



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

THAMIRYS GIMENES COUTINHO DE SOUSA

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PELA LEVEDURA DA ANTARTICA
Rhodotorula mucilaginosa CRM747: DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE
CULTURA ÓTIMO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY THE ANTARCTIC YEAST Rhodotorula
mucilaginosa CRM 747: DEVELOPMENT OF A OPTIMAL MEDIUM AND
BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION

CAMPINAS

2021

THAMIRYS GIMENES COUTINHO DE SOUSA

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PELA LEVEDURA DA ANTARTICA
Rhodotorula mucilaginosa CRM747: DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE
CULTURA ÓTIMO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

*Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título
de Doutora em Engenharia Química.*

Orientador: PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA THAMIRYS GIMENES
COUTINHO DE SOUSA, E ORIENTADA
PELO PROFESSOR DR. ELIAS BASILE
TAMBOURGI

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

So85p Sousa, Thamirys Gimenes Coutinho de, 1992-
Produção de biossurfactante pela levedura da antártica *Rhodotorula Mucilaginosa* CRM747 : desenvolvimento de um meio de cultura ótimo e aplicação biotecnológica / Thamirys Gimenes Coutinho de Sousa. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Leveduras. 2. Biossurfactantes. 3. Poluição. 4. Biorremediação. 5. Ambientes extremos. I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biosurfactant production by the antarctic yeast *Rhodotorula Mucilaginosa* CRM747 : development of a optimal medium and biotechnological application

Palavras-chave em inglês:

Yeasts

Biosurfactants

Pollution

Bioremediation

Extreme environments

Área de concentração: Engenharia Química

Títuloção: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Elias Basile Tambourgi [Orientador]

Juliana Moura de Luna

Elisângela de Jesus Cândido Moraes

Raquel Cristina Cavalcanti Dantas

Daniela Diniz Ehrhardt

Data de defesa: 26-03-2021

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6174-8819>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9783016033620107>

Folha de aprovação da Tese de Doutorado defendida por Thamirys Gímenes Coutinho de Sousa aprovada em 26 de março de 2021 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi – Presidente e Orientador
FEQ/UNICAMP

Dra. Juliana Moura de Luna
UNICAP

Dra. Elisângela de Jesus Cândido Moraes
EEL/USP

Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas
UFU

Dra. Daniela Diniz Ehrhardt
UniFAJ

ATA da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, à minha irmã, ao meu namorado
e a toda minha família que, com muito carinho
e apoio, não mediram esforços para que eu
chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e por me manter saudável para enfrentar todos os percalços que esses anos de pesquisa apresentaram, principalmente no ano de 2020 por causa da pandemia;

Aos professores Elias Basile Tambourgi e Edgar Silveira Campos, pela paciência, pelo ensinamento, pelo auxílio e pelo companheirismo de todos esses anos. Foi um enorme prazer tê-los ao meu lado nessa caminhada;

À minha família, por acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir;

Mãe, Suely Maria, por sempre se manter confiante e firme ao meu lado;

Pai, Clarismar Gimenes, por cuidar sempre de mim, se fazer presente até nos pequenos detalhes;

Minha irmã, Camila Coutinho, por me acalmar nos momentos turbulentos, por escutar meus desabafos e ter paciência e me ajudar em todos meus momentos de fraqueza;

Ao meu namorado, Raphael Takenaka, por ser a calmaria na tempestade, por me apoiar, por acreditar sempre na minha capacidade e nunca me deixar desistir;

À Marihá, por todos os anos de amizade, dedicação, amor, compreensão e diversão;

E a todos os amigos que fizeram parte desta caminhada, compartilhando os momentos bons e ruins, mostrando que apesar de tudo eu não estava sozinha;

À FEQ/UNICAMP pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Esta Tese recebeu o apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - (CAPES) - Código de financiamento 001.

RESUMO

Biossurfactantes são obtidos a partir do metabolismo de microrganismos. Estas moléculas naturais podem apresentar baixa ou nenhuma toxicidade, serem biodegradáveis e estáveis em condições extremas. Devido às diversas propriedades que elas possuem, podem ser empregadas em diferentes setores industriais, inclusive na biorremediação. Apesar das diversas vantagens, eles ainda são incapazes de competir economicamente no mercado devido ao seu custo de produção em escala industrial ser muito elevado quando comparado aos surfactantes químicos. Com o intuito de contornar esses problemas, diferentes estratégias são utilizadas, entre elas podem-se destacar a busca por novos microrganismos produtores de biossurfactantes, utilização de matéria prima barata, otimização do meio de cultura e das condições de cultivo e estudo e desenvolvimento de técnