* sp. [34], *Pseudomonas guguanensis* [35], and *Serratia marcescens* [36].

Microorganisms that produce BS inhabit water (fresh, underground, and sea) and land (soil, sediments, and mangroves) and can grow in extreme environments (oil reservoirs) and under different temperatures, pH values, and salinity levels [37–39].

These microorganisms are generally heterotrophs that need carbon, nitrogen, minerals, vitamins, growth factors, and water to grow and produce metabolites. In general, carbon sources (carbohydrates, oils, and fats) and hydrocarbon groups are often consumed during BS production. For example, glucose, a carbon source easily metabolized by microorganisms through glycolysis to generate energy, is commonly reported as a factor in producing higher yields [37,40].

Because of their amphipathic nature, BSs can mix immiscible fluids, reduce surface and interfacial tensions, and promote solubility of polar compounds in nonpolar solvents [41] that help exhibit numerous properties, such as foaming, dispersion, wetting, emulsification, demulsification, and coating, making them suitable for physicochemical and biological remediation technologies of organic and metallic contaminants [42].

Biosurfactants due to their physicochemical properties have industrial applications in pharmaceuticals, textile processing, agriculture, cosmetics, personal care, and the food industry, as well as environmental applications in soil remediation, hydrocarbon degradation, and oil recovery [43–45].

Several BSs have antibacterial, antifungal, antiviral, or antitumor properties, making them potential alternatives to conventional therapeutics in many biomedical applications [45,46].

Despite their versatility and efficiency in terms of applicability in different fields, their production has always been a challenge because of inefficient bioprocessing and high costs due to the expensive substrates used [33]. Therefore, optimizing strategies

on cost efficiency and high-yield bioprocessing is critical for low-cost production and mass commercialization.

2.2. *Bioemulsifier (BE)*

Unlike BSs, bioemulsifiers (BEs) have high molecular weight and can emulsify, even at low concentrations, two immiscible liquids, while not reducing surface or interfacial tension [47]. These comprise complex mixtures of heteropolysaccharides, lipopolysaccharides, proteins, glycoproteins, or lipoproteins, which guarantee better emulsification potential and emulsion stabilization [3,48,49].

Bioemulsifiers, which are synthesized by bacteria, yeasts, and filamentous fungi, can be isolated from contaminated soil, mangroves, seawater, freshwater, and human skin [50–53]. The most studied polymeric BEs include emulsan, alasan, liposan, mannoprotein, and other polysaccharide-protein complexes. Members of the genus *Acinetobacter* sp. are commonly reported to produce BEs [15].

Despite numerous reports on the production of BEs and BSs by different bacteria, the genus *Acinetobacter* spp. received special attention because it is the first known producer of BEs, with emulsan, biodispersan, and alasan as the best examples of BEs commercially produced by the genus. These BEs are mainly used in microbial oil recovery and the biodegradation of toxic compounds [15].

Compared with synthetic surfactants, BEs have many advantages as they are eco-friendly, biocompatible, less toxic with higher biodegradability, and active at extreme temperatures, pH values, and salinity levels. Furthermore, BEs can be produced from low-cost renewable substrates, such as industrial waste, vegetable oils, and hydrocarbons [53].

Various carbon sources are used in BE production, such as ethanol, n-hexadecane, crude oil, glucose, lactic acid, methylnaphthalene, peptone, n-heptadecane, edible oil, olive oil, glycerol, and C-heavy oil [54]. Conventionally, microbial production of BE is still expensive, with the use of synthetic sources as one of the factors contributing most to the high costs. One promising strategy to make the cost economically viable is to include renewable sources from agro-industrial residues and by-products. In this sense, previous research had explored several alternative low-cost substrates, such as residual soybean oil from frying and corn steep liquor, as alternatives to synthetic sources of carbon and nitrogen [53].

Despite their potential advantages, several obstacles hinder practical BE applications, including low yields and high purification costs. To address these issues, researchers have been striving to develop more cost-efficient BEs, which can be used at low concentrations [55].

Bioemulsifiers can form very stable emulsions and dispersions that do not mix, remain attached to the droplet interfaces, and can re-emulsify by adding or replacing a new solvent without diluting. Because of these advantages, BEs are preferred over BSs in the cosmetics and food industries [48].

Because of diverse functions, such as emulsification, wetting, foaming, cleaning, phase separation, surface activity, and hydrocarbon viscosity reduction, BEs are best suited for bioremediation, enhanced oil recovery, cleaning of pipe and vessels contaminated with oil, and more. In addition, emulsifiers are widely used in the food and drug industry [56].

2.3. *Microorganisms Producing SACS*

For many years, researchers have tirelessly searched for microorganisms that have the potential to produce secondary metabolites with surfactant or emulsifying properties. The amount of BS or BE produced depends on the type of microorganisms and their sources (Table 1).

Table 1. Lists some microorganisms that produce surface-active compounds.

Microorganism	Biosurfactant/Bioemulsifier	Reference
Acinetobacter calcoaceticus RAG-1	Emulsan	[57]
Acinetobacter radioresistant KA53	Alasan	[58]
Acinetobacter junii B6	Surfactin/fengycin	[59]
Acinetobacter junii BD	Rhamnolipids	[60]
Acinetobacter calcoaceticus A2	Biodispersan	[61]
Bacillus nealsonii strain S2MT	Surfactin	[2]
Bacillus subtilis 3NA	Surfactin	[62]
Bacillus thailandensis E264	Rhamnolipids	[63]
Bacillus velezensis	Iturin, surfactin, and fengycin	[64]
Candida kerosenea GBME-IAUF-2	Sophorolipids	[65]
Candida lipolytica UCP 0988	Rufisan	[66]
Lactobacillus sp.	Surfactin, iturin, and lichenysin	[67]
Pseudomonas aeruginosa SG	Rhamnolipids	[68]
Pseudomonas fluorescens SBW25	Viscosine	[69]
Pseudomonas sp. S2WE	Rhamnolipids	[70]
Serratia sp. ZS6 strain	Serrawettina	[71]
Yarrowia lipolytica IMUFRJ50682	Yansan	[72]
Trichosporon mycotoxinivorans CLA2	Lipid-polysaccharide complex	[73]

3. Biological Properties

3.1. Antimicrobial Activities

The discovery of antibiotics in the last century can be considered a major advancement in medicine because the use of these antimicrobial agents significantly reduced morbidity and mortality associated with microbial infections. Antibacterial and antifungal factors reduce and eliminate the viability and growth of microbial populations through several mechanisms: (i) disruption of extracellular membranes and/or their cell wall, (ii) inhibition of gene expression, (iii) DNA damage, or (iv) manipulation of important metabolic pathways [74].

Bacteria become resistant to antimicrobial agents in several ways: through horizontal gene transfer between genetic elements of different strains and the environment that confer resistance and through mutations that interfere with basic cell functions in addition to conferring resistance to microorganisms [75,76].

The most resistant bacteria associated with serious hospital infections include *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, P. aeruginosa*, and *Enterobacter* sp., which often result in high mortality rates [77]. Furthermore, other microorganisms such as *Candida* spp. can also be considered a global health threat because of their resistance to antimicrobial agents [78–80].

The increasing rates of antimicrobial resistance and the emergence of new microbial pathogens reinforce the need to find new antimicrobial compounds to fight microbial infections. Among these new strategies, SACs have promising antibiotic and disinfectant potential, as well as antibiotic delivery properties due to their physicochemical properties. Most of these biomolecules can break the outer and inner membranes of pathogens, thereby exploiting their charge and hydrophobicity. The advantages of using SACs as antimicrobials include their broad-spectrum bactericidal action and the absence of pathogen resistance mechanisms [81].

Cationic surfactants comprise the largest class of synthetic surfactants with antimicrobial properties because of their broad spectrum of biostatic and biocidal activities against planktonic pathogens. The hydrophobic chain of cationic surfactants penetrates the microbial cell membrane and interferes with membrane continuity and metabolic processes, leading to cell death [82]. Despite exhibiting antimicrobial efficiency mainly against Gram-positive bacteria (29–32 mm), such as *S. aureus* and *Bacillus subtilis*, these compounds are less biodegradable than natural surfactants [83].

Previous studies reported the antimicrobial efficacy of glycolipid SACs produced by microorganisms. For example, RLs produced by *P. aeruginosa* significantly inhibited the growth of *S. mutans* UA159 and *S. sanguinis* ATCC10556. Furthermore, they completely inhibited the growth of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 at high concentrations [7].

Similarly, the synergistic action of two RL BSs produced by *P. aeruginosa* C2 and *Bacillus stratosphericus* A15 demonstrated bactericidal activity by rupturing the membrane of gram-positive and gram-negative bacteria, such as *S. aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* K8813 [84]. Because of these actions, the membrane disintegrates, leading to penetration into the cell wall and plasma membrane through the formation of pores, followed by leakage of internal cytoplasmic materials, leading to cell death [85].

A previous study demonstrated that the synergism between essential oils of oregano, cinnamon tree, and lavender with RLs produced by *P. aeruginosa* increased the antimicrobial effect against *Candida albicans* and *S. aureus* which are resistant to methicillin [86], revealing that SAC activity can be enhanced when they establish a synergistic relationship with other compounds. In addition to RLs, SLs are also easily extracted and are usually produced by *Candida* spp. yeast [87] either in the lactone form or the acid form or as a mixture of both forms [88,89].

A previous study showed that SL produced by *C. albicans* SC5314 and *Candida glabrata* CBS138 showed antibacterial properties against pathogenic bacteria *Bacillus subtilis* and *E. coli* [10]. Besides its antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, this class of BS also exhibited promising antifungal activity against pathogenic fungi including *Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium verticillioides, Fusarium oxysporum, Corynespora cassiicola*, and *Trichophyton rubrum* [90].

The antimicrobial activity of SACs glycolipids was found to be dependent on the type of glycolipid and the interaction with the cell membrane. Diaz de Renzo et al. [63] demonstrated that RLs inhibit bacterial growth in the exponential phase while SLs inhibit growth between the exponential and stationary phases.

The antimicrobial potential of lipopeptide SACs has also been recognized; these biomolecules correspond to the most important components of metabolites that are synthesized by many species of the genus *Bacillus* spp., which characterize the strains of this genus as important parts of plant disease control and food safety [91–93].

Antimicrobial lipopeptides, such as iturin, fengycin, and surfactin, have been identified in *Bacillus velezensis* HC6. Surfactin exhibited strong antibacterial effects against *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*, while fengycin and iturin inhibited the growth of pathogenic fungi *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus, Aspergillus sulphureus, Fusarium graminearum*, and *Fusarium oxysporum* [94]. Researchers also found that when *B. velezensis* HC6 is applied to corn, it reduced the levels of aflatoxin and ochratoxin produced by fungi.

Ohadi et al. [95] demonstrated that lipopeptides produced by *Acinetobacter junii* displayed nonselective activity against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. The data showed that this bioproduct had effective antibacterial activity at concentrations almost below the CMC and that the minimal inhibitory concentration (MIC) values were lower than the standard antifungal activity, exhibiting almost 100% inhibition against *Candida utilis*.

Other broad classes of bacterial metabolites with surface-active potential and antimicrobial effects include glycoproteins, peptides, and fatty acids. *Lactobacillus* spp. produced a bioactive glycolipoprotein surfactant with antimicrobial activity against *C. albicans* using sugarcane molasses as substrate, and some pathogenic gram-positive and gram-negative bacteria [96]. A cyclic heptapeptide containing a fatty acid moiety produced by *Bacillus subtilis*, called bacaucin 1, exhibited specific antibacterial activity against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) by disrupting the membrane without detectable toxicity to mammalian cells or induction of bacterial resistance. In addition, this peptide was found to be efficient in preventing infections in both in vitro and in vivo models [97].

Finally, some microorganisms excrete mixtures of bioactive compounds with surface-reducing ability and emulsifying potential. For example, the actinomycete strains of *Strep-*

tomyces griseoplanus NRRL-ISP5009 produced a BS component that is a complex mixture of proteins, carbohydrates, and lipids that have antimicrobial activity against gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis, S. aureus*) and pathogenic fungi (*C. albicans* and *Aspergillus fumigatus*). However, it is only moderately active against Gram-negative bacteria *E. coli* and *Salmonella typhimurium* [37].

3.2. Antiviral Activity

Viruses represent a serious threat to human health at a global level. Previous studies have described secondary metabolites with surface-active properties for their antiviral properties against a variety of viruses. Antiviral activity by SACs was shown to be effective against various viruses, enveloped and nonenveloped (Table 2).

Table 2. Antiviral properties of SACS.

Biosurfactant/ Bioemulsifier	Microorganism	Antiviral Activity	Virus	Reference
Surfactin	*Bacillus subtilis*	Rupturing the viral lipid membrane and part of the capsid	Semliki Forest virus Simplex virus (HSV-1, HSV-2) Suid herpesvirus (SHV-1)	[98]
		Inhibited the proliferation	Simian immunodeficiency (SIV) Feline calicivirus (FCV) Coronaviruses: Epidemic porcine diarrhea (PEDV) Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)	[99]
Lipopeptides	-	Inhibited the membrane fusion between the virus and host cells.	Influenza A (H1N1) Human Coronavirus SARS-CoV-2	[100] [101–103]
Sophorolipids	*Candida bombicola*	Virucidal property	Human Immunodeficiency Virus (HIV)	[104,105]
Rhamnolipids	*Pseudomonas* spp.	Inhibits the cytopathic effect	Simplex virus: HSV-1, and HSV-2;	[106]
	Pseudomonas gessardii M15	Inhibited the proliferation	Simplex vírus: HSV-1 and HSV-2, Human coronavírus: HCoV-229E and SARS-CoV-2	[12]

Viral infections represent one of the main causes of human and animal morbidity and mortality that lead to significant healthcare costs [107]. Therefore, secondary metabolites with surface-active properties should be considered promising substances for the development of antiviral compounds.

3.3. Anti-Inflammatory Activity

Inflammatory responses represent a crucial aspect of a tissue's response to certain injuries, chemical irritation, or microbial infections. This complex response involves leukocyte cells, macrophages, neutrophils, and lymphocytes. In response to inflammation, these cells release specialized substances, including amines and vasoactive peptides, eicosanoids, pro-inflammatory cytokines, and acute-phase proteins, which mediate the inflammatory process and prevent additional tissue damage [108].

Currently, studies on SACs are looking into their potential as anti-inflammatory drugs. For example, a recent in vivo study showed that surfactin inhibited the pro-inflammatory

response in *Zebrafish larvae* (*Danio rerio*), significantly reducing the expression of interleukin (IL)-1β, IL-8, tumor necrosis factor-α (TNF-α), nitric oxide (NO), nuclear factor kappa-β p65 (NF-κBp65), cyclooxygenase-2 (COX-2), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and increasing the expression of IL-10. Furthermore, the study showed that surfactin reduced neutrophil migration and alleviated liver damage [109].

Other studies showed that surfactin systematically induced CD4 + CD25 + FoxP3 + Tregs in the spleen of mice, which inhibit T cells from producing pro-inflammatory cytokines such as TNF-α and interferon (IFN)-γ. Moreover, surfactin attenuation of chronic inflammation increased IL-10 expression in atherosclerotic lesions of the aorta of mice, demonstrating that BSs can restore the balance in the Th1/Th2 response in mice [110], as well as induce the maturation of dendritic cells (DCs) and increase the expression of MHC-II molecules and other costimulatory factors [111].

Few anti-inflammatory properties related to glycolipid BSs have been reported. Sophorolipids produced by *C. bombicola* reduced lipopolysaccharide-induced expression of TNF-α, COX-2, and IL-6 in RAW 264.7 cells [112], and reduced the level of immunoglobulin E (IgE), TLR-2, IL-6, and STAT3 mRNA expression [113].

In previous in vivo models, SLs reduced sepsis-related mortality and exhibited anti-inflammatory effects in mice by inhibiting nitric oxide and inflammatory cytokine production [114,115]. On the other hand, the glycolipid complex had no significant effect on the proliferative effect of peripheral blood leukocytes because it activated the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1β and TNF-α) without affecting the IL-6 production in vitro in the monocyte fraction [116].

3.4. Anticancer Activity

Cancer is considered a multistage disease, the etiology of which is associated with high incidence and mortality rates globally. Chemotherapy drugs, surgery, and radiation remain the most common treatments to fight the disease in humans. However, they are all associated with serious adverse effects, indicating the lack of specificity and the need to discover new antitumor agents to improve the effectiveness of conventional chemotherapy drugs while reducing the adverse effects [74].

For these purposes, several studies have demonstrated the antitumor potential of several SACs (Table 3). Biosurfactants have been proposed as suitable drug candidates for many diseases including cancer [117]. Given their wide applications, the interest in exploring their role in promoting human health continues to grow.

Table 3. Anticancer activity of SACS against cancer cells.

Biosurfactant/ Bioemulsifier	Microorganism	Anticancer Activity	Cancer	Reference
Rhamnolipids: monorhamnolipid and dirhamnolipid	*P. aeruginosa* MR01	Inhibiting cell division at lower concentrations	Human breast cancer MCF-7	[118]
Sophorolipids	*Wickerhamiella domercqiae* Y2A	Increased the apoptosis	HepG2 liver cancer cells	[109]
		Cytotoxicity	Breast cancer MDA-MB-231	[119]
		Inhibited cell proliferation	Liver Lung Leukemia	[120]
Surfactin		Reduced tumor growth and weight; Apoptosis; Elevated levels of immune-boosting mediators	Melanoma skin cancer	[13]
	Bacillus saphensis	Cytotoxic activity against cancer cell lines	Breast cancer Melanoma	[46]
Iturin	*Bacillus megaterium*	Inhibited the growth of cancer cells	Breast cancer	[121]

3.5. Antibiofilm Activity

Biofilms comprise microbial communities attached to the surface and embedded in an extracellular matrix composed of extracellular polymeric substances (EPS) secreted by cells that reside within them. In general, EPS is a mixture of polysaccharides, proteins, extracellular DNA (eDNA), and other smaller components. The biofilm matrix constituents' physical and chemical properties enable the matrix to protect resident cells from desiccation, chemical disturbance, invasion by other bacteria, and death from predators. However, biofilms often cause major medical problems and are the cause of chronic infections because biofilm communities can house bacteria that are tolerant and persistent against antibiotic treatment and are more resistant to antibiotics compared with planktonic bacteria [9,122].

Because of their composition, biofilms cause a wide range of chronic diseases due to the emergence of antibiotic-resistant bacteria that have become difficult to treat effectively. To date, available antibiotics are ineffective in treating these biofilm-related infections because of their higher MIC and minimal bactericidal concentration values, which may lead to in vivo toxicity. Therefore, designing or tracking antibiofilm molecules that can effectively minimize and eradicate biofilm-related infections is important [123].

Because of their antimicrobial, antiadhesive, and antibiofilm properties, SACs can be used to neutralize biofilm formation and the emergence of drug-resistant microorganisms [14]. These biomolecules tend to interact with antimicrobials [124,125], which are usually less effective against biofilms in general and multispecies biofilms associated with extremely complicated polymicrobial infections.

A mixture of lipopeptides (surfactin, iturin, and fengycin), which are synthesized by *B. subtilis*, prevented biofilm formation by inhibiting cell adhesion of *Trichosporon* spp. by up to 96.89% and dispersed mature biofilms (up to 99.2%), reducing their thickness and cell viability. This mixture reduced cell ergosterol content and altered the membrane permeability and surface hydrophobicity of planktonic cells [126].

Another mixture of lipopeptides (surfactin, iturin, and lichenysin) was identified for the first time in *Lactobacillus* spp. vaginal exhibited strong antiadhesive activity (up to 74.4%) against the biofilm producer *C. albicans* [67]. Mixed lipopeptides (iturin, fengycin, and surfactin) with higher surfactin content produced by *B. subtilis* TIM10 and *B. vallismortis* TIM68 inhibited the biofilm formation of *Malassezia* spp., especially TIM10, by about 90% [127].

Meanwhile, surfactin-type BS produced by *B. subtilis* reduced adhesion and stopped the formation of *S. aureus* biofilm on glass, polystyrene, and stainless-steel surfaces. Surfactin significantly decreased biofilm percentage and reduced *icaA* and *icaD* expressions, which are important for staphylococcal biofilm structure. Furthermore, lipopeptides have been shown to affect the quorum sensing (QS) system in *S. aureus* by regulating the autoinducer 2 activity [94].

In terms of the antibiofilm activity of glycolipids, Allegrone et al. [128] reported the effects of different types of RLs. They demonstrated that RL produced by *P. aeruginosa* 89 (R89BS) was 91.4% pure and comprised 70.6% of monorhamnolipids and 20.8% of dirhamnolipids. The pure extract R89BS inhibited S. aureus adhesion (97%) and biofilm formation (85%). Furthermore, purified monorhamnolipids (mR89BS) have been observed to induce dispersion of preformed biofilms at all concentrations (0.06–2 mg/mL) by 80–99%, unlike the pure extract R89BS and purified dirhamnolipids (dR89BS), which depended on the tested concentration.

Ceresa et al. [5] demonstrated that R89BS-coated silicone elastomeric disks significantly neutralized *Staphylococcus* spp. biofilm formation in terms of accumulated biomass (up to 60% inhibition in 72 h) and cellular metabolic activity (up to 68% inhibition in 72 h). The results suggested that RL coatings may be an effective antibiofilm treatment procedure and represent a promising strategy for preventing infections associated with implantable medical devices.

Shen et al. [129] demonstrated that besides inhibiting the formation of new biofilms, RLs were superior in eradicating mature biofilms formed by *Helicobacter pylori*, *E. coli*,

and *Streptococcus mutans* in a dose-dependent manner, compared with other antibacterial agents even at concentrations below minimum inhibitory concentrations (MICs). They can enhance the effect of antimicrobial agents. Sidrim et al. [130] observed that these molecules significantly increased the activity of meropenem and amoxicillin-clavulanate against mature *Burkholderia pseudomallei* biofilms.

Rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* SS14 also inhibited planktonic cells of filamentous fungi of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. The formation and rupture of mature biofilms were dose-dependent, with the highest activity observed at concentrations of 2 × MIC against both pathogens [131].

Like RLs, SLs exhibited an effective inhibitory activity against biofilm formation. Ceresa et al. [132] obtained three different SL products: SLA (acid congeners), SL18 (lactonic congeners), and SLV (mixture of acid and lactone congeners), which all showed an inhibitory effect of 70%, 75%, and 80% for *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *C. albicans*, respectively. Using 0.8% *w/v* SLA on pre-coated medical silicone disks reduced *S. aureus* biofilm formation by 75%. In co-incubation experiments, 0.05% *w/v* SLA significantly inhibited *S. aureus* and *C. albicans* from forming biofilms and adhering to surfaces by 90–95% at concentrations between 0.025 and 0.1% *w/v*.

Antibiofilm activities were also demonstrated for BSs produced by probiotics of the genus Bacillus sp. that were isolated from cervicovaginal samples. This bioproduct, called BioSa3, was highly effective in the formation of biofilms of different pathogenic and multidrug-resistant strains, such as *S. aureus* and *Staphylococcus haemolyticus*. The anti-biofilm effect may be related to the ability of BioSa3 to alter the membrane physiology of the tested pathogens to cause a significant decrease in surface hydrophobicity [133].

Thus, SACs are good candidates for the emergence of new therapies to better control multidrug-resistant microorganisms and inhibit infections associated with biofilms, protecting surfaces from microbial contamination.

3.6. Wound Healing

Wound healing is an important but complicated process of tissue repair in humans or animals, comprising a multifaceted process organized by sequential and overlapping phases, including hemostasis, inflammation phase, proliferation phase, and remodeling phase [134,135]. Failure of one of these phases caused by a deregulated immune response or insufficient oxygenation impairs the healing process, leading to ulcerative skin defect (chronic wound) or excessive scar tissue formation (hypertrophic or keloid scarring) [136,137].

Treating wounds of different etiologies constitutes an important part of the total health budget, mostly affected by three important cost drivers: curing time, frequency of dressing change, and complications. Moreover, chronic wound infection, one of the leading causes of nonhealing, contributes significantly to rising healthcare costs. Although the treatment of an uncomplicated surgical incision is relatively inexpensive, the costs can increase significantly when infections occur [138].

Biofilms, commonly found in chronic wounds, contribute to infections, causing slower healing. Infections in chronic wounds are usually caused by multiple species [139], with *P. aeruginosa* and *S. aureus* being the most common. Although most microbial communities usually form on the wound's outer layer, some biofilms are also embedded in deeper layers, such as *P. aeruginosa* biofilms, which are difficult to diagnose via traditional wound smear culture [140,141]. Moreover, antibiotic resistance of bacteria in biofilms is a crucial problem in the management and treatment of chronic wounds [139].

For these reasons, physicians and the scientific community consider the management and treatment of wounds, as well as biofilm prevention, a top priority. In this context, SACs recently emerged as promising agents that promote wound healing with low irritation and high compatibility with human skin [14]. Furthermore, these bioproducts promote fibroblast and epithelial cell proliferation, faster re-epithelialization, and collagen deposition, leading to a faster healing process [142,143].

Surfactin A from *B. subtilis* promotes wound healing and scar inhibition. During the healing process, it up-regulates the expression of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and vascular endothelial growth factor, accelerates keratinocyte migration via mitogen-activated protein kinase (MAPK), and factor nuclear-κB (NF-κB) signaling pathways and also regulates pro-inflammatory cytokine secretion and macrophage phenotypic exchange. Furthermore, surfactin A inhibits scar tissue formation by influencing α-smooth muscle actin (α-SMA) and transforming growth factor (TGF-β) expression [144]. Therefore, the healing potency of the lipopeptides *B. subtilis* SPB1 is due to their antioxidant activity potential revealed in vitro [143].

A previously unknown lipopeptide 78 (LP78) from *S. epidermidis* inhibited TLR3-mediated skin inflammation and promoted wound healing. The skin lesion activated TLR3/NF-κB, promoting p65 and PPARγ interaction in the nuclei and initiating the inflammatory response in keratinocytes. Next, LP78 activated the TLR2-SRC, inducing β-catenin phosphorylation in Tyr. Phospho-β-catenin is translocated into the nuclei to bind to PPARγ, thereby interrupting the p65 and PPARγ interaction. Dissociation between p65 and PPARγ reduced TLR3-induced inflammatory cytokine expression in skin wounds of normal and diabetic mice, which correlated with faster wound healing [145].

As an alternative to improve this healing process, the formulation of nanolipopeptide biosurfactant (NLPB) from the lipopeptide biosurfactant (LPB) produced by *Acinetobacter junii* was reported as promising for performing healing activity. The percentage of wound closure of mice treated with NLPB hydrogels at 2 mg/mL was approximately 80% on day 7 and 100% on day 15. The NLPB hydrogel formulation showed better efficacy in wound closure and healing when compared to the control [146].

A BS of glycolipid nature, which was synthesized by *Bacillus licheniformis* SV1, showed good cytocompatibility and increased 3T3/NIH fibroblasts proliferation in vitro. A previous study showed that the application of BS ointment in a skin excision wound in rats promoted re-epithelialization, fibroblast cell proliferation, and faster collagen deposition, demonstrating its potential transdermal properties to improve skin wound healing [147].

A previous study administered an RL-containing ointment (5 g/L) on the back of Wistar mice after creating an excision wound. Histopathological results revealed a significant healing effect of RL, demonstrating increased wound closure, improved collagenases, and reduced inflammation (decreasing the level of TNF-α) without inducing skin irritation [84]. Dirhamnolipid treatment has been suggested for cutaneous scar therapy, demonstrating an antifibrotic function in rabbit ear hypertrophic scar models with a significant reduction in the scar elevation index, type I collagen fibers, and α-SMA expression [148].

A cell culture model has demonstrated the wound healing capacity of SLs by using an in vitro human dermal fibroblast model as a substitute for human skin, revealing that SLs affected the ability of human skin fibroblasts to express collagen I mRNA (Col-I) and elastase inhibition (IC_{50} = 38.5 μg/mL) [112]. In addition, Kwak et al. (2021), using an in vitro wound healing assay in human colorectal adenocarcinoma (HT-29) cell line, showed a significantly increased collagenase-1 expression ($p < 0.05$) 48 h after SL treatment. Moreover, all SL dosages significantly increased occludin and matrilysin-1 (MMP-7) expression [149].

3.7. Other Considerations

We also consider that there are SACs molecules obtained by chemical synthesis processes, such as ultrashort synthetic surface active (USSA) [150,151]. Some of these can be synthesized as C-terminal amides on Rink amide (4-Methylbenzhydrylamine (MBHA) resin using 9-fluorenylmethoxycarbonyl/t-butylcarbamate [151]. The fundamental difference of the USSA, as lipopeptoids (modified SAC) in relation to the natural ones, is their immunomodulatory capacity. As seen in mouse infection models, they reduce the exacerbation of the disease, even if not presenting direct antibacterial activity [151]. This characteristic would be a limiting activity, since many natural ones lead to a disturbance of biological membranes, with antifungal and antibacterial actions [151].

New possibilities can be obtained for the SACs, as transformation systems applying recombinant plasmids have been employed to substantially increase the productivity of microbial biosurfactants, e.g., the engineered strain *Pseudozyma* sp. SY16, which increases the production of mannosylerythritol lipids (MELs) by up to 31.5%, suggesting that genetic engineering can improve the industrial application of yeast [152].

4. Conclusions

The BS and BE surface-active compounds have drawn the attention of the scientific community as a new generation of products with high potential in the biomedical and pharmaceutical fields. Their use, whether alone or in combination with other antimicrobial or chemotherapeutic agents, opens paths for new strategies to prevent and combat infections caused by bacteria, fungi, and viruses, as well as the formation and proliferation of biofilms. Furthermore, new anticancer treatments and wound healing applications can be explored in future studies.

These molecules affect various biological activities, making them suitable candidates for use in new generations of agents in the biotechnological, biomedical, and pharmaceutical fields. However, it is necessary to investigate their applications, cost-effectiveness, and availability further.

Author Contributions: Conceptualization, J.A. and A.M.; writing—original draft preparation, J.A., J.M., D.S. (Douglas Silva), A.A., K.S., L.C., D.S. (Darlan Silva) and W.P.; writing—review and editing, J.M., M.S., L.S. and A.M.; visualization, L.S., M.S. and A.M.; supervision, A.M.; project administration, J.M. and A.M.; funding acquisition, A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by Fundação de Amparo à Pesquisa e o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA, BD-01413/19); and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ, 434149/2018-7).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Hélio Euclides S. dos Santos and Marinaldo for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ACE2	angiotensin-converting enzyme 2
BE	bioemulsifier
BS	biosurfactant
CD4	differentiation cluster 4
CD25	differentiation cluster 25
CD31	differentiation cluster 31
COX-2	cyclooxygenase-2
FOXP3	Forkhead box protein P3
HIF-1α	hypoxia-inducible factor-1α
HT-29	human colorectal adenocarcinoma
IL-2	interleukin 2
IL-10	interleukin 10
IL1-1β	interleukin 10-1β
IL-8	interleukin 8
IgE	immunoglobulin E
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LP78	lipopeptide 78
MBHA	(4-Methylbenzhydrylamine)

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MELs	mannosylerythritol lipids
MIC	minimum inhibitory concentration
MICs	minimum inhibitory concentrations
MRSA	methicillin-resistant *S. aureus*
NF	κB factor nuclear-κB
NF	κBp65- nuclear factor kappa- β p65
NLPB	nanolipopeptide biosurfactant
NO	nitric oxide
P-Akt	P-mitogen-activated
P-GSK3β	protein kinase syntoxic glycogen-3 beta
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
QS	quorum sensing
RL	rhamnolipid
SACs	surface-active compounds
TGF-β	transforming growth factor
TLR3	Toll-like receptor 3
TNF-α	tumor necrosis factor α
USSA	ultrashort synthetic surface active
α-SMA	influencing α-smooth muscle actin

References

1. Franzetti, A.; Tamburini, E.; Banat, I.M. Applications of Biological Surface-Active Compounds in Remediation Technologies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *672*, 121–134. [CrossRef] [PubMed]
2. Phulpoto, I.A.; Yu, Z.; Hu, B.; Wang, Y.; Ndayisenga, F.; Li, J.; Liang, H.; Qazi, M.A. Production and Characterization of Surfactin-like Biosurfactant Produced by Novel Strain *Bacillus nealsonii* S2MT and It's Potential for Oil Contaminated Soil Remediation. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 145. [CrossRef] [PubMed]
3. Uzoigwe, C.; Burgess, J.G.; Ennis, C.J.; Rahman, P.K.S.M. Bioemulsifiers Are Not Biosurfactants and Require Different Screening Approaches. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 245. [CrossRef] [PubMed]
4. Durval, I.J.B.; Mendonça, A.H.R.; Rocha, I.V.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Converti, A.; Sarubbo, L.A. Production, Characterization, Evaluation and Toxicity Assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 Biosurfactant for Marine Oil Spills Bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *157*, 111357. [CrossRef]
5. Ceresa, C.; Tessarolo, F.; Maniglio, D.; Tambone, E.; Carmagnola, I.; Fedeli, E.; Caola, I.; Nollo, G.; Chiono, V.; Allegrone, G.; et al. Medical-Grade Silicone Coated with Rhamnolipid R89 Is Effective against *Staphylococcus* spp. Biofilms. *Molecules* **2019**, *24*, 3843. [CrossRef]
6. Md Badrul Hisham, N.H.; Ibrahim, M.F.; Ramli, N.; Abd-Aziz, S. Production of Biosurfactant Produced from Used Cooking Oil by *Bacillus* Sp. HIP3 for Heavy Metals Removal. *Molecules* **2019**, *24*, 2617. [CrossRef]
7. Yamasaki, R.; Kawano, A.; Yoshioka, Y.; Ariyoshi, W. Rhamnolipids and Surfactin Inhibit the Growth or Formation of Oral Bacterial Biofilm. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 358. [CrossRef]
8. Sun, W.; Zhu, B.; Yang, F.; Dai, M.; Sehar, S.; Peng, C.; Ali, I.; Naz, I. Optimization of Biosurfactant Production from *Pseudomonas* sp. CQ2 and Its Application for Remediation of Heavy Metal Contaminated Soil. *Chemosphere* **2021**, *265*, 129090. [CrossRef]
9. Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A.U. Antibiotics versus Biofilm: An Emerging Battleground in Microbial Communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, *8*, 76. [CrossRef]
10. Gaur, V.K.; Regar, R.K.; Dhiman, N.; Gautam, K.; Srivastava, J.K.; Patnaik, S.; Kamthan, M.; Manickam, N. Biosynthesis and Characterization of Sophorolipid Biosurfactant by *Candida* spp.: Application as Food Emulsifier and Antibacterial Agent. *Bioresour. Technol.* **2019**, *285*, 121314. [CrossRef]
11. Kumari, A.; Kumari, S.; Prasad, G.S.; Pinnaka, A.K. Production of Sophorolipid Biosurfactant by Insect Derived Novel Yeast *Metschnikowia churdharensis* f.A., Sp. Nov., and Its Antifungal Activity against Plant and Human Pathogens. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 678668. [CrossRef] [PubMed]
12. Giugliano, R.; Buonocore, C.; Zannella, C.; Chianese, A.; Palma Esposito, F.; Tedesco, P.; De Filippis, A.; Galdiero, M.; Franci, G.; de Pascale, D. Antiviral Activity of the Rhamnolipids Mixture from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas gessardii* M15 against *Herpes simplex* Viruses and Coronaviruses. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2121. [CrossRef] [PubMed]
13. Kim, H.-Y.; Jung, H.; Kim, H.-M.; Jeong, H.-J. Surfactin Exerts an Anti-Cancer Effect through Inducing Allergic Reactions in Melanoma Skin Cancer. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *99*, 107934. [CrossRef] [PubMed]
14. Ceresa, C.; Fracchia, L.; Fedeli, E.; Porta, C.; Banat, I.M. Recent Advances in Biomedical, Therapeutic and Pharmaceutical Applications of Microbial Surfactants. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 466. [CrossRef]
15. Mujumdar, S.; Joshi, P.; Karve, N. Production, Characterization, and Applications of Bioemulsifiers (BE) and Biosurfactants (BS) Produced by *Acinetobacter* Spp.: A Review. *J. Basic Microbiol.* **2019**, *59*, 277–287. [CrossRef]

16. Cazals, F.; Huguenot, D.; Crampon, M.; Colombano, S.; Betelu, S.; Galopin, N.; Perrault, A.; Simonnot, M.-O.; Ignatiadis, I.; Rossano, S. Production of Biosurfactant Using the Endemic Bacterial Community of a PAHs Contaminated Soil, and Its Potential Use for PAHs Remobilization. *Sci. Total Environ.* **2020**, *709*, 136143. [CrossRef]
17. Loeto, D.; Jongman, M.; Lekote, L.; Muzila, M.; Mokomane, M.; Motlhanka, K.; Ndlovu, T.; Zhou, N. Biosurfactant Production by Halophilic Yeasts Isolated from Extreme Environments in Botswana. *FEMS Microbiol. Lett.* **2021**, *368*, 146. [CrossRef]
18. Silva, M.E.T.; Duvoisin, S., Jr.; Oliveira, R.L.; Banhos, E.F.; Souza, A.Q.L.; Albuquerque, P.M. Biosurfactant Production of *Piper hispidum* Endophytic Fungi. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *130*, 561–569. [CrossRef]
19. Nayarisseri, A.; Singh, P.; Singh, S.K. Screening, Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing *Bacillus tequilensis* Strain ANSKLAB04 from Brackish River Water. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2019**, *16*, 7103–7112. [CrossRef]
20. Desai, J.D.; Banat, I.M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Fuel Energy Abstr.* **1997**, *38*, 221. [CrossRef]
21. Chen, W.-C.; Juang, R.-S.; Wei, Y.-H. Applications of a Lipopeptide Biosurfactant, Surfactin, Produced by Microorganisms. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *103*, 158–169. [CrossRef]
22. Otzen, D.E. Biosurfactants and Surfactants Interacting with Membranes and Proteins: Same but Different? *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1859*, 639–649. [CrossRef] [PubMed]
23. Hogan, D.E.; Tian, F.; Malm, S.W.; Olivares, C.; Palos Pacheco, R.; Simonich, M.T.; Hunjan, A.S.; Tanguay, R.L.; Klimecki, W.T.; Polt, R.; et al. Biodegradability and Toxicity of Monorhamnolipid Biosurfactant Diastereomers. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *364*, 600–607. [CrossRef]
24. Qazi, M.A.; Wang, Q.; Dai, Z. Sophorolipids Bioproduction in the Yeast *Starmerella bombicola*: Current Trends and Perspectives. *Bioresour. Technol.* **2022**, *346*, 126593. [CrossRef]
25. Ceresa, C.; Hutton, S.; Lajarin-Cuesta, M.; Heaton, R.; Hargreaves, I.; Fracchia, L.; De Rienzo, M.A.D. Production of Mannosylerythritol Lipids (MELs) to Be Used as Antimicrobial Agents against *S. aureus* ATCC 6538. *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 1373–1380. [CrossRef] [PubMed]
26. Niu, Y.; Wu, J.; Wang, W.; Chen, Q. Production and Characterization of a New Glycolipid, Mannosylerythritol Lipid, from Waste Cooking Oil Biotransformation by *Pseudozyma aphidis* ZJUDM34. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 937–948. [CrossRef] [PubMed]
27. Luong, T.M.; Ponamoreva, O.N.; Nechaeva, I.A.; Petrikov, K.V.; Delegan, Y.A.; Surin, A.K.; Linklater, D.; Filonov, A.E. Characterization of Biosurfactants Produced by the Oil-Degrading Bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at Low Temperature. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *34*, 20. [CrossRef]
28. Kubicki, S.; Bollinger, A.; Katzke, N.; Jaeger, K.-E.; Loeschcke, A.; Thies, S. Marine Biosurfactants: Biosynthesis, Structural Diversity and Biotechnological Applications. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 408. [CrossRef]
29. Hu, F.; Liu, Y.; Li, S. Rational Strain Improvement for Surfactin Production: Enhancing the Yield and Generating Novel Structures. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 42. [CrossRef]
30. Habe, H.; Taira, T.; Sato, Y.; Imura, T.; Ano, T. Evaluation of Yield and Surface Tension-Lowering Activity of Iturin a Produced by *Bacillus subtilis* RB14. *J. Oleo Sci.* **2019**, *68*, 1157–1162. [CrossRef]
31. Sarwar, A.; Brader, G.; Corretto, E.; Aleti, G.; Abaidullah, M.; Sessitsch, A.; Hafeez, F.Y. Qualitative Analysis of Biosurfactants from *Bacillus* Species Exhibiting Antifungal Activity. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0198107. [CrossRef]
32. Denoirjean, T.; Doury, G.; Poli, P.; Coutte, F.; Ameline, A. Effects of Bacillus Lipopeptides on the Survival and Behavior of the Rosy Apple Aphid Dysaphis Plantaginea. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *226*, 112840. [CrossRef] [PubMed]
33. Singh, P.; Patil, Y.; Rale, V. Biosurfactant Production: Emerging Trends and Promising Strategies. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 2–13. [CrossRef]
34. Zambry, N.S.; Rusly, N.S.; Awang, M.S.; Md Noh, N.A.; Yahya, A.R.M. Production of Lipopeptide Biosurfactant in Batch and Fed-Batch *Streptomyces* sp. PBD-410L Cultures Growing on Palm Oil. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2021**, *44*, 1577–1592. [CrossRef] [PubMed]
35. Pardhi, D.S.; Panchal, R.R.; Raval, V.H.; Rajput, K.N. Statistical Optimization of Medium Components for Biosurfactant Production by *Pseudomonas guguanensis* D30. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2022**, *52*, 171–180. [CrossRef] [PubMed]
36. Dos Santos, R.A.; Rodríguez, D.M.; Ferreira, I.N.d.S.; de Almeida, S.M.; Takaki, G.M.d.C.; de Lima, M.A.B. Novel Production of Biodispersant by *Serratia marcescens* UCP 1549 in Solid-State Fermentation and Application for Oil Spill Bioremediation. *Environ. Technol.* **2021**, *43*, 1–12. [CrossRef]
37. Elkhawaga, M.A. Optimization and Characterization of Biosurfactant from *Streptomyces griseoplanus* NRRL-ISP5009 (MS1). *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124*, 691–707. [CrossRef]
38. Bezza, F.A.; Chirwa, E.M.N. Biosurfactant-Enhanced Bioremediation of Aged Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Creosote Contaminated Soil. *Chemosphere* **2016**, *144*, 635–644. [CrossRef]
39. Elakkiya, V.T.; SureshKumar, P.; Alharbi, N.S.; Kadaikunnan, S.; Khaled, J.M.; Govindarajan, M. Swift Production of Rhamnolipid Biosurfactant, Biopolymer and Synthesis of Biosurfactant-Wrapped Silver Nanoparticles and Its Enhanced Oil Recovery. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 1892–1899. [CrossRef]
40. Nurfarahin, A.H.; Mohamed, M.S.; Phang, L.Y. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production-an Overview. *Molecules* **2018**, *23*, 1049. [CrossRef]

41. Liu, J.-F.; Mbadinga, S.M.; Yang, S.-Z.; Gu, J.-D.; Mu, B.-Z. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 4814–4837. [CrossRef] [PubMed]
42. De Almeida, D.G.; Soares Da Silva, R.d.C.F.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Santos, V.A.; Banat, I.M.; Sarubbo, L.A. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1718. [CrossRef] [PubMed]
43. Ostendorf, T.A.; Silva, I.A.; Converti, A.; Sarubbo, L.A. Production and Formulation of a New Low-Cost Biosurfactant to Remediate Oil-Contaminated Seawater. *J. Biotechnol.* **2019**, *295*, 71–79. [CrossRef] [PubMed]
44. Silva, I.A.; Veras, B.O.; Ribeiro, B.G.; Aguiar, J.S.; Campos Guerra, J.M.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A. Production of Cupcake-like Dessert Containing Microbial Biosurfactant as an Emulsifier. *PeerJ* **2020**, *8*, e9064. [CrossRef]
45. Ohadi, M.; Shahravan, A.; Dehghannoudeh, N.; Eslaminejad, T.; Banat, I.M.; Dehghannoudeh, G. Potential Use of Microbial Surfactant in Microemulsion Drug Delivery System: A Systematic Review. *Drug Des. Dev. Ther.* **2020**, *14*, 541–550. [CrossRef]
46. Abdelli, F.; Jardak, M.; Elloumi, J.; Stien, D.; Cherif, S.; Mnif, S.; Aifa, S. Antibacterial, Anti-Adherent and Cytotoxic Activities of Surfactin(s) from a Lipolytic Strain *Bacillus safensis* F4. *Biodegradation* **2019**, *30*, 287–300. [CrossRef] [PubMed]
47. Bhaumik, M.; Dhanarajan, G.; Chopra, J.; Kumar, R.; Hazra, C.; Sen, R. Production, Partial Purification and Characterization of a Proteoglycan Bioemulsifier from an Oleaginous Yeast. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43*, 1747–1759. [CrossRef]
48. Rosenberg, E.; Ron, E.Z. High- and Low-Molecular-Mass Microbial Surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *52*, 154–162. [CrossRef]
49. Ortega-de la Rosa, N.D.; Vázquez-Vázquez, J.L.; Huerta-Ochoa, S.; Gimeno, M.; Gutiérrez-Rojas, M. Stable Bioemulsifiers Are Produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 Growing in Different Carbon Sources. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2018**, *41*, 859–869. [CrossRef]
50. Patil, J.R.; Chopade, B.A. Studies on Bioemulsifier Production by *Acinetobacter* Strains Isolated from Healthy Human Skin. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 290–298. [CrossRef]
51. Fan, Y.; Tao, W.; Huang, H.; Li, S. Characterization of a Novel Bioemulsifier from *Pseudomonas stutzeri*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33*, 161. [CrossRef] [PubMed]
52. Adetunji, A.I.; Olaniran, A.O. Production and Characterization of Bioemulsifiers from *Acinetobacter* strains Isolated from Lipid-Rich Wastewater. *3 Biotech* **2019**, *9*, 151. [CrossRef] [PubMed]
53. Marques, N.S.A.A.; Silva, I.G.S.d.; Cavalcanti, D.L.; Maia, P.C.S.V.; Santos, V.P.; Andrade, R.F.S.; Campos-Takaki, G.M. Eco-Friendly Bioemulsifier Production by Mucor Circinelloides UCP0001 Isolated from Mangrove Sediments Using Renewable Substrates for Environmental Applications. *Biomolecules* **2020**, *10*, 365. [CrossRef] [PubMed]
54. Gudiña, E.J.; Pereira, J.F.B.; Costa, R.; Evtuguin, D.V.; Coutinho, J.A.P.; Teixeira, J.A.; Rodrigues, L.R. Novel Bioemulsifier Produced by a Paenibacillus Strain Isolated from Crude Oil. *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 14. [CrossRef]
55. Tao, W.; Lin, J.; Wang, W.; Huang, H.; Li, S. Designer Bioemulsifiers Based on Combinations of Different Polysaccharides with the Novel Emulsifying Esterase AXE from Bacillus Subtilis CICC 20034. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 173. [CrossRef] [PubMed]
56. Dastgheib, S.M.M.; Amoozegar, M.A.; Elahi, E.; Asad, S.; Banat, I.M. Bioemulsifier Production by a Halothermophilic *Bacillus* Strain with Potential Applications in Microbially Enhanced Oil Recovery. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 263–270. [CrossRef]
57. Goldman, S.; Shabtai, Y.; Rubinovitz, C.; Rosenberg, E.; Gutnick, D.L. Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: Distribution of Cell-Free and Cell-Associated Cross-Reacting Material. *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *44*, 165–170. [CrossRef]
58. Toren, A.; Navon-Venezia, S.; Ron, E.Z.; Rosenberg, E. Emulsifying Activities of Purified Alasan Proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1102–1106. [CrossRef]
59. Ohadi, M.; Dehghannoudeh, G.; Forootanfar, H.; Shakibaie, M.; Rajaee, M. Investigation of the Structural, Physicochemical Properties, and Aggregation Behavior of Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Acinetobacter junii* B6. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *112*, 712–719. [CrossRef]
60. Dong, H.; Xia, W.; Dong, H.; She, Y.; Zhu, P.; Liang, K.; Zhang, Z.; Liang, C.; Song, Z.; Sun, S.; et al. Rhamnolipids Produced by Indigenous *Acinetobacter junii* from Petroleum Reservoir and Its Potential in Enhanced Oil Recovery. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1710. [CrossRef]
61. Rosenberg, E.; Rubinovitz, C.; Gottlieb, A.; Rosenhak, S.; Ron, E.Z. Production of Biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 317–322. [CrossRef] [PubMed]
62. Klausmann, P.; Hennemann, K.; Hoffmann, M.; Treinen, C.; Aschern, M.; Lilge, L.; Morabbi Heravi, K.; Henkel, M.; Hausmann, R. *Bacillus subtilis* High Cell Density Fermentation Using a Sporulation-Deficient Strain for the Production of Surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 4141–4151. [CrossRef] [PubMed]
63. Díaz De Rienzo, M.A.; Kamalanathan, I.D.; Martin, P.J. Comparative Study of the Production of Rhamnolipid Biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 Using Foam Fractionation. *Process Biochem.* **2016**, *51*, 820–827. [CrossRef]
64. Kim, Y.T.; Kim, S.E.; Lee, W.J.; Fumei, Z.; Cho, M.S.; Moon, J.S.; Oh, H.-W.; Park, H.-Y.; Kim, S.U. Isolation and Characterization of a High Iturin Yielding Bacillus Velezensis UV Mutant with Improved Antifungal Activity. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0234177. [CrossRef]
65. Ganji, Z.; Beheshti-Maal, K.; Massah, A.; Emami-Karvani, Z. A Novel Sophorolipid-Producing *Candida kefyr* GBME-IAUF-2 as a Potential Agent in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). *FEMS Microbiol. Lett.* **2020**, *367*, fnaa144. [CrossRef]

66. Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A.; Rodrigues, L.R.M.; Teixeira, J.A.C.; Campos-Takaki, G.M. Antimicrobial and Anti-Adhesive Potential of a Biosurfactant Rufisan Produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *84*, 1–5. [CrossRef]
67. Nelson, J.; El-Gendy, A.O.; Mansy, M.S.; Ramadan, M.A.; Aziz, R.K. The Biosurfactants Iturin, Lichenysin and Surfactin, from Vaginally Isolated Lactobacilli, Prevent Biofilm Formation by Pathogenic *Candida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2020**, *367*, fnaa126. [CrossRef]
68. Zhao, F.; Han, S.; Zhang, Y. Comparative Studies on the Structural Composition, Surface/ Interface Activity and Application Potential of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Using Hydrophobic or Hydrophilic Substrates. *Bioresour. Technol.* **2020**, *295*, 122269. [CrossRef] [PubMed]
69. Bonnichsen, L.; Bygvraa Svenningsen, N.; Rybtke, M.; de Bruijn, I.; Raaijmakers, J.M.; Tolker-Nielsen, T.; Nybroe, O. Lipopeptide Biosurfactant Viscosin Enhances Dispersal of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 Biofilms. *Microbiology* **2015**, *161*, 2289–2297. [CrossRef]
70. Phulpoto, I.A.; Wang, Y.; Qazi, M.A.; Hu, B.; Ndayisenga, F.; Yu, Z. Bioprospecting of Rhamnolipids Production and Optimization by an Oil-Degrading *Pseudomonas* sp. S2WE Isolated from Freshwater Lake. *Bioresour. Technol.* **2021**, *323*, 124601. [CrossRef]
71. Hu, X.; Cheng, T.; Liu, J. A Novel Serratia Sp. ZS6 Isolate Derived from Petroleum Sludge Secretes Biosurfactant and Lipase in Medium with Olive Oil as Sole Carbon Source. *AMB Express* **2018**, *8*, 165. [CrossRef] [PubMed]
72. Amaral, P.F.F.; da Silva, J.M.; Lehocky, M.; Barros-Timmons, A.M.V.; Coelho, M.A.Z.; Marrucho, I.M.; Coutinho, J.A.P. Production and Characterization of a Bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 1894–1898. [CrossRef]
73. de Souza Monteiro, A.; Domingues, V.S.; Souza, M.V.; Lula, I.; Gonçalves, D.B.; de Siqueira, E.P.; Dos Santos, V.L. Bioconversion of Biodiesel Refinery Waste in the Bioemulsifier by *Trichosporon Mycotoxinivorans* C.I.A.2. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 29. [CrossRef] [PubMed]
74. Anestopoulos, I.; Kiousi, D.E.; Klavaris, A.; Galanis, A.; Salek, K.; Euston, S.R.; Pappa, A.; Panayiotidis, M.I. Surface Active Agents and Their Health-Promoting Properties: Molecules of Multifunctional Significance. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 688. [CrossRef]
75. Lerminiaux, N.A.; Cameron, A.D.S. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Clinical Environments. *Can. J. Microbiol.* **2019**, *65*, 34–44. [CrossRef]
76. Melnyk, A.H.; Wong, A.; Kassen, R. The Fitness Costs of Antibiotic Resistance Mutations. *Evol. Appl.* **2015**, *8*, 273–283. [CrossRef]
77. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [CrossRef]
78. Colombo, A.L.; Júnior, J.N.d.A.; Guinea, J. Emerging Multidrug-Resistant *Candida* Species. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2017**, *30*, 528–538. [CrossRef]
79. Kean, R.; Ramage, G. Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: The Global Threat of *Candida Auris*. *mSphere* **2019**, *4*, e00458-19. [CrossRef]
80. Kumar, A.; Nair, R.; Kumar, M.; Banerjee, A.; Chakrabarti, A.; Rudramurthy, S.M.; Bagga, R.; Gaur, N.A.; Mondal, A.K.; Prasad, R. Assessment of Antifungal Resistance and Associated Molecular Mechanism in *Candida albicans* Isolates from Different Cohorts of Patients in North Indian State of Haryana. *Folia Microbiol.* **2020**, *65*, 747–754. [CrossRef]
81. Anestopoulos, I.; Kiousi, D.-E.; Klavaris, A.; Maijo, M.; Serpico, A.; Suarez, A.; Sanchez, G.; Salek, K.; Chasapi, S.A.; Zompra, A.A.; et al. Marine-Derived Surface Active Agents: Health-Promoting Properties and Blue Biotechnology-Based Applications. *Biomolecules* **2020**, *10*, 885. [CrossRef] [PubMed]
82. Zhou, C.; Wang, F.; Chen, H.; Li, M.; Qiao, F.; Liu, Z.; Hou, Y.; Wu, C.; Fan, Y.; Liu, L.; et al. Selective Antimicrobial Activities and Action Mechanism of Micelles Self-Assembled by Cationic Oligomeric Surfactants. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 4242–4249. [CrossRef] [PubMed]
83. Labena, A.; Hegazy, M.A.; Sami, R.M.; Hozzein, W.N. Multiple Applications of a Novel Cationic Gemini Surfactant: Anti-Microbial, Anti-Biofilm, Biocide, Salinity Corrosion Inhibitor, and Biofilm Dispersion (Part II). *Molecules* **2020**, *25*, 1348. [CrossRef] [PubMed]
84. Sana, S.; Datta, S.; Biswas, D.; Sengupta, D. Assessment of Synergistic Antibacterial Activity of Combined Biosurfactants Revealed by Bacterial Cell Envelop Damage. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2018**, *1860*, 579–585. [CrossRef]
85. Naughton, P.J.; Marchant, R.; Naughton, V.; Banat, I.M. Microbial Biosurfactants: Current Trends and Applications in Agricultural and Biomedical Industries. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 12–28. [CrossRef] [PubMed]
86. Haba, E.; Bouhdid, S.; Torrego-Solana, N.; Marqués, A.M.; Espuny, M.J.; García-Celma, M.J.; Manresa, A. Rhamnolipids as Emulsifying Agents for Essential Oil Formulations: Antimicrobial Effect against *Candida albicans* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Pharm.* **2014**, *476*, 134–141. [CrossRef]
87. Kurtzman, C.P.; Price, N.P.J.; Ray, K.J.; Kuo, T.-M. Production of Sophorolipid Biosurfactants by Multiple Species of the Starmerella (*Candida*) *bombicola* Yeast Clade. Sophorolipids from Yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *311*, 140–146. [CrossRef]
88. Callaghan, B.; Lydon, H.; Roelants, S.L.K.W.; Van Bogaert, I.N.A.; Marchant, R.; Banat, I.M.; Mitchell, C.A. Lactonic Sophorolipids Increase Tumor Burden in Apcmin+/− Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156845. [CrossRef]
89. Van Bogaert, I.N.A.; Zhang, J.; Soetaert, W. Microbial Synthesis of Sophorolipids. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 821–833. [CrossRef]
90. Sen, S.; Borah, S.N.; Bora, A.; Deka, S. Production, Characterization, and Antifungal Activity of a Biosurfactant Produced by Rhodotorula Babjevae YS3. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 95. [CrossRef]

91. Chen, M.; Wang, J.; Liu, B.; Zhu, Y.; Xiao, R.; Yang, W.; Ge, C.; Chen, Z. Biocontrol of Tomato Bacterial Wilt by the New Strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and Its Lipopeptides. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 160. [CrossRef] [PubMed]
92. Wu, S.; Liu, G.; Zhou, S.; Sha, Z.; Sun, C. Characterization of Antifungal Lipopeptide Biosurfactants Produced by Marine Bacterium Bacillus Sp. CS30. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 199. [CrossRef] [PubMed]
93. Perez, K.J.; Viana, J.D.S.; Lopes, F.C.; Pereira, J.Q.; Dos Santos, D.M.; Oliveira, J.S.; Velho, R.V.; Crispim, S.M.; Nicoli, J.R.; Brandelli, A.; et al. *Bacillus* Spp. Isolated from Puba as a Source of Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 61. [CrossRef] [PubMed]
94. Liu, J.; Li, W.; Zhu, X.; Zhao, H.; Lu, Y.; Zhang, C.; Lu, Z. Surfactin Effectively Inhibits *Staphylococcus aureus* Adhesion and Biofilm Formation on Surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 4565–4574. [CrossRef]
95. Ohadi, M.; Forootanfar, H.; Dehghannoudeh, G.; Eslaminejad, T.; Ameri, A.; Shakibaie, M.; Adeli-Sardou, M. Antimicrobial, Anti-Biofilm, and Anti-Proliferative Activities of Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Acinetobacter junii* B6. *Microb. Pathog.* **2020**, *138*, 103806. [CrossRef] [PubMed]
96. Mouafo, T.H.; Mbawala, A.; Ndjouenkeu, R. Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus* spp. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 5034783. [CrossRef]
97. Liu, Y.; Ding, S.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Zhu, K. A Biosurfactant-Inspired Heptapeptide with Improved Specificity to Kill MRSA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 1486–1490. [CrossRef]
98. Vollenbroich, D.; Ozel, M.; Vater, J.; Kamp, R.M.; Pauli, G. Mechanism of Inactivation of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* **1997**, *25*, 289–297. [CrossRef]
99. Yuan, L.; Zhang, S.; Wang, Y.; Li, Y.; Wang, X.; Yang, Q. Surfactin Inhibits Membrane Fusion during Invasion of Epithelial Cells by Enveloped Viruses. *J. Virol.* **2018**, *92*, e00809-18. [CrossRef]
100. Wu, W.; Wang, J.; Lin, D.; Chen, L.; Xie, X.; Shen, X.; Yang, Q.; Wu, Q.; Yang, J.; He, J.; et al. Super Short Membrane-Active Lipopeptides Inhibiting the Entry of Influenza A Virus. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 2344–2350. [CrossRef]
101. Chowdhury, T.; Baindara, P.; Mandal, S.M. LPD-12: A Promising Lipopeptide to Control COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2021**, *57*, 106218. [CrossRef] [PubMed]
102. Outlaw, V.K.; Bovier, F.T.; Mears, M.C.; Cajimat, M.N.; Zhu, Y.; Lin, M.J.; Addetia, A.; Lieberman, N.A.P.; Peddu, V.; Xie, X.; et al. Inhibition of Coronavirus Entry in vitro and ex vivo by a Lipid-Conjugated Peptide Derived from the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein HRC Domain. *MBio* **2020**, *11*, e01935-20. [CrossRef] [PubMed]
103. Subramaniam, M.D.; Venkatesan, D.; Iyer, M.; Subbarayan, S.; Govindasami, V.; Roy, A.; Narayanasamy, A.; Kamalakannan, S.; Gopalakrishnan, A.V.; Thangarasu, R.; et al. Biosurfactants and Anti-Inflammatory Activity: A Potential New Approach towards COVID-19. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* **2020**, *17*, 72–81. [CrossRef] [PubMed]
104. Shah, V.; Doncel, G.F.; Seyoum, T.; Eaton, K.M.; Zalenskaya, I.; Hagver, R.; Azim, A.; Gross, R. Sophorolipids, Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4093–4100. [CrossRef] [PubMed]
105. Borsanyiova, M.; Patil, A.; Mukherji, R.; Prabhune, A.; Bopegamage, S. Biological Activity of Sophorolipids and Their Possible Use as Antiviral Agents. *Folia Microbiol.* **2016**, *61*, 85–89. [CrossRef]
106. Remichkova, M.; Galabova, D.; Roeva, I.; Karpenko, E.; Shulga, A.; Galabov, A.S. Anti-Herpesvirus Activities of *Pseudomonas* sp. S-17 Rhamnolipid and Its Complex with Alginate. *Z. Naturforsch. C* **2008**, *63*, 75–81. [CrossRef]
107. Lozach, P.-Y. Cell Biology of Viral Infections. *Cells* **2020**, *9*, 2431. [CrossRef]
108. Abdulkhaleq, L.A.; Assi, M.A.; Abdullah, R.; Zamri-Saad, M.; Taufiq-Yap, Y.H.; Hezmee, M.N.M. The Crucial Roles of Inflammatory Mediators in Inflammation: A Review. *Vet. World* **2018**, *11*, 627–635. [CrossRef]
109. Wang, Y.; Tian, J.; Shi, F.; Li, X.; Hu, Z.; Chu, J. Protective Effect of Surfactin on Copper Sulfate-Induced Inflammation, Oxidative Stress, and Hepatic Injury in Zebrafish. *Microbiol. Immunol.* **2021**, *65*, 410–421. [CrossRef]
110. Gan, P.; Jin, D.; Zhao, X.; Gao, Z.; Wang, S.; Du, P.; Qi, G. Bacillus-Produced Surfactin Attenuates Chronic Inflammation in Atherosclerotic Lesions of ApoE(−/−) Mice. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *35*, 226–234. [CrossRef]
111. Xu, W.; Liu, H.; Wang, X.; Yang, Q. Surfactin Induces Maturation of Dendritic Cells in Vitro. *Biosci. Rep.* **2016**, *36*, e00387. [CrossRef] [PubMed]
112. Maeng, Y.; Kim, K.T.; Zhou, X.; Jin, L.; Kim, K.S.; Kim, Y.H.; Lee, S.; Park, J.H.; Chen, X.; Kong, M.; et al. A Novel Microbial Technique for Producing High-Quality Sophorolipids from Horse Oil Suitable for Cosmetic Applications. *Microb. Biotechnol.* **2018**, *11*, 917–929. [CrossRef] [PubMed]
113. Hagler, M.; Smith-Norowitz, T.A.; Chice, S.; Wallner, S.R.; Viterbo, D.; Mueller, C.M.; Gross, R.; Nowakowski, M.; Schulze, R.; Zenilman, M.E.; et al. Sophorolipids Decrease IgE Production in U266 Cells by Downregulation of BSAP (Pax5), TLR-2, STAT3 and IL-6. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *119*, S263. [CrossRef]
114. Hardin, R.; Pierre, J.; Schulze, R.; Mueller, C.M.; Fu, S.L.; Wallner, S.R.; Stanek, A.; Shah, V.; Gross, R.A.; Weedon, J.; et al. Sophorolipids Improve Sepsis Survival: Effects of Dosing and Derivatives. *J. Surg. Res.* **2007**, *142*, 314–319. [CrossRef]
115. Mueller, C.M.; Lin, Y.-Y.; Viterbo, D.; Pierre, J.; Murray, S.A.; Shah, V.; Gross, R.; Schulze, R.; Zenilman, M.E.; Bluth, M.H. Sophorolipid Treatment Decreases Inflammatory Cytokine Expression in an in Vitro Model of Experimental Sepsis. *FASEB J.* **2006**, *20*, A204. [CrossRef]
116. Kuyukina, M.S.; Ivshina, I.B.; Gein, S.V.; Baeva, T.A.; Chereshnev, V.A. In Vitro Immunomodulating Activity of Biosurfactant Glycolipid Complex from *Rhodococcus ruber*. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2007**, *144*, 326–330. [CrossRef]

117. Thakur, P.; Saini, N.K.; Thakur, V.K.; Gupta, V.K.; Saini, R.V.; Saini, A.K. Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging Trends and Promising Strategies in the Field of Biotechnology and Biomedicine. *Microb. Cell Fact.* **2021**, *20*, 1. [CrossRef]
118. Rahimi, K.; Lotfabad, T.B.; Jabeen, F.; Mohammad Ganji, S. Cytotoxic Effects of Mono- and Di-Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* MR01 on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *181*, 943–952. [CrossRef]
119. Ribeiro, I.A.C.; Faustino, C.M.C.; Guerreiro, P.S.; Frade, R.F.M.; Bronze, M.R.; Castro, M.F.; Ribeiro, M.H.L. Development of Novel Sophorolipids with Improved Cytotoxic Activity toward MDA-MB-231 Breast Cancer Cells: Development of Novel Sophorolipids With Cytotoxic Activity. *J. Mol. Recognit.* **2015**, *28*, 155–165. [CrossRef]
120. Chen, J.; Song, X.; Zhang, H.; Qu, Y. Production, Structure Elucidation and Anticancer Properties of Sophorolipid from Wickerhamiella Domercqiae. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 501–506. [CrossRef]
121. Dey, G.; Bharti, R.; Dhanarajan, G.; Das, S.; Dey, K.K.; Kumar, B.N.P.; Sen, R.; Mandal, M. Marine Lipopeptide Iturin a Inhibits Akt Mediated GSK3β and FoxO3a Signaling and Triggers Apoptosis in Breast Cancer. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10316. [CrossRef] [PubMed]
122. Yan, J.; Bassler, B.L. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe* **2019**, *26*, 15–21. [CrossRef] [PubMed]
123. Roy, R.; Tiwari, M.; Donelli, G.; Tiwari, V. Strategies for Combating Bacterial Biofilms: A Focus on Anti-Biofilm Agents and Their Mechanisms of Action. *Virulence* **2018**, *9*, 522–554. [CrossRef] [PubMed]
124. Rivardo, F.; Martinotti, M.G.; Turner, R.J.; Ceri, H. Synergistic Effect of Lipopeptide Biosurfactant with Antibiotics against *Escherichia coli* CFT073 Biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *37*, 324–331. [CrossRef]
125. Ceresa, C.; Rinaldi, M.; Fracchia, L. Synergistic Activity of Antifungal Drugs and Lipopeptide AC7 against *Candida albicans* Biofilm on Silicone. *AIMS Bioeng.* **2017**, *4*, 318–334. [CrossRef]
126. Cordeiro, R.d.A.; Wesllley Caracas Cedro, E.; Raquel Colares Andrade, A.; Serpa, R.; José de Jesus Evangelista, A.; Sales de Oliveira, J.; Santos Pereira, V.; Pereira Alencar, L.; Bruna Leite Mendes, P.; Cibelle Soares Farias, B.; et al. Inhibitory Effect of a Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Bacillus subtilis* on Planktonic and Sessile Cells of *Trichosporon* spp. *Biofouling* **2018**, *34*, 309–319. [CrossRef]
127. Da Silva, G.O.; Farias, B.C.S.; da Silva, R.B.; Teixeira, E.H.; Cordeiro, R.d.A.; Hissa, D.C.; Melo, V.M.M. Effects of Lipopeptide Biosurfactants on Clinical Strains of *Malassezia furfur* Growth and Biofilm Formation. *Med. Mycol.* **2021**, *59*, 1191–1201. [CrossRef]
128. Allegrone, G.; Ceresa, C.; Rinaldi, M.; Fracchia, L. Diverse Effects of Natural and Synthetic Surfactants on the Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1172. [CrossRef]
129. Shen, Y.; Li, P.; Chen, X.; Zou, Y.; Li, H.; Yuan, G.; Hu, H. Activity of Sodium Lauryl Sulfate, Rhamnolipids, and N-Acetylcysteine against Biofilms of Five Common Pathogens. *Microb. Drug Resist.* **2020**, *26*, 290–299. [CrossRef]
130. Sidrim, J.J.; Ocadaque, C.J.; Amando, B.R.; de Guedes, G.M.; Costa, C.L.; Brilhante, R.S.; de Cordeiro, A.R.; Rocha, M.F.; Scm Castelo-Branco, D. Rhamnolipid Enhances *Burkholderia pseudomallei* Biofilm Susceptibility, Disassembly and Production of Virulence Factors. *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 1109–1121. [CrossRef]
131. Sen, S.; Borah, S.N.; Bora, A.; Deka, S. Rhamnolipid Exhibits Anti-Biofilm Activity against the Dermatophytic Fungi Trichophyton Rubrum and *Trichophyton mentagrophytes*. *Biotechnol. Rep.* **2020**, *27*, e00516. [CrossRef] [PubMed]
132. Ceresa, C.; Fracchia, L.; Williams, M.; Banat, I.M.; Díaz De Rienzo, M.A. The Effect of Sophorolipids against Microbial Biofilms on Medical-Grade Silicone. *J. Biotechnol.* **2020**, *309*, 34–43. [CrossRef] [PubMed]
133. Haddaji, N.; Ncib, K.; Bahia, W.; Ghorbel, M.; Leban, N.; Bouali, N.; Bechambi, O.; Mzoughi, R.; Mahdhi, A. Control of Multidrug-Resistant Pathogenic Staphylococci Associated with Vaginal Infection Using Biosurfactants Derived from Potential Probiotic Bacillus Strain. *Fermentation* **2022**, *8*, 19. [CrossRef]
134. Wang, P.-H.; Huang, B.-S.; Horng, H.-C.; Yeh, C.-C.; Chen, Y.-J. Wound Healing. *J. Chin. Med. Assoc.* **2018**, *81*, 94–101. [CrossRef]
135. Martin, P.; Nunan, R. Cellular and Molecular Mechanisms of Repair in Acute and Chronic Wound Healing. *Br. J. Dermatol.* **2015**, *173*, 370–378. [CrossRef] [PubMed]
136. Tatara, A.M.; Kontoyiannis, D.P.; Mikos, A.G. Drug Delivery and Tissue Engineering to Promote Wound Healing in the Immunocompromised Host: Current Challenges and Future Directions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *129*, 319–329. [CrossRef] [PubMed]
137. Yip, W.L. Influence of Oxygen on Wound Healing: Oxygen and Wound Healing. *Int. Wound J.* **2015**, *12*, 620–624. [CrossRef]
138. Lindholm, C.; Searle, R. Wound Management for the 21st Century: Combining Effectiveness and Efficiency: Wound Management for the 21st Century. *Int. Wound J.* **2016**, *13* (Suppl. 2), 5–15. [CrossRef]
139. Rahim, K.; Saleha, S.; Zhu, X.; Huo, L.; Basit, A.; Franco, O.L. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb. Ecol.* **2017**, *73*, 710–721. [CrossRef]
140. Pastar, I.; Nusbaum, A.G.; Gil, J.; Patel, S.B.; Chen, J.; Valdes, J.; Stojadinovic, O.; Plano, L.R.; Tomic-Canic, M.; Davis, S.C. Interactions of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in Polymicrobial Wound Infection. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56846. [CrossRef]
141. Banu, A.; Noorul Hassan, M.M.; Rajkumar, J.; Srinivasa, S. Spectrum of Bacteria Associated with Diabetic Foot Ulcer and Biofilm Formation: A Prospective Study. *Aust. Med. J.* **2015**, *8*, 280–285. [CrossRef] [PubMed]
142. Ohadi, M.; Forootanfar, H.; Rahimi, H.R.; Jafari, E.; Shakibaie, M.; Eslaminejad, T.; Dehghannoudeh, G. Antioxidant Potential and Wound Healing Activity of Biosurfactant Produced by *Acinetobacter junii* B6. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2017**, *18*, 900–908. [CrossRef]

143. Zouari, R.; Moalla-Rekik, D.; Sahnoun, Z.; Rebai, T.; Ellouze-Chaabouni, S.; Ghribi-Aydi, D. Evaluation of Dermal Wound Healing and in vitro Antioxidant Efficiency of Bacillus Subtilis SPB1 Biosurfactant. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 878–891. [CrossRef] [PubMed]
144. Yan, L.; Liu, G.; Zhao, B.; Pang, B.; Wu, W.; Ai, C.; Zhao, X.; Wang, X.; Jiang, C.; Shao, D.; et al. Novel Biomedical Functions of Surfactin A from *Bacillus subtilis* in Wound Healing Promotion and Scar Inhibition. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 6987–6997. [CrossRef] [PubMed]
145. Li, D.; Wang, W.; Wu, Y.; Ma, X.; Zhou, W.; Lai, Y. Lipopeptide 78 from *Staphylococcus epidermidis* Activates β-Catenin to Inhibit Skin Inflammation. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 1219–1228. [CrossRef] [PubMed]
146. Afsharipour, S.; Asadi, A.; Ohadi, M.; Ranjbar, M.; Forootanfar, H.; Jafari, E.; Dehghannoudeh, G. Preparation and Characterization of Nano-Lipopeptide Biosurfactant Hydrogel and Evaluation of Wound-Healing Properties. *Bionanoscience* **2021**, *11*, 1061–1069. [CrossRef]
147. Gupta, S.; Raghuwanshi, N.; Varshney, R.; Banat, I.M.; Srivastava, A.K.; Pruthi, P.A.; Pruthi, V. Accelerated in Vivo Wound Healing Evaluation of Microbial Glycolipid Containing Ointment as a Transdermal Substitute. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *94*, 1186–1196. [CrossRef]
148. Shen, C.; Jiang, L.; Shao, H.; You, C.; Zhang, G.; Ding, S.; Bian, T.; Han, C.; Meng, Q. Targeted Killing of Myofibroblasts by Biosurfactant Di-Rhamnolipid Suggests a Therapy against Scar Formation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37553. [CrossRef]
149. Kwak, M.-J.; Park, M.-Y.; Kim, J.; Lee, H.; Whang, K.-Y. Curative Effects of Sophorolipid on Physical Wounds: In Vitro and in Vivo Studies. *Vet. Med. Sci.* **2021**, *7*, 1400–1408. [CrossRef]
150. Domalaon, R.; Findlay, B.; Ogunsina, M.; Arthur, G.; Schweizer, F. Ultrashort cationic lipopeptides and lipopeptoids: Evaluation and mechanistic insights against epithelial cancer cells. *Peptides* **2016**, *84*, 58–67. [CrossRef]
151. Findlay, B.; Mookherjee, N.; Schweizer, F. Ultrashort Cationic Lipopeptides and Lipopeptoids Selectively Induce Cytokine Production in Macrophages. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54280. [CrossRef] [PubMed]
152. Tran, Q.G.; Ryu, A.J.; Choi, Y.J.; Jeong, K.J.; Kim, H.S.; Lee, Y.J. Enhanced production of biosurfactants through genetic engineering of *Pseudozyma* sp. SY16. *Korean J. Chem. Eng.* **2022**, *39*, 997–1003. [CrossRef]

ANEXO C

CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO- ARTIGO II

antibiotics

an Open Access Journal by MDPI

Indexed in: PubMed | CITESCORE 7.3 | IMPACT FACTOR 4.3

CERTIFICATE OF PUBLICATION

The certificate of publication for the article titled:

Candida krusei M4CK Produces a Bioemulsifier That Acts on Melaleuca Essential Oil and Aids in Its Antibacterial and Antibiofilm Activity

Authored by:

Jéssica Mayra Mendes Araujo; Joveliane Melo Monteiro; Douglas Henrique dos Santos Silva; Amanda Karoline Veira; Maria Raimunda Chagas Silva; Fernanda Avelino Ferraz; Fábio H. Ramos Braga; Ezequias Pessoa de Siqueira; Andrea de Souza Monteiro

Published in:

Antibiotics **2023**, Volume 12, Issue 12, 1686

MDPI Academic Open Access Publishing since 1996

Basel, June 2024

Prof. Dr. Nicholas Dixon
Editor-in-Chief

antibiotics

MDPI

Article

Candida krusei M4CK Produces a Bioemulsifier That Acts on Melaleuca Essential Oil and Aids in Its Antibacterial and Antibiofilm Activity

Jéssica Mayra Mendes Araujo [1,2,†], Joveliane Melo Monteiro [1,2,†], Douglas Henrique dos Santos Silva [2], Amanda Karoline Veira [2], Maria Raimunda Chagas Silva [3], Fernanda Avelino Ferraz [2], Fábio H. Ramos Braga [3], Ezequias Pessoa de Siqueira [4] and Andrea de Souza Monteiro [1,2,*]

[1] Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, BIONORTE, Saint Louis 65055-310, Brazil; jessicamendesaraujo1@hotmail.com (J.M.M.A.); joveliane-12@hotmail.com (J.M.M.)
[2] Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade CEUMA, Saint Louis 65075-120, Brazil; douglasbmdh@gmail.com (D.H.d.S.S.); amandavieiraalencar@gmail.com (A.K.V.); nanda_ferras@hotmail.com (F.A.F.)
[3] Laboratório de Ciências do Ambiente, Universidade CEUMA, Saint Louis 65075-120, Brazil; marirah@gmail.com (M.R.C.S.); fabiobraga.ma@gmail.com (F.H.R.B.)
[4] Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte 30190-002, Brazil; ezequias.siqueira@gmail.com
* Correspondence: andrea003991@ceuma.com.br
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Surface-active compounds (SACs) of microbial origin are an active group of biomolecules with potential use in the formulation of emulsions. In this sense, the present study aimed to isolate and select yeasts from fruits that could produce SACs for essential oil emulsions. The *Candida krusei* M4CK was isolated from the *Byrsonima crassifolia* fruit to make SACs. This emulsification activity (E_{24}) was equal to or greater 50% in all carbon sources, such as olive oil, sunflower oil, kerosene, hexane, and hexadecane. E_{24} followed exponential growth according to the growth phase. The stability of emulsions was maintained over a wide range of temperatures, pH, and salinity. The OMBE4CK (melaleuca essential oil emulsion) had better and more significant inhibitory potential for biofilm reduction formation. In addition, bioemulsifier BE4CK alone on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm showed few effective results, while there was a significant eradication for *Staphylococcus aureus* biofilms. The biofilms formed by *S. aureus* were eradicated in all concentrations of OMBE4CK. At the same time, the preformed biofilm by *E. coli* and *P. aeruginosa* were removed entirely at concentrations of 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, and 6.25 mg/mL. The results show that the bioemulsifier BE4CK may represent a new potential for antibiofilm application.

Keywords: *Candida krusei*; essential oil; bioemulsifier; antimicrobial activity

check for updates

Citation: Araujo, J.M.M.; Monteiro, J.M.; Silva, D.H.d.S.; Veira, A.K.; Silva, M.R.C.; Ferraz, F.A.; Braga, F.H.R.; Siqueira, E.P.d.; Monteiro, A.d.S. *Candida krusei* M4CK Produces a Bioemulsifier That Acts on Melaleuca Essential Oil and Aids in Its Antibacterial and Antibiofilm Activity. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1686. https://doi.org/10.3390/antibiotics12121686

Academic Editors: Anna Duda-Madej, Joanna Kozłowska and Katarzyna Wińska

Received: 1 July 2023
Revised: 21 September 2023
Accepted: 25 September 2023
Published: 30 November 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

In recent years, the production of microbial Surface-Active Compounds (SACs) has attracted attention due to its diverse applicability, such as the ability to play an essential role in the solubility of insoluble compounds in water, in the binding of heavy metals, in the desorption of contaminants, in bacterial pathogenesis, and in adhesion and cell aggregation [1–4]. In addition to these characteristics, SACs have several advantages over synthetic surfactants; for example, low toxicity, lower critical micellar concentration (CMC), excellent biodegradability, and ecological acceptability [5]. The main microbial SACs are biosurfactants and bioemulsifiers; these have different chemical compositions and considerable biological activities [3,4,6].

SACs can exhibit antibacterial, antifungal, antiviral, and antitumor activities [1,7,8]. The properties of anti-adhesive and antibiofilm activities are also essential, as they can

inhibit adhesion and colonization by pathogenic microorganisms and remove pre-formed biofilms on silicone rubber and other biomedical instruments [9].

Another relevant factor about SACs is their production by various microorganisms, including bacteria, yeasts, and filamentous fungi [10,11]. Yeasts have been constantly used as leavening agents for SACs, as they are generally considered to have a safe (GRAS) status. Organisms characterized by GRAS status do not pose risks of toxicity or pathogenicity, which allows for their available applications in the pharmaceutical and food industries [11,12].

In the current scenario, yeasts have been considered the future molecules, as they have a GRAS *status* and synthesize SACs that act both in bioremediation and the biological field [6]. Several studies have shown that surfactant compounds produced by these microorganisms have potential biomedical applications since they exhibit antibiofilm, antibacterial, anticancer, larvicidal, and immunomodulatory activities [13].

Oil-in-water emulsions are efficient delivery systems for oily compounds, such as essential oils, dispersing the lipid phase as a colloidal dispersion [12,14]. Emulsifying agents prevent droplet coalescence by decreasing interfacial tension. SACs have attracted significant interest in elaborating emulsions and nanoemulsions, considering several physical and chemical characteristics [14]. They can be used to reduce volatility, increase stability, increase bioactivity, and extend the shelf life of essential oils for different applications, such as food, cosmetics, and the preparation of pharmaceutical formulations [14].

Previously, it was demonstrated that yeasts isolated from environments can produce emulsifiers that present great stability of emulsions [6]. Considering their applicability in biotechnology, studying the diversity of yeasts associated with fruits and the study of their molecules with emulsifying potential becomes enjoyable. They think that emulsions for essential oils are formulations of interest in the pharmaceutical industry and the preparation of cosmetics, among other applications. This study aims to isolate yeast biopolymers to prepare essential oil emulsions and quantify the synergistic effect against bacteria and microbial biofilms.

2. Results

2.1. Isolation of Yeasts Producing Surface-Active Compounds

In the present study, yeasts (n = 13) were isolated from fruits *Anacardium occidentale*, *Byrsonima crassifolia*, *Citrus reticulata*, and *Platonia insignis* (Table 1). MALDI-QTOF-MS identified the yeast strains as *Candida metapsilosis* and *Candida krusei*.

Table 1. Yeasts isolated from fruits and substrate as the sole carbon source for growth.

Fruit	Popular Name	Identification	Substrate
Anacardium occidentale	Cashew	*Candida krusei* C1CK	Glycerol
Anacardium occidentale	Cashew	*Candida krusei* C2CK	Glycerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida krusei* M1CK	Glycerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida krusei* M2CK	Glycerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida krusei* M3CK	Glycerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida krusei* M4CK	Glycerol
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida metapsilosis* M1CM	Sunflower oil
Byrsonima crassifolia	Murici	*Candida metapsilosis* M2CM	Sunflower oil
Citrus reticulata	Tangerine	*Candida metapsilosis* T2CM	Sunflower oil
Platonia insignis	Bacuri	*Candida metapsilosis* B1CM	Glycerol
Platonia insignis	Bacuri	*Candida metapsilosis* B2CM	Glycerol
Platonia insignis	Bacuri	*Candida metapsilosis* B3CM	Glycerol
Platonia insignis	Bacuri	*Candida metapsilosis* B4CM	Sunflower oil

The isolated yeasts were inoculated separately in minimal minerals containing sunflower oil and glycerol at concentrations of 2%. Table 1 demonstrates the best source of carbon and energy for growth.

2.2. Screening and Identification of SAC-Producing Microorganisms

2.2.1. Determination of Emulsifying Activity (E_{24})

This study aimed to investigate the emulsification properties of the surface-active compound, so the E_{24} test was mainly used to determine the presence of SACs in the samples.

The most efficient yeast strain in producing surface-active compounds with emulsifying activity for several carbon sources was isolated from the fruit *Byrsonima crassifolia*, popularly known as murici and identified as *Candida krusei* M4CK. E_{24} was determined, and the values were indicated (Supplementary Table S1). The SACs produced by *C. krusei* M4CK were the only ones that showed emulsifying activity in all carbon sources.

The emulsification activity of SACs contained in the supernatant of MM medium with glycerol as a carbon source was appreciable. The SACs, called *Candida krusei* M4CK, showed E_{24} values of 55%, 56.75%, 50%, 68.5%, 63.6%, and 63.95% for olive oil, sunflower oil, frying oil (used), kerosene, hexane, and hexadecane, respectively (Figure 1). The values of the final surface tension (mN/m) in the medium after cell growth were determined using a tensiometer and ranged from 44 to 62 mN/m (Supplementary Table S2).

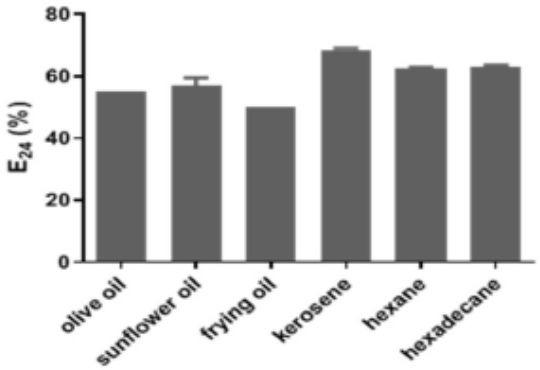


Figure 1. Emulsifying activity (E_{24}) presented by SACs produced by *Candida krusei* M4CK in different hydrophobic compounds.

2.2.2. Determination of Surface Tension

The production of biosurfactants and bioemulsifiers by yeast isolates can be identified indirectly through surface activity and emulsifying activity. In this study, it was observed that the compound BE4CK showed a reduction in surface tension from 72 mN/m to 44 mN/m. This result demonstrated no reduction in surface tension to values below 30 mN/m. For this reason, it was characterized as a bioemulsifier (BE4CK).

2.3. Determination of Chemical Composition

Analyzes of the chemical composition of SAC (BE4CK) revealed the presence of carbohydrates (46%), protein (38%), and a lower amount of lipid parts (3%). GC characterized the BE4CK that indicated in its structure; the major fatty acid was 9-octadecenoic acid, (E)- (58.43%), followed by methyl stearate (16.72%) and hexadecanoic acid (13.44%). Moreover, the monosaccharides were mannose (84.26% and glucose (15.74%).

2.4. Growth Kinetics

C. krusei M4CK growth and emulsifying activity in the mineral medium supplemented with 2% glycerol are shown in Figure 2. For the strain, bioemulsifier and E_{24} production follow an exponential growth phase growth. Bioemulsifier production continues even when microbial growth ceases. About 52.3% of E_{24} activity in kerosene was obtained in the exponential growth phase in the first 40 h; after this period, E_{24} activity increased, reaching a percentage $\geq$ 60% in 60 h–144 h. These results indicate that the emulsification activity is

partially associated with growth, as the peaks of bioemulsifier production did not coincide. The highest stability and emulsification activity was achieved at 144 h (Figure 2).

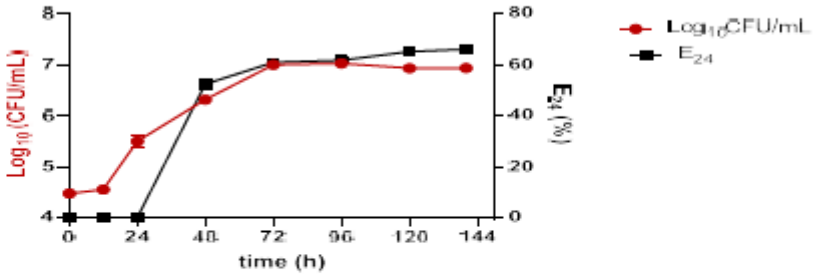


Figure 2. Kinetics of cell growth by *Candida krusei* M4CK and emulsifying activity by BE4CK. BE4CK: Bioemulsifier; CFU/mL: colony-forming unit per milliliters; E_{24}: emulsifier activity.

2.5. *Evaluation of Bioemulsifier Stability*

2.5.1. Effect of Temperature on the Emulsifying Activity

After being subjected to the autoclaving process at 120 °C for 15 min, BE4CK showed stability and maintenance of emulsifying properties since it emulsified all the hydrophobic sources (Figure 3). The E_{24} of the bioemulsifier was ≥50% in olive and sunflower oil, while for kerosene, hexane, and hexadecane hydrocarbons, it was greater than 60%. For frying oil (E_{24} of 40%), there was a 10% reduction in the primary emulsifying activity (Figure 3).

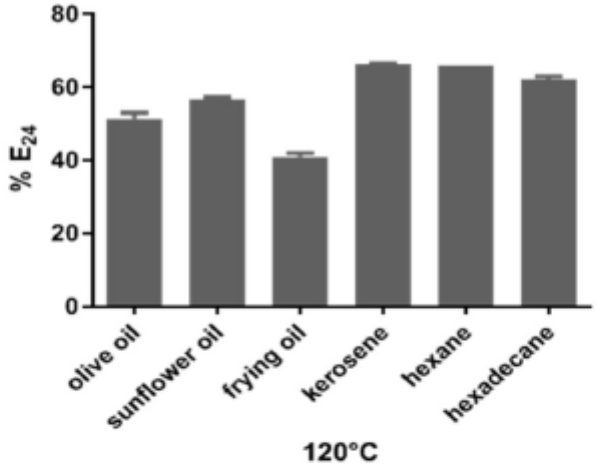


Figure 3. Emulsifying activity (E_{24}) of BE4CK after heating to 120 °C. Values indicate the mean of duplicate values and error bars represent the standard deviation (SD).

2.5.2. Effect of pH on the Emulsifying Activity

The SAC produced by *C. krusei* showed emulsifying activity for different sources at acidic and basic pH (Figure 4). At acidic pHs (3–6), emulsification activity was ≥44% for all substrates (sunflower, olive, and kerosene), while at basic pHs, emulsification was characterized only for kerosene hydrocarbons. In this source, there was no marked variation in E_{24} in the pH ranges of 3 to 9. From pH eight onwards, the bioemulsifier produced by the *C. krusei* M4CK strain could emulsify only kerosene (Figure 4). In the range of pH 10, there was no emulsification stability for any of the sources.

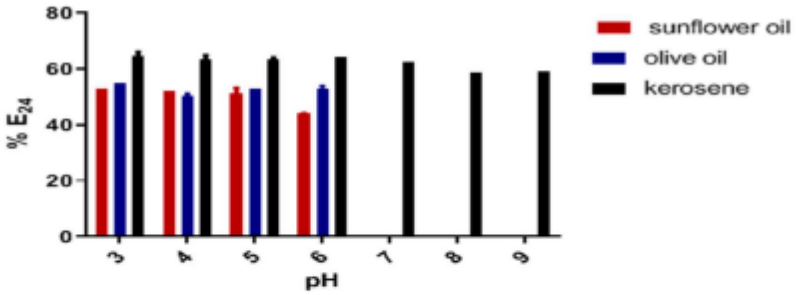


Figure 4. Emulsifying activity (E_{24}) of BE4CK in different pH ranges. Values indicate the mean of duplicate values, while error bars represent standard deviation in pH: hydrogen potential.

2.5.3. Effect of Salinity on Emulsifying Activity

It was observed that the E_{24} of the bioemulsifier in concentrations (10%, 30%, and 50%) of magnesium chloride ($MgCl_2$), sodium chloride (NaCl), and calcium chloride ($CaCl_2$) had contents ranging from 40 to 55% in vegetable oils (sunflower and olive) and for kerosene, a percentage $\geq$ 56%. The highest E_{24} value was obtained with kerosene, while the lowest was registered with olive oil (Figure 5).

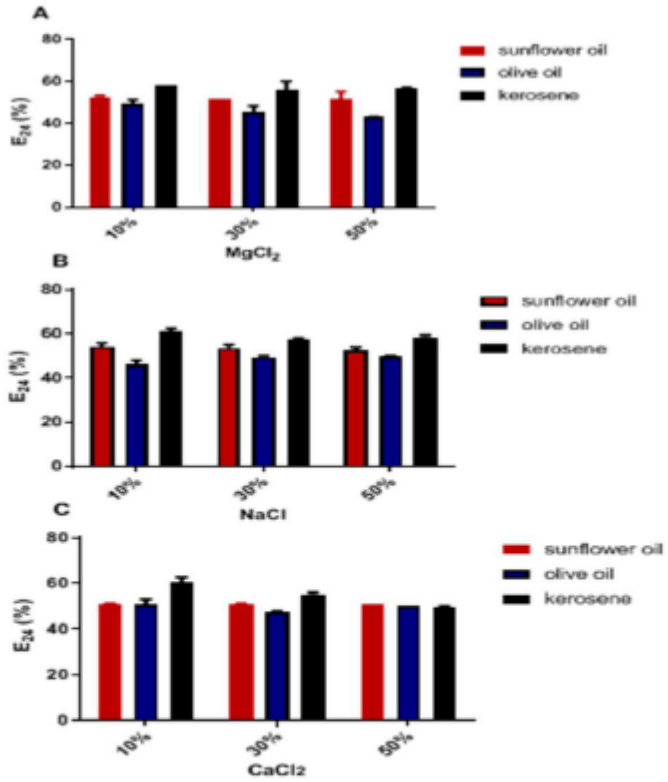


Figure 5. Stability of emulsifying activity in different salt concentrations. (**A**) $MgCl_2$: magnesium chloride; (**B**) NaCl: sodium chloride; (**C**) $CaCl_2$: calcium chloride. Values are three independent experiments' mean ± standard deviation (SD).

The stability of the emulsifying activity (E_{24}) was maintained at concentrations of 50% of the salts. It was also verified that as the salinity increased, there was a slight reduction in the emulsification rate. However, changes in salt concentrations do not influence E_{24} values (Figure 5).

2.6. Assessment of Bioemulsifier Cytotoxicity

By the toxicity test, BE4CK showed no toxicity in VERO cells at concentrations of 1024 µg/mL–2 µg/mL, and the percentage of cell viability was ≥88.89% (Figure 6).

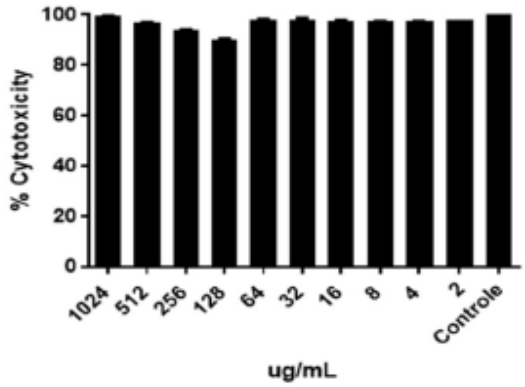


Figure 6. Evaluation of the cytotoxicity of the bioemulsifier BE4CK (1024 µg/mL–2 µg/mL) in VERO cells.

2.7. Determination of Antimicrobial Activity

When evaluating antimicrobial activity through the agar diffusion assay (Supplementary Figure S1), it was found that isolates of *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *S. aureus* ATCC 25923 were significantly sensitive to the essential oil of melaleuca considering $p < 0.05$ (Table 2). In the case of BE4CK, the growth of microorganisms was not affected. The emulsion OMBE4CK showed an increase in the growth inhibition zone, corresponding to 34.5 mm for *E. coli* ATCC 25922. In comparison, melaleuca oil alone formed an inhibition zone of 28.5 mm for this microorganism. Thus, the compound combination showed antimicrobial activity, making *E. coli* ATCC 25922 more sensitive (Table 2 and Supplementary Figure S1).

Table 2. Antimicrobial activity of the melaleuca essential oil, bioemulsifier alone, and the combination of BE4CK and OMBE4CK (emulsion) against microorganisms.

Compound	Antimicrobial Activity (mm)			
	E. coli ATCC 25922	*E. faecalis* ATCC 35218	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S. aureus* ATCC 25923
BE4CK (25 mg/mL)	N	N	N	N
Melaleuca essential oil	28.5 ± 2.1	26 ± 1.4	17 ± 2.8	33.5 ± 0.7
OMBE4CK	34.5 ± 6.3	14.5 ± 2.1	-	24 ± 1.4

N—no antimicrobial activity. Values are three independent experiments' mean ± standard deviation (SD). ($p < 0.05$)—a significant difference in relation to concentrations.

Unlike BE4CK, the OMBE4CK emulsion and melaleuca essential oil showed significant inhibitory activity against *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 35218, and *S. aureus* ATCC 25923. The emulsion could not inhibit the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2.8. Determination of Antibiofilm Activity

2.8.1. Inhibition of Biofilm Formation on Polystyrene

The antibiofilm potential of the bioemulsifier (BE4CK) produced by *C. krusei* M4CK was determined by its ability to impair and inhibit biofilm formation by *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, and *P. aeruginosa* ATCC 27853. The compound showed a dose-dependent effect, with the most significant activity at 25 mg/mL concentrations ($p < 0.001$). Inhibition percentages for these three isolates ranged from 51 to 75% at a concentration of 25 mg/mL of the bioemulsifier (Figure 7A–C). Applied at this concentration, BE4CK showed significant ($p < 0.001$) inhibitory potential against *S. aureus* ATCC 25923 (71%), *E. coli* ATCC 25922 (75%), and *P. aeruginosa ATCC* 27853 (51%). Even at lower concentrations (1.56 mg/L–3.12 mg/L) it was effective against *S. aureus* ATCC 25923 (16–40%), *E. coli* ATCC 25922 (18–34%), and *P. aeruginosa* ATCC 27853 (16–26%), respectively.

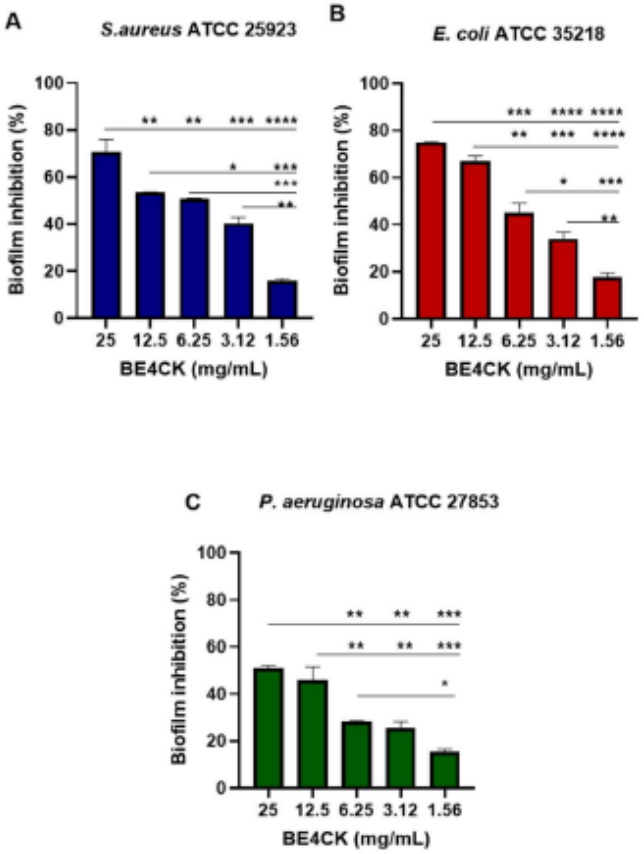


Figure 7. BE4CK inhibitory activity on biofilm formation by microorganisms. (**A**) *S. aureus* ATCC 25923; (**B**) *E. coli* ATCC 25922; (**C**) *P. aeruginosa* ATCC 27853. Values are three independent experiments' mean ± standard deviation (SD). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.001$), *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$)—a significant difference in relation to concentrations.

The ability of the emulsion (OMBE4CK) resulting from the combination of BE4CK bioemulsifier and melaleuca essential oil to reduce biofilm formation by *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, and *P. aeruginosa* ATCC 27853 was evaluated using microtiter plates of 96 wells (Figure 8A–C).

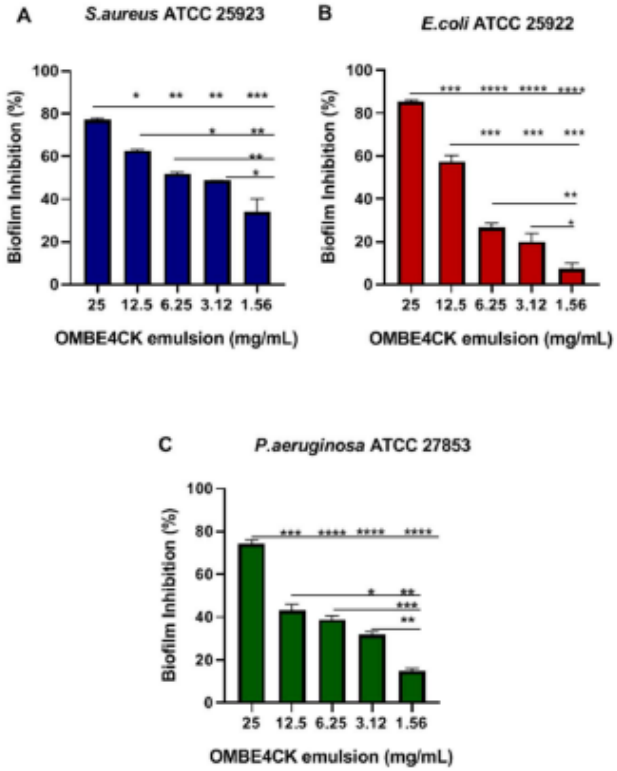


Figure 8. OMBE4CK inhibitory activity on biofilm formation by microorganisms. (**A**) *S. aureus* ATCC 25923; (**B**) *E. coli* ATCC 25922; (**C**) *P. aeruginosa* ATCC 27853. Values are the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.001$), *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$)—a significant difference in relation to concentrations.

For both strains, the use of emulsification at all concentrations resulted in significant inhibition of biofilm formation ($p < 0.05$). A biofilm inhibition of 77% for *S. aureus* ATCC 25923 (Figure 8A), 85% for *E. coli* ATCC 25922 (Figure 8B), and 74% for *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figure 8C) was obtained using the concentration of 25 mg/mL ($p < 0.001$). The antibiofilm activity of the emulsion (1.56 mg/mL–25 mg/mL) gradually decreased at low concentrations (1.56 mg/mL and 3.12 mg/mL), resulting in an inhibitory effect of 34% and 49% for *S. aureus* ATCC 25923 (Figure 8A); 7% and 20% for *E. coli* ATCC 25922 (Figure 8B); and 15% and 31% for *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figure 8C), respectively. Based on these results, the emulsion produced a significant antibiofilm effect against both pathogens.

2.8.2. Inhibition of Biofilm Formation in an Enteral Feeding Catheter Quantitative Analysis

The antibiofilm potential of the emulsion was determined by its ability to inhibit biofilm formation by *S. aureus* ATCC 25923 in an enteral feeding catheter, which corresponds to a polyurethane medical device (Figure 9). In the 25 mg/mL concentration, the emulsion showed a significant ($p < 0.001$) inhibitory potential of 43% for *S. aureus* ATCC 25923. While at lower concentrations (3.12 mg/mL–12.5 mg/mL), the antibiofilm activity of the emulsion gradually decreased, resulting in an inhibitory effect varying significantly ($p < 0.05$) between 14 and 27%.

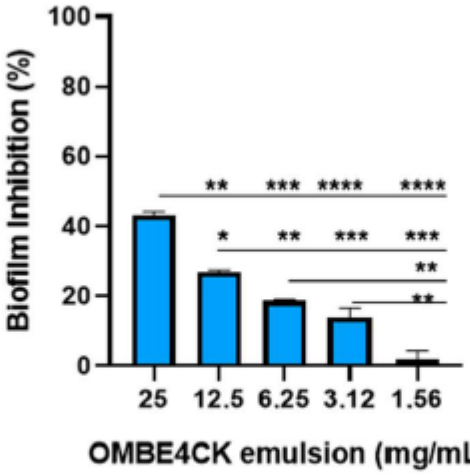


Figure 9. Inhibitory emulsion (OMBE4CK) activity on biofilm formation by *S. aureus* ATCC 25923 on the enteral feeding catheter surface. Values are mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments. * ($p < 0.05$), **($p < 0.001$), *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$)—a significant difference in relation to concentrations.

Semi-Quantitative Analysis

Through the semi-quantitative method of rolling catheters in a Petri dish containing TSA, catheter fragments exposed to the maximum concentration (25 mg/mL) of the OMBE4CK emulsion obtained a percentage of 4% contamination (with growth < 15 CFU/plate) by *S. aureus* ATCC 25923, whereas at the lowest concentrations (1.56 mg/mL–12.5 mg/mL), there was a range from 23% to 94% of colonization (with growth ≥ 15 CFU/plate) of *S. aureus* ATCC 25923 to polyurethane catheter surfaces (Table 3). At the concentration of 1.56 mg/mL of the emulsion, there was a 94% colonization of *S. aureus* ATCC 25923. Thus, biofilm inhibition depends on the emulsion concentration.

Table 3. Quantitative CFU/mL of *S. aureus* ATCC 25923 on the catheter surface.

Emulsion Concentration (mg/mL)	CFU/Plate		Classification
	N°	%	
25	4	14	Contamination
12.5	71	23%	Colonization
6.25	83	26%	Colonization
3.12	213	68%	Colonization
1.56	295	94%	Colonization
Control	314	100%	Colonization

CFU/mL: colony-forming unit per milliliter.

2.8.3. Biofilm Eradication

Biofilms formed by *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, and *P. aeruginosa* ATCC 27853 within 48 h and treated with the BE4CK were effectively disrupted at the highest concentration (25 mg/mL). At this concentration, the dispersion of biofilms formed by these microorganisms ranged from 10% to 55%, while at the lowest concentration (1.56 mg/mL), it ranged from 2% to 36% (Figure 10).

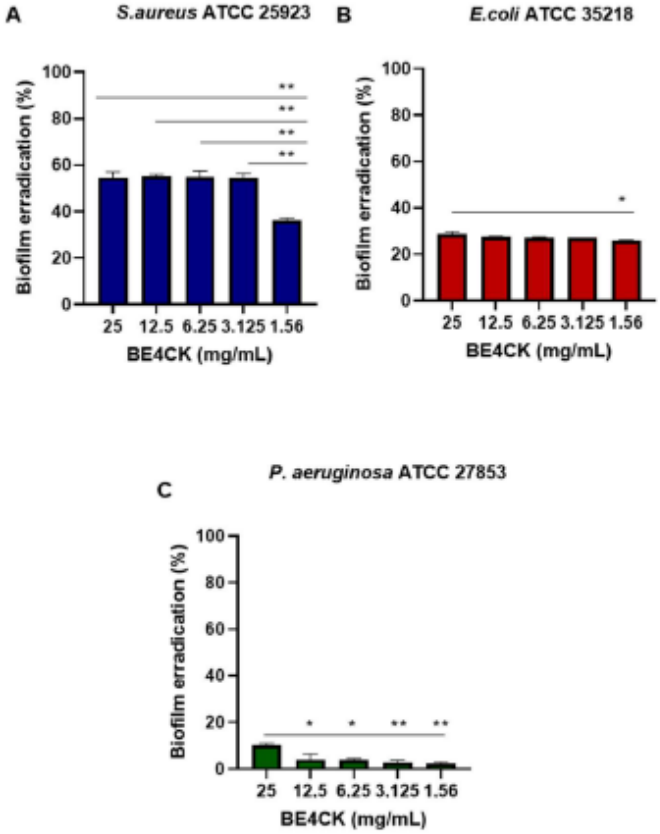


Figure 10. Eradication of the biofilm by the bioemulsifier BE4CK against microorganisms. Values are three independent experiments' mean ± standard deviation (SD). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.001$)—a significant difference in relation to concentrations.

The biofilm formed by *S. aureus* ATCC 25923 was susceptible to the action of the BE4CK at all concentrations used (Figure 10A). At 25 mg/mL–3.12 mg/mL concentrations, the compound promoted eradication rates ranging from 54% to 55%. While at the lowest concentration (1.56 mg/mL), it removed 36% of the preformed biofilm. The increase in the BE4CK concentration did not promote significant differences in removing the *S. aureus* ATCC 25923 biofilm. Thus, eradicating the biofilm did not depend on the concentration of the BE4CK.

The action of BE4CK on the biofilm of *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 showed little effective results (Figure 10B,C). Preformed biofilms were significantly ($p < 0.05$) eradicated at concentrations of 1.56 mg/mL to 25 mg/mL of BE4CK, with biofilm reduction ranges from 29 to 26% *E. coli* ATCC 25922 (Figure 10B) and 2 to 10% for *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figure 10C).

The emulsion OMBE4CK promoted significant dispersion ($p < 0.0001$) of the biofilm in all microorganisms tested (Figure 11A,B). The biofilms formed by *S. aureus* ATCC 25923 were utterly (100%) eradicated at all concentrations (1.56 mg/mL to 25 mg/mL) of the emulsion with no apparent dose–effect relationship between concentrations. The preformed biofilm by *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* 27853 was removed entirely ($p < 0.0001$) only at concentrations of 6.25 mg/mL–25 mg/mL, whereas at concentrations of 1.56 mg/mL

and 3.12%, biofilm removal ranged from 39% to 77% for *E. coli* ATCC 25922 (Figure 11A) and 39% to 52% for *P. aeruginosa* 27853 (Figure 11B).

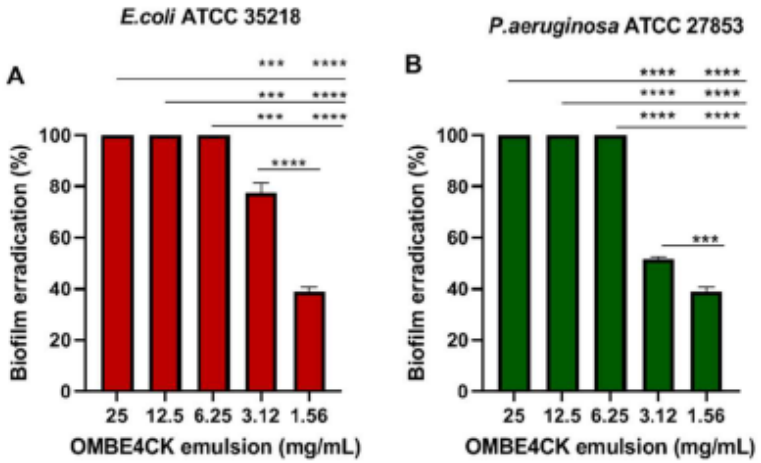


Figure 11. Biofilm eradication by OMBE4CK (emulsion) against microorganisms. (**A**) *E. coli* ATCC 25922, (**B**) *P. aeruginosa* ATCC 27853. Values are three independent experiments' mean ± standard deviation (SD). *** ($p < 0.0001$), **** ($p < 0.0001$)—a significant difference in concentrations.

3. Discussion

3.1. Production and Characterization of the Bioemulsifier Produced by Candida krusei M4CK

In the present study, the yeasts were identified as belonging to *Candida metapsilosis* and *Candida krusei* species. Yeast is widely present in the environment, and many colonize soils, foods, leaf surfaces, and flowers [15].

Candida krusei is an ascomycetic yeast and is widely distributed in nature. In addition, it is frequently identified in cocoa fermentation in different places [16]. Despite being the same yeast, publications related to industrial applications often use the species names *Pichia kudriavzevii*, *Candida glycerinogenes*, and *Issatchenkia orientalis* in preference to *C. krusei* due to the negative safety connotations of using a pathogen in a biotechnological or food context [17].

In this study, the yeasts were isolated from the fruit *B. crassifolia*, popularly known as murici; this fruit originates from Central and South America and has been used for food production and folk medicine [18]. The isolation of yeasts with the potential to produce surface-active compounds indicates that the producers of SACs are widely distributed on the surfaces, internally found in the pulp of various fruits and plants, and have the potential for use in emulsifying systems and different biotechnological processes [19,20].

The *C. krusei* M4CK strain had better growth and performance in producing SACs with glycerol as a carbon and energy source. This discrepancy may be related to the type of carbon sources since these compounds can act in different ways, such as altering the structure of the biosurfactants and bioemulsifiers produced and, consequently, their emulsifying properties [21].

As the type of carbon source also plays a critical role in the production of surfactant compounds by microorganisms [22], it appears that the absorption of glycerol can help to optimize the production processes of biosurfactant glycolipids, such as the production of sophorolipids (SL) by *Starmerella bombicola* [23]. Like the present study, glycerol was reported as one of the best carbon sources for glycolipid production by *Pseudomonas* sp. [24], *a substrate suitable for* higher production and maximum emulsifying activity of the bioemulsifier produced by *Bacillus* sp. [25].

The bioemulsifier of *C. krusei* M4CK was called BE4CK. It showed an emulsifying activity equal to or greater than 50% in olive oil, sunflower, after frying, and hydrocarbons such as kerosene, hexane, and hexadecane. The best emulsifying activities of SACs were demonstrated in the presence of hydrocarbons such as kerosene, hexane, and hexadecane, in which an $E_{24} \geq 63.6\%$ was reached. According to Willumsen and Karlson [26], E_{24} values equal to or greater than 50% are considered significant, and for Bosch et al. [27], an emulsion with this value is considered stable.

BE4CK can be classified as an amphiphilic biopolymer that contains monosaccharides (mannose and glucose) and long-chain aliphatic groups, such as 9-octadecenoic acid and hexadecanoic acid, in its polymer structure and is effective in emulsifying kerosene. The emulsification for BE4CK can be achieved through the interaction of hydrophobic (fatty acids) with hydrocarbons and the interaction of hydrophilics (monosaccharides) with water molecules. Furthermore, as it is a polymer, there is a greater probability of interaction due to the stearic phenomenon, which can lead to a more significant layer of emulsification of petroleum-derived hydrocarbons than vegetable oils. It is believed that there is a more outstanding balance of forces that stabilize kerosene emulsions, providing a higher emulsified layer [28]. Similar to the presented results, sophorolipids synthesized by yeasts of the genus *Meyerozyma* sp. were able to emulsify in hydrocarbons (kerosene, hexane, and hexadecane) and olive oil, and crude oil, the emulsifying activity for these compounds was more significant than 60% [28].

The bioemulsifier BE4CK showed a surface tension of the water of 44 mN/m. Other SACs, such as the glycolipid type produced by *Rhodotorula mucilaginosa* LBP5, reduced the surface tension of water to 40.7 mN/m [29]. However, it is observed that the surface tension of SACs produced by yeasts can be as low as 40 mN/m, followed by the glycolipid-type biosurfactant produced by *Rhodotorula* sp.CC01, whose critical micellar concentration tests indicated a value of 33.39 mN/m [30].

A surface tension reduction value similar to that obtained in the assay using BE4CK was observed for *Candida tropicalis* cultivated in n-hexadecane; this yeast produced an extracellular emulsifier that was able to reduce the surface tension of water from 70 mN/m to 49.5 mN/m. The same compound emulsified several hydrocarbons, including aromatic hydrocarbons [31]. Other SAC-producing yeasts have been identified, such as *Meyerozyma caribbica*, *Yarrowia lipolytica*, and *Trichosporon mycotoxinivorans* which, despite producing potent bioemulsifiers with high emulsification values in hydrocarbons, did not reduce the surface tension of water when tested [22,32,33].

E_{24} follows exponential growth for *C. krusei* M4CK from the growth phase up to 144 h, obtaining a higher emulsifying activity between 60 h and 100 h in the stationary phase. These data showed a linear correlation between possible cell concentration and emulsifying activity. This behavior can be explained by the fact that the emulsifier is being produced to improve the assimilation of the carbon source. In the production associated with growth, there are parallel relationships between growth, substrate utilization, and the production of surface-active compounds [22,34,35]. Bioemulsifier production kinetics partially associated with cell growth have also been reported for yeast species *Geotrichum* sp. and *Trichosporon montevideense* [6].

Bioemulsifier effectiveness depends on emulsifying activity over various temperatures, pH, and salinity [36]. The bioemulsifier BE4CK maintained stable emulsions over a wide temperature range (120 °C) for sources of olive and sunflower oil ($E_{24} \geq 50\%$) and hydrocarbons ($E_{24} \geq 63\%$) such as kerosene, hexane, and hexadecane. However, for the frying oil (E_{24} of 40%), there was a 10% reduction in the emulsifying activity. Such results demonstrate that BE4CK is thermostable.

The stability of the bioemulsifier produced by *C. lipolytica* at high temperatures has also been reported at temperatures up to 100 °C [36]. Likewise, biosurfactant sophorolipids produced by *Candida keroseneae* showed high thermal stability with a maximum emulsification activity of 60% in kerosene and preserved 97.25% of its original activity at 120 °C [37]. The reduction in emulsifying activity may be related to the denaturation of the protein

component of the bioemulsifier during heat treatment. This property depends on the molecule's chemical structure, as many emulsifiers are stable in significant temperature variations or show minor deviations in higher temperatures [22].

The stability of emulsification by BE4CK was maintained for sunflower and olive oil sources only at acidic pH (3–6). At the same time, BE4CK maintained emulsifier stability in kerosene in all pH ranges (3–9). The inhibition of oil activity and the pronounced reduction in kerosene were recorded at pH values above 6.0. The decrease in emulsifying activity is likely related to structural changes in bioemulsifiers caused by extreme pH conditions [33,38]. In addition to maintaining emulsifying activity at high temperatures and pH ranges, the bioemulsifier BE4CK carried the E_{24} in different concentrations of $MgCl_2$, NaCl, and $CaCl_2$. Due to its nature, the amphiphilic biopolymer BE4CK appears to be more stable and less susceptible to the action of ions for coalesce activity. Similar results to the present study were demonstrated for the bioemulsifier produced by *Pseudomonas stutzeri* NJtech 11-1. The crude bioemulsifier can tolerate 50% NaCl, $MgCl_2$, and $CaCl_2$ with only a 29.8% loss of E_{24}. *Meyerozyma caribbica* yeasts also produced stable bioemulsifiers at high salinity levels [39]. In contrast, a bioemulsifier produced by *Candida lipolytica* using burned motor oil as a hydrophobic substrate showed that its emulsifying stability at 10% NaCl concentration was inactive [36].

By the toxicity test, the bioemulsifier showed no toxicity at the concentrations. Cells remained viable and did not undergo cell death; cell viability was ≥88.89%. Toxicity tests with SACs of biosurfactants produced from species of the genus *Candida* also indicated the absence of toxicity of these biomolecules against marine bioindicators [40]. Our results were in accordance with previous work by [41], who reported no risk of toxicity bioemulsifier produced by *S. cerevisiae* against normal epithelial kidney cells at concentrations up to 250 µg/mL. However, further, in vivo tests are required to confirm the safety of bioemulsifier BE4CK.

3.2. Antibacterial and Antibiofilm Activity of the C. krusei M4CK Bioemulsifier with Melaleuca Essential Oil

When evaluating the antimicrobial activity through the diffusion assay, it was verified that the isolates of *E. coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *S. aureus* ATCC 25923 did not show sensitivity to the bioemulsifier BE4CK. However, when combined with melaleuca essential oil emulsion (OMBE4CK), they exhibited antimicrobial activity for *E. coli* ATCC 25922 isolates, *E. faecalis* ATCC 35218, and *S. aureus* ATCC 25923. The antimicrobial activity of the OMBE4CK emulsion was more efficient for *E. coli* ATCC 25922 and did not cause sensitivity in *P. aeruginosa* ATCC 27853. These data indicate that melaleuca essential oil can be a candidate for producing formulations with surface-active compounds synthesized by microorganisms.

Antimicrobial performance similar to the bioemulsifier BE4CK was demonstrated for sophorolipid produced by non-pathogenic yeasts of *Candida bombicola* (ATCC 22214); this biosurfactant could not inhibit the growth of *E. coli* alone [42]. But, in combination with antibiotics, it promoted a total inhibition of the development of the microorganism. This ability is not only related to the inhibitory effect increased by the additive action of two antimicrobial agents; it may also be associated with the performance of SL to facilitate the entry of molecules into bacterial cells [42]. So, the antimicrobial effect of biosurfactants is due to their potential to form pores within cell membranes; this feature can increase the effectiveness of antimicrobial agents [43].

Antimicrobial resistance to antibiotics is often related to the ability of microorganisms to form biofilms, which exhibit dozens of attributes within this structure, making them difficult to eliminate [44]. Given this fact and the antimicrobial capacity of the emulsion (BE4CK and OMBE4CK), the action of the bioemulsifier and the emulsion in the inhibition and eradication of biofilms formed by *E coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *S. aureus* ATCC 25923.

The compound showed a concentration-dependent effect, with the best biofilm formation inhibitory activity against bacterial pathogens. Higher BE4CK activity was found in. *S. aureus* ATCC 25923, while less activity was demonstrated for *P. aeruginosa* ATCC 27853. The BE4CK activity profile may be related to the cell wall characteristics of both bacteria.

The antibiofilm activity of the emulsion gradually decreased at lower concentrations. Melaleuca essential oil has already demonstrated antibiofilm activity against *S. aureus* and *E. coli* [45,46]. On the other hand, there is previous evidence of the synergism between SACs and essential oils; this fact reinforces the hypothesis of the ability of SACs to facilitate the entry of antimicrobial molecules into cells [47]. In addition, melaleuca essential oil emulsions prove to be an excellent microbial control strategy, as their improved tissue infiltration capacity and ability to stabilize the volatilization of terpenes, their main antimicrobial compounds, are considered. In this study, tea tree oil emulsions (OMBE4CK) were stable up to 250 (E_{250}) evaluation days, which enhances their use in formulations.

Biofilm formation on medical devices is one of the leading causes of nosocomial infections and represents a severe public health problem. As a possible alternative for solving this problem, the potential of the emulsion was also evaluated for inhibiting biofilm formation in polyurethane catheters at different concentrations. At the highest concentration (25 mg/mL), OMBE4CK showed a significant % inhibitory potential of 43% for *S. aureus* ATCC 25923. Other authors also reported this ability to interfere with biofilm formation. Mendes et al. [48] showed that a mixture of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* CBS 6009 with sodium dodecyl sulfate (SDS, commercial surfactant) demonstrated inhibitory activity of biofilm formation by *S. aureus* and *E. coli* [48]. Another study proposed by Pontes et al. [49] determined that the presence of sophorolipids on the surface of the catheter (silicone) decreased the hydrophobicity of the material and the formation of biofilm by *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922 [49].

The OMBE4CK emulsion showed better activity in removing biofilms compared to the isolated action of BE4CK. Biofilm eradication may be related to the bacteriostatic and bactericidal effects of the OMBE4CK emulsion.

Biofilms are microbial communities that are difficult to eliminate. The potential of the bioemulsifier BE4CK and the emulsion OMBE4CK in eradicating biofilms was evaluated to seek strategies to disperse this structure. The treatment with the bioemulsifier alone on the biofilm of *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 did not show effective results in all concentrations. In contrast, *S. aureus* ATCC 25923 biofilms were significantly eradicated.

The low dispersion of the biofilm of *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 can be attributed to the difficulty of the SACs in penetrating the biofilm matrix; in this sense, higher concentrations of SACs are necessary for the detachment of the preformed biofilm. A surface-active substance must penetrate the biofilm, and the substrate interface must detach from the biofilm [50]. After their penetration, they can change surface properties, leading to biofilms' separation from surfaces [50].

In the complete eradication of the *S. aureus* biofilm, the pit is probably related to the ability of the *bioemulsifier BE4CK* to increase the action of melaleuca essential oil, facilitating its entry through the biofilm matrix. The biofilm matrix presents a dynamic to be considered when applying a particular antibiotic compound. In this case, the action to dispose of the cells can be improved using SACs that alter the surface characteristics, such as hydrophobicity or hydrophilicity, in addition to the electrical charge characteristics (repulsion and attraction) [51]. Emulsified (containing essential oils) systems can be interesting in controlling microbial biofilms. The present study observed that the emulsion at higher concentrations was more effective than the bioemulsifier BE4CK in eradicating the *P. aeruginosa* biofilm.

4. Materials and Methods

4.1. Yeast Isolation

For the isolation and selection of yeasts of interest, fruits of the species *Anacardium occidentale*, *Byrsonima crassifolia*, *Citrus reticulata*, and *Platonia insignis* were collected from

plants present in sites located in the Municipalities of São José de Ribamar and São Luís, Maranhão. The fruits selected for yeast isolation were in their intermediate stage of maturation. The harvested fruits were stored in thermal boxes with ice and transported to the Applied Microbiology Laboratory of CEUMA University for further processing.

The fruits were initially sanitized with 5% sodium hypochlorite to isolate SAC-producing yeasts and washed three times with sterile distilled water to remove sodium hypochlorite. Subsequently, approximately 20 g of fruit samples were inoculated into Erlenmeyer flasks with the addition of a minimal mineral medium (MM) containing (in g/L) 1.0 g K_2HPO_4, 1.0 g KH_2PO_4, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 g NH_4NO_3, 0.002 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, and 0.2% yeast extract with 2% sunflower oil or glycerol added as the only carbon source. The final pH of the medium was 7.2.

The flasks were incubated at 30 °C with agitation at 140 rpm for seven days. After incubation, 1 mL of the cultures were serially diluted in a sterile saline solution (0.85% NaCl). Aliquots of 50 µL of decimal dilutions were spread on the surface of the Sabouraud Dextrose Agar medium (SDA, Difco TM, Detroit, MI, USA) to isolate, quantify, and characterize colonies.

Samples of yeast colonies were inoculated in the SDA medium to obtain a pure culture; later, microcultures were performed for morphological characterization. The yeasts were kept in inclined tubes with the SDA medium and stored in cryotubes at−80 °C in Sabouraud broth (Difco) with 20% glycerol.

4.2. Screening and Identification of SAC-Producing Yeasts

4.2.1. Characterization of Emulsifying Activity (E_{24}) of Culture Supernatant

The yeast isolates were inoculated at an initial concentration of 0.1 OD_{600} nm ($\approx 1 \times 10^7$ CFU/mL) in Erlenmeyer flasks with 50 mL of a minimal mineral medium (MM) containing (in g/L) 1.0 g K_2HPO_4, 1.0 g KH_2PO_4, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 g NH_4NO_3, 0.002 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, and 0.2% yeast extract with the addition of 2% glycerol or 2% sunflower oil (as carbon sources for SAC production) as proposed by Monteiro et al. [6], with modifications. Each yeast isolate was incubated on the carbon sources to evaluate the production of SACs. The microbial cultures were incubated for up to 144 h at 30 °C under agitation at 140 rpm. After incubation, the cultures were centrifuged at 5000× *g* for 10 min, and the supernatants were used in the emulsifying activity (E_{24}) test. The cell-free supernatant's surface tension (TS) was determined using a Du Nouy ring-type tensiometer (Manual Tensiometer, model k6, Krüss GmbH, Hamburg, Germany). The TS measurement was performed at 20 °C with modifications). The microbial cultures were performed in duplicate.

The emulsifying activity was determined by the emulsification index (E_{24}), in which the supernatant was applied directly into test tubes in the proportion of 50% (2.5 mL) and 50% (2.5 mL) of different hydrophobic substrates (olive oil, sunflower oil, and fried foods, kerosene, hexane, and hexadecane). The mixture was subjected to vortex agitation for 2 min. After 24 h, the emulsification activity (E_{24}) was determined by dividing the height of the emulsified layer by the total size of the mixture, expressed as a percentage [52]. For tests, rhamnolipids (100 mg/mL) (Di-rhamnolipid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were a positive control and the MM medium was a negative control. The emulsifying activity tests were performed in triplicate.

MALDI-TOF MS-based identification of yeast isolates was performed according to Bruker Daltonics (Bremen, Germany) using the protocol in Aslani et al. [53].

4.2.2. Determination of the Surface Tension of Water in the Presence of a Bioemulsifier

Surface tension (TS) was measured using a Du Nouy ring-type tensiometer (Manual Tensiometer, model k6, Krüss GmbH, Hamburg, Germany). The TS measurement was performed at 20 °C with modifications. For tests, sodium dodecyl sulfate (SDS, 100 mg/L) was the positive control and the MM medium was the negative control. The TS measurement was performed at 20 °C with modifications. The concentration of the bioemulsifier

used varied from 0.01 mg/mL to 10 mg/mL. The round hanging from the scale's hook was immersed in the liquid. Then, the call was slowly pulled upwards, lowering the sample plate. Finally, the force applied to the ring during traction across the surface was recorded. The measurement was repeated three times; the platinum ring was washed three times with distilled water and three times with alcohol between measurements [6]. Measurement of the surface tension of the distilled water was used as a control.

4.3. Chemical Composition of SACs

Standard methods were used to determine the chemical composition of the bioemulsifier. The carbohydrate content was determined by the phenol–sulfuric acid method of Dubois et al. [54] using D-glucose as a standard. Protein content was measured as described by Bradford et al. [55] using bovine serum albumin as a standard. Lipid content was estimated using the K117—BIOCLIN monoreagent triglyceride kit. All experiments were performed in triplicate. The carbohydrate and lipid composition of the bioemulsifier (SAC) was determined by gas chromatography and mass spectrometry using the previously (GC-MS) developed protocol [6].

4.4. Growth Kinetics

The inoculum was prepared from *C. krusei* cells incubated in a solid Sabouraud medium for 24 h at 32 °C and washed three times with saline solution (NaCl 0.85%, *w*/*v*). After washing, the cells were resuspended in 50 mL plastic tubes containing 20 mL of the MM medium. Optical density readings at 600 nm were performed. The values obtained determined the volume to be transferred to the test flasks for a final concentration of 0.02 OD, corresponding to ($\approx 5 \times 10^6$ CFU/mL). The experiments were conducted in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of the MM medium added with 2% glycerol. The flasks were incubated at 32 °C under continuous agitation at 180 rpm for up to 144 h. The samples were removed at 12 h or 24 h to determine cell concentration and emulsifying activity. The tests were performed in three repetitions.

Cell growth was determined by removing the aliquots from the culture medium and obtaining decimal dilutions from which samples were removed, serially diluted, and plated in a solid Sabouraud medium to determine CFU/mL. The values obtained were converted into Log_{10} of CFU/mL [6]. The emulsification activity (E_{24}) described in Section 4.2.1 also evaluated the supernatant samples for emulsifying activity. The tests were performed in three repetitions.

4.5. Stability of the Bioemulsifier in Different NaCl, $MgCl_2$, and $CaCl_2$ Concentrations, Autoclavings, and pH Variations

The effects of different concentrations (10, 30, and 50%) of magnesium chloride ($MgCl_2$), sodium chloride (NaCl), and calcium chloride ($CaCl_2$), a temperature of 121 °C for 15 min (autoclaving), and different pH values (3–10) were analyzed in the activity of the bioemulsifier BE4CK. The emulsification activity (E_{24}) was evaluated after adjusting the pH minimum medium with sodium hydroxide (NaOH) or hydrochloric acid (HCl).

4.6. Cytotoxicity Test

The assay for evaluation of bioemulsifier cytotoxicity was performed using African green monkey kidney cells (VERO, ATCC), according to Sieuwerts et al. [56]. For the assay, the cells were washed with phosphate-buffered saline and resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Scientific, Erlangen, Germany) culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) with 100 IU/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin. Cell counting was performed to determine the cell number with an equal volume of trypan blue. Briefly, 100 µL of DMEM with 10% of FBS was added to the 96-well plate (TPP, Trasadingen, Switzerland). Cells were added to the wells (1.5×10^6 cells per well) and treated with 5000 µg/mL–2 µg/mL diluted in DMEM and PBS for the negative control. The plates were incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO_2, and

a 90% humidity incubator. After incubation, 20 µL of MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) at 5 mg/mL was added into each well in the 96-well plate and incubated for four hours in 37 °C, 5% CO_2, and a 90% humidity incubator. After the incubation, 170 µL of the medium with MTT was removed from every well, and 100 µL DMSO (Sigma-Aldrich, USA) was added to each well to extract and solubilize the formazan crystal. Finally, the plate was read at a 570 nm wavelength using TP-Reader Plus (ThermoPlate, China). Each extract concentration (flavonoids) was assayed in triplicate in two independent experiments. The following formula calculated the percentage of proliferation: [OD sample − OD control] × 100% proliferation = OD control.

4.7. Well Diffusion Test in Agar

The tests were performed according to Johnson et al. [57] as modifications for the study of the antimicrobial activity of the SAC. For *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were added in a Tryptic Soy Agar (TSA, Difco TM, Detroit, MI, USA) for 24 h at 30–37 °C. Subsequently, the isolates were suspended in 0.9% NaCl and adjusted to equal the standard turbidity to 0.5 on the McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL). The suspensions were used for seeding in the TSA medium stabilized at 37 °C (0.1 mL microorganism test suspension/10 mL medium). The TSA culture medium was poured into 90 mm Petri dishes (20 mL medium/dish) and allowed to solidify. Once the medium was solid, four 9 mm diameter wells were made with sterilized plastic straws and filled with one volume of SACs produced by *C. krusei*, melaleuca essential oil, and emulsion (a mixture of SACs and essential oil melaleuca). Plates were pre-incubated for one hour at room temperature to ensure adequate diffusion and finally incubated at 30–37 °C for 24 h. Inhibition halos were evaluated in mm. All tests were performed in triplicate.

4.8. Antibiofilm Activity

4.8.1. Inhibition of Biofilm Formation on Polystyrene

Suspensions of biofilm-forming isolates were prepared according to the methodology established by Merghini et al. [58], with modifications. For the tests, breaks of each isolate of *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *S. aureus* ATCC 25923 were prepared in Mueller–Hinton broth (Difco TM, Detroit, MI, USA) plus 5% sucrose at a cell concentration of 0.5 on the McFarland turbidity scale (1.5×10^8 CFU/mL). The bioemulsifiers were diluted in Mueller–Hinton broth at 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.12 mg/mL, and 1.56 mg/mL, with a final volume of 200 µL. Each well containing the bioemulsifier received 20 µL of the standardized bacterial suspension. The plate was then incubated for 24 h at 35 ± 2 °C.

The contents of each well were aspirated, the wells were gently washed three times with 200 µL of *phosphate-buffered saline* (PBS, pH 7.4), and the plates were kept at room temperature to dry. The adhered biomass was fixed with 200 µL of methanol (P.A 99% *v*/*v*) for 10 min. Then, 200 µL of a 0.5% crystal violet solution was added to each well. Subsequently, the crystal violet was removed, and the wells were washed three times with distilled water. Then, 200 µL of alcohol 95% (*v*/*v*) was added to each well, and the OD of the crystal violet extract was determined in a microplate reader at 570 nm. Using the formula below, the percentage of biofilm inhibition was calculated.

Percentage inhibition (%) = 100 − ((OD 570 nm of the treatment)/(OD 570 nm of the control) × 100).

This study also evaluated the activity of the emulsion resulting from the combination of the bioemulsifier and melaleuca essential oil (OMBE4CK) in inhibiting biofilm formation for each bacterium. For this, the same methodological procedure was followed. The used concentrations of OMBE4CK were 25 mg/mL to 1.56 mg/mL in emulsion.

To form the emulsion between the SAC and the melaleuca essential oil (commercially purchased), 50 mg of BE4CK (SAC) was used. This amount was dissolved in 10 mL of water for sterile injection; later, this solution was applied directly in test tubes in the

proportion (2 mL) of the solution and (2 mL) the melaleuca essential oil. The mixture was subjected to vortexing for 2 min, and the emulsion formed was used in the tests at different concentrations (1.56 mg/mL–25 mg/mL).

4.8.2. Inhibition of Biofilm Formation in an Enteral Feeding Catheter Quantitative Analysis

To evaluate the inhibition of biofilm formation in a polyurethane catheter (enteral feeding catheter, Embramed SP, Brazil), sterile segments of the device, measuring approximately 4 cm, were immersed in a TSB medium containing 0.5×10^5 CFU/mL of *S. aureus* 25923 suspensions and OMBE4CK (emulsion) concentrations (1.56 mg/mL–25 mg/mL). Catheter fragments were incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the catheters were washed with 200 µL of sterile saline three times and vortexed for 2 min. About 100 µL of the last wash was removed for serial dilutions in sterile saline. After the decimal dilutions, 30 µL of the sample were transferred to the surface of Petri plates containing the TSA medium, and the samples were homogenized with Drigalsky loops. After drying the samples, the plates were incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the colony-forming unit (CFU/mL) count was performed. All tests were performed in triplicate.

A semi-quantitative analysis of the inhibition of biofilm formation on the surface of a polyurethane catheter was performed by rolling the catheter segment in the Petri dish containing the TSA medium (Difco TM, Detroit, MI, USA). The semiquantitative technique distinguishes colonization (greater than or equal to 15 colonies) from contamination [59].

4.8.3. Biofilm Eradication

An evaluation of the influence of the bioemulsifier BE4CK on biofilms produced by *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *S. aureus* ATCC 25923 were performed after the formation of microbial biofilms on the surface of the wells of 96-well polystyrene plates according to the established methodology by Morais et al. [60], with modifications. A total of 200 µL of Brain Heart Infusion (BHI, Difco TM, Detroit, MI, USA) with 2% sucrose were added to all wells; then, 10 µL of standardized bacterial suspension on the McFarland scale (~0.5×10^5 CFU/mL) was added, the positive control was performed with the addition of the BHI medium + sucrose, and 10 µL of bacterial suspension was added. For the negative control, only the BHI medium with sucrose was added. The plates were incubated for 48 h at 37 °C. After incubation, the wells were gently washed with 200 µL of sterile saline three times in each well; then, 200 µL of concentrations of 25 mg/mL were added; 12.5 mg/mL; 6.25 mg/mL; 3.12 mg/mL; and 1.56 mg/mL, which were incubated for 24 h. After incubation, washing was performed with 100 µL of a saline solution (NaCl, 0.85%). Subsequently, 100 µL of saline was added to the plate wells, and homogenization was carried out. A total of 50 µL was taken from the well, and decimal dilutions were performed for plating the samples. Viable cells were determined using microdroplet plating, for which approximately 10 µL were transferred to a Tryptic Soy Agar (TSA, Difco TM, Detroit, MI, USA) plate as a drop; after drying, the dish was incubated correctly for 24 h in the bacteriological oven. After incubation of the plates, the colony-forming unit (CFU/mL) count was performed.

This study also evaluated the activity of the emulsion resulting from the interaction between the bioemulsifier and melaleuca essential oil (OMBE4CK) in eradicating the biofilm for each isolate. For this, the same methodological procedure was followed. The used concentrations of OMBE4CK were 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL, and 1.56 mg/mL of the emulsion. All tests were performed in triplicate.

4.9. Statistical Analysis

Data were submitted for statistical analysis using the one-way ANOVA procedure in GraphPad Prism (version 8.0.2). All duplicate results are expressed as mean ± standard deviation. Differences were examined using the Tukey test, with a significance level of 95%. The significance levels were set at $p < 0.05$, $p < 0.001$, and $p < 0.0001$.

5. Conclusions

This study presented a bioemulsifier derived from *Candida krusei* M4CK isolated from fruit murici and showed an excellent ability to use glycerol as a substrate for growth and bioemulsifier production. This biomolecule showed promising properties in emulsifying different sources of vegetable oil and hydrocarbons, a lack of toxicity, and stability of emulsions in a wide range of temperatures, pH, and salinity. Furthermore, the bioemulsifier BE4CK and its combination with melaleuca essential oil (OMBE4CK) inhibited bacterial biofilm formation and eradicated bacterial biofilm on polystyrene surfaces and catheters. Such properties emphasize that the bioemulsifier can represent a new source for biomedical development in emulsion formulations containing essential oils and can be a strategy for reducing the colonization of medical devices and surface abiotics.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics12121686/s1, Table S1. E24 values from yeasts from *Anacardium occidentale*, *Byrsonima crassifolia*, *Citrus reticulata*, and *Platonia insignis* fruits. Table S2. Determination of final surface tension (mN/m) in medium after cell growth yeasts strains. Figure S1. Antimicrobial activity of BE4CK and emulsion (OE Melaleuca and BE4CK- OMBE4CK) by agar diffusion against *E. coli* ATCC 25922.

Author Contributions: Methodology, investigation, writing—original draft preparation, software, and visualization, J.M.M.A. and J.M.M.; writing—reviewing, D.H.d.S.S.; methodology and research, A.K.V. and M.R.C.S.; methodology and investigation, J.M.M.A., M.R.C.S. and F.A.F.; funding acquisition, F.H.R.B. and E.P.d.S.; project administration and writing—original draft preparation A.d.S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by Fundação de Amparo à Pesquisa e o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA, BD-01413/19); and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ, 434149/2018-7).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Hélio Euclides S. dos Santos and Marinaldo for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ceresa, C.; Tessarolo, F.; Maniglio, D.; Tambone, E.; Carmagnola, I.; Fedeli, E.; Caola, I.; Nollo, G.; Chiono, V.; Allegrone, G.; et al. Medical-Grade Silicone Coated with Rhamnolipid R89 Is Effective against *Staphylococcus* spp. Biofilms. *Molecules* **2019**, *24*, 3843. [CrossRef]
2. Badrul Hisham, M.D.; Ibrahim, N.H.; RamLi, M.F.; Abd-Aziz, N. Production of Biosurfactant Produced from Used Cooking Oil by *Bacillus* sp. HIP3 for Heavy Metals Removal. *Molecules* **2019**, *24*, 2617. [CrossRef] [PubMed]
3. Durval, I.J.B.; Mendonça, A.H.R.; Rocha, I.V.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Converti, A.; Sarubbo, L.A. Production, Characterization, Evaluation and Toxicity Assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 Biosurfactant for Marine Oil Spills Bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *157*, 111357. [CrossRef]
4. Yamasaki, R.; Kawano, A.; Yoshioka, Y.; Ariyoshi, W. Rhamnolipids and Surfactin Inhibit the Growth or Formation of Oral Bacterial Biofilm. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 358. [CrossRef]
5. Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A.U. Antibiotics versus Biofilm: An Emerging Battleground in Microbial Communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, *8*, 76. [CrossRef] [PubMed]
6. Monteiro, A.S.; Bonfim, M.R.Q.; Domingues, V.S.; Corrêa, A., Jr.; Siqueira, E.P.; Zani, C.L.; Santos, V.L. Identification and Characterization of Bioemulsifier-Producing Yeasts Isolated from Effluents of a Dairy Industry. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 5186–5193. [CrossRef]
7. Gaur, V.K.; Regar, R.K.; Dhiman, N.; Gautam, K.; Srivastava, J.K.; Patnaik, S.; Kamthan, M.; Manickam, N. Biosynthesis and Characterization of Sophorolipid Biosurfactant by *Candida* Spp.: Application as Food Emulsifier and Antibacterial Agent. *Bioresour. Technol.* **2019**, *285*, 121314. [CrossRef]
8. Kim, H.-Y.; Jung, H.; Kim, H.-M.; Jeong, H.-J. Surfactin Exerts an Anti-Cancer Effect through Inducing Allergic Reactions in Melanoma Skin Cancer. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *99*, 107934. [CrossRef]

9. Ceresa, C.; Fracchia, L.; Williams, M.; Banat, I.M.; Díaz De Rienzo, M.A. The Effect of Sophorolipids against Microbial Biofilms on Medical-Grade Silicone. *J. Biotechnol.* **2020**, *309*, 34–43. [CrossRef]
10. Kobayashi, Y.; Li, Q.; Ushimaru, K.; Hirota, M.; Morita, T.; Fukuoka, T. Isolation and Characterization of Novel Naturally Occurring Sophorolipid Glycerides. *Bioresour. Technol. Rep.* **2023**, *22*, 101399. [CrossRef]
11. Yalçın, H.T.; Ergin-Tepebaşı, G.; Uyar, E. Isolation and Molecular Characterization of Biosurfactant Producing Yeasts from the Soil Samples Contaminated with Petroleum Derivatives. *J. Basic Microbiol.* **2018**, *58*, 782–792. [CrossRef] [PubMed]
12. Santos, V.A.; Sarubbo, L.A. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1646. [CrossRef]
13. Atakpa, E.O.; Zhou, H.; Jiang, L.; Ma, Y.; Liang, Y.; Li, Y.; Zhang, D.; Zhang, C. Improved Degradation of Petroleum Hydrocarbons by Co-Culture of Fungi and Biosurfactant-Producing Bacteria. *Chemosphere* **2022**, *290*, 133337. [CrossRef] [PubMed]
14. Huang, K.; Liu, R.; Zhang, Y.; Guan, X. Characteristics of Two Cedarwood Essential Oil Emulsions and Their Antioxidant and Antibacterial Activities. *Food Chem.* **2021**, *346*, 128970. [CrossRef]
15. Alvarez, S.C.V.; Alaniz, M.J.L.; Furlani, M.V.M.; Vazquez, F.; Agresti, P.M.; Nally, M.C.; Maturano, Y.P. Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. *Fungal Genet. Biol.* **2023**, *164*, 103767.
16. Chagas Junior, G.C.A.; Ferreira, N.R.; Andrade, E.H.d.A.; Nascimento, L.D.d.; Siqueira, F.C.d.; Lopes, A.S. Profile of Volatile Compounds of On-Farm Fermented and Dried Cocoa Beans Inoculated with *Saccharomyces* cerevisiae KY794742 and Pichia kudriavzevii. *Molecules* **2021**, *26*, 344. [CrossRef] [PubMed]
17. Douglass, A.P.; Offei, B.; Braun-Galleani, S.; Coughlan, A.Y.; Martos, A.A.R.; Ortiz-Merino, R.A.; Byrne, K.P.; Wolfe, K.H. Population Genomics Shows No Distinction between Pathogenic *Candida krusei* and Environmental *Pichia kudriavzevii*: One Species, Four Names. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007138. [CrossRef]
18. Perez-Gutierrez, R.M.; Muñiz-Ramirez, A.; Gomez, Y.G.; Ramírez, E.B. Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antiglycation Effects of *Byrsonima Crassifolia* Fruit and Seed in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65*, 350–357. [CrossRef]
19. Konishi, M.; Maruoka, N.; Furuta, Y.; Morita, T.; Fukuoka, T.; Imura, T.; Kitamoto, D. Biosurfactant-Producing Yeasts Widely Inhabit Various Vegetables and Fruits. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*, 516–523. [CrossRef] [PubMed]
20. Silva, G.F.D.; Gautam, A.; Duarte, I.C.S.; Delforno, T.P.; Oliveira, V.M.; Huson, D.H. Interactive Analysis of Biosurfactants in Fruit-Waste Fermentation Samples Using BioSurfDB and MEGAN. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 7769. [CrossRef]
21. Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. Characterisation, Surface Properties and Biological Activity of a Biosurfactant Produced from Industrial Waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for Application in the Petroleum Industry. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *102*, 202–209. [CrossRef]
22. Bhaumik, M.; Dhanarajan, G.; Chopra, J.; Kumar, R.; Hazra, C.; Sen, R. Production, Partial Purification and Characterization of a Proteoglycan Bioemulsifier from an Oleaginous Yeast. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43*, 1747–1759. [CrossRef]
23. Claus, S.; Jenkins Sánchez, L.; Van Bogaert, I.N.A. The Role of Transport Proteins in the Production of Microbial Glycolipid Biosurfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 1779–1793. [CrossRef]
24. Phulpoto, I.A.; Yu, Z.; Hu, B.; Wang, Y.; Ndayisenga, F.; Li, J.; Liang, H.; Qazi, M.A. Production and Characterization of Surfactin-like Biosurfactant Produced by Novel Strain *Bacillus nealsonii* S2MT and It's Potential for Oil Contaminated Soil Remediation. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 145. [CrossRef]
25. Rulli, M.M.; Alvarez, A.; Fuentes, M.S.; Colin, V.L. Production of a Microbial Emulsifier with Biotechnological Potential for Environmental Applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *174*, 459–466. [CrossRef]
26. Willumsen, P.A.; Karlson, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* **1996**, *7*, 415–423. [CrossRef]
27. Bosh, M.T.; Robert, M.; Mercadé, M.; Espuny, M.J.; Parra, J.L.; Guinea, J. Surface active compounds on microbial cultures. *Tensides Surfactants Deterg.* **1988**, *25*, 208–211. [CrossRef]
28. Rehman, R.; Ali, M.I.; Ali, N.; Badshah, M.; Iqbal, M.; Jamal, A.; Huang, Z. Crude Oil Biodegradation Potential of Biosurfactant-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Meyerozyma* sp. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *418*, 126276. [CrossRef]
29. Vieira Neta, R.A.; Azevedo, M.; Camargo, M.A.; Delforno, F.P.; Bona, T.P.; Vicente, E.; Duarte, J.G.P. Potential of acid-hydrolysated brewer's spent grain as substrate for biosurfactant production by *Rhodotorula mucilaginosa* LBP5 oleaginous yeast. *Biomass Convers. Biorefinery* **2023**. [CrossRef]
30. Lin, X.; Zhou, H.; Zeng, F.; Jiang, L.; Atakpa, E.O.; Chen, G.; Xie, Q. A biosurfactant-producing yeast *Rhodotorula* sp. CC01 utilizing landfill leachate as nitrogen source and its broad degradation spectra of petroleum hydrocarbons. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *38*, 68. [CrossRef] [PubMed]
31. Singh, M.; Desai, J.D. Hydrocarbon Emulsification by *Candida tropicalis* and *Debaryomyces polymorphus*. *Indian J. Exp. Biol.* **1989**, *27*, 224–226.
32. Souza, F.A.S.D.; Salgueiro, A.A.; Albuquerque, C.D.C. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. *Braz. J. Chem. Eng.* **2012**, *29*, 61–67. [CrossRef]
33. Monteiro, A.S.; Domingues, V.Z.; Souza, M.V.D.; Lula, I.; Golcalves, D.B.; Siqueira, E.P.; Santos, V.L. Bioconversion of biodiesel refinery waste in the bioemulsifier by *Trichosporon mycotoxinivorans* CLA2. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 29.
34. Desai, J.D.; Banat, I.M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 47–64. [CrossRef] [PubMed]

35. Liepins, J.; Balina, K.; Soloha, R.; Berzina, I.; Lukasa, L.K.; Dace, E. Glycolipid Biosurfactant Production from Waste Cooking Oils by Yeast: Review of Substrates, Producers and Products. *Fermentation* **2021**, *7*, 136. [CrossRef]
36. Souza, A.F.; Rodriguez, D.M.; Ribeaux, D.R.; Luna, M.A.C.; Lima E Silva, T.A.; Andrade, R.F.S.; Gusmão, N.B.; Campos-Takaki, G.M. Waste Soybean Oil and Corn Steep Liquor as Economic Substrates for Bioemulsifier and Biodiesel Production by *Candida lipolytica* UCP 0998. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1608. [CrossRef]
37. Ganji, Z.; Beheshti-Maal, K.; Massah, A.; Emami-Karvani, Z. A Novel Sophorolipid-Producing *Candida keroseneae* GBME-IAUF-2 as a Potential Agent in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). *FEMS Microbiol. Lett.* **2020**, *367*, fnaa144. [CrossRef]
38. Daverey, A.; Pakshirajan, K. Production, Characterization, and Properties of Sophorolipids from the Yeast *Candida bombicola* Using a Low-Cost Fermentative Medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *158*, 663–674. [CrossRef]
39. Fan, Y.; Tao, W.; Huang, H.; Li, S. Characterization of a Novel Bioemulsifier from *Pseudomonas stutzeri*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33*, 161. [CrossRef] [PubMed]
40. Luna, J.M.; Santos Filho, A.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A. Production of biosurfactant from *Candida bombicola* URM 3718 for environmental applications. *Chem. Eng. Trans.* **2016**, *49*, 583–588.
41. Elsaygh, Y.A.; Gouda, M.K.; Elbahloul, Y.; Hakim, M.A.; El Halfawy, N.M. Production and structural characterization of eco-friendly bioemulsifier SC04 from *Saccharomyces cerevisiae* strain MYN04 with potential applications. *Microb. Cell Fact.* **2023**, *22*, 176. [CrossRef]
42. Joshi-Navare, K.; Prabhune, A. A Biosurfactant-Sophorolipid Acts in Synergy with Antibiotics to Enhance Their Efficiency. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 512495. [CrossRef] [PubMed]
43. Gudiña, E.J.; Rocha, V.; Teixeira, J.A.; Rodrigues, L.R. Antimicrobial and Antiadhesive Properties of a Biosurfactant Isolated from *LactoBacillus paracasei* Ssp. Paracasei A20. *Lett. Appl. Microbiol.* **2010**, *50*, 419–424. [CrossRef] [PubMed]
44. Rather, M.A.; Gupta, K.; Mandal, M. Microbial Biofilm: Formation, Architecture, Antibiotic Resistance, and Control Strategies. *Braz. J. Microbiol.* **2021**, *52*, 1701–1718. [CrossRef] [PubMed]
45. Iseppi, R.; Mariani, M.; Benvenuti, S.; Truzzi, E.; Messi, P. Effects of *Melaleuca alternifolia* Chell (Tea Tree) and *Eucalyptus globulus* Labill. Essential Oils on Antibiotic-Resistant Bacterial Biofilms. *Molecules* **2023**, *28*, 1671. [CrossRef]
46. Budzyńska, A.; Wieckowska-Szakiel, M.; Sadowska, B.; Kalemba, D.; Rózalska, B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol. J. Microbiol.* **2011**, *60*, 35–41. [CrossRef] [PubMed]
47. Mukherji, R.; Prabhune, A. Novel Glycolipids Synthesized Using Plant Essential Oils and Their Application in Quorum Sensing Inhibition and as Antibiofilm Agents. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 890709. [CrossRef]
48. Mendes, R.M.; Francisco, A.P.; Carvalho, F.A.; Dardouri, M.; Costa, B.; Bettencourt, A.F.; Ribeiro, I.A. Fighting *S. aureus* catheter-related infections with sophorolipids: Electing an antiadhesive strategy or a release one. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *208*, 112057. [CrossRef] [PubMed]
49. Pontes, C.; Alves, M.; Santos, C.; Ribeiro, M.H.; Gonçalves, L.; Bettencourt, A.F.; Ribeiro, I.A.C. Can Sophorolipids Prevent Biofilm Formation on Silicone Catheter Tubes? *Int. J. Pharm.* **2016**, *513*, 697–708. [CrossRef]
50. Abdollahi, S.; Tofighi, Z.; Babaee, T.; Shamsi, M.; Rahimzadeh, G.; Rezvanifar, H.; Saeidi, E.; Mohajeri Amiri, M.; Saffari Ashtiani, Y.; Samadi, N. Evaluation of Anti-Oxidant and Anti-Biofilm Activities of Biogenic Surfactants Derived from *Bacillus* Amyloliquefaciens and *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran. J. Pharm. Res.* **2020**, *19*, 115–126. [CrossRef] [PubMed]
51. Silva, S.S.E.; Carvalho, J.W.P.; Aires, C.P.; Nitschke, M. Disruption of *Staphylococcus aureus* Biofilms Using Rhamnolipid Biosurfactants. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 7864–7873. [CrossRef] [PubMed]
52. Cameron, D.R.; Cooper, D.G.; Neufeld, R.J. The Mannoprotein of *Saccharomyces Cerevisiae* Is an Effective Bioemulsifier. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1420–1425. [CrossRef] [PubMed]
53. Aslani, N.; Janbabaei, G.; Abastabar, M.; Meis, J.F.; Babaeian, M.; Khodavaisy, S.; Boekhout, T.; Badali, H. Identification of Uncommon Oral Yeasts from Cancer Patients by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 24. [CrossRef]
54. Dubois, A.B.; Botelho, S.Y.; Bedell, G.N.; Marshall, R.; Comroe, J.H., Jr. A Rapid Plethysmographic Method for Measuring Thoracic Gas Volume: A Comparison with a Nitrogen Washout Method for Measuring Functional Residual Capacity in Normal Subjects. *J. Clin. Investig.* **1956**, *35*, 322–326. [CrossRef] [PubMed]
55. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [CrossRef] [PubMed]
56. Sieuwerts, A.M.; Klijn, J.G.M.; Peters, H.A.; Foekens, J.A. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use This Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in Vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. *Clin. Chem. Lab. Med.* **1995**, *33*, 813–824. [CrossRef]
57. Johnson, E.C.; Eseyin, O.A.; Udobre, A.E.; Ike, P. Antibacterial Effect of Methanolic Extract of the Root of *Aspilia africana*. *Niger. J. Pharm. Appl. Sci. Res.* **2011**, *1*, 44–50.
58. Merghni, A.; Dallel, I.; Noumi, E.; Kadmi, Y.; Hentati, H.; Tobji, S.; Ben Amor, A.; Mastouri, M. Antioxidant and Antiproliferative Potential of Biosurfactants Isolated from Lacto *Bacillus casei* and Their Anti-Biofilm Effectin Oral *Staphylococcus aureus* Strains. *Microb. Pathog.* **2017**, *104*, 84–89. [CrossRef]

59. Maki, D.G.; Jarrett, F.; Sarafin, H.W. A Semiquantitative Culture Method for Identification of Catheter-Related Infection in the Burn Patient. *J. Surg. Res.* **1977**, *22*, 513–520. [CrossRef]
60. Morais, I.M.C.; Cordeiro, A.L.; Teixeira, G.S.; Domingues, V.S.; Nardi, R.M.D.; Monteiro, A.S. Santos Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *LactoBacillus jensenii* P 6A and *LactoBacillus gasseri* P 65. *Microb. Cell Factories* **2017**, *16*, 155. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.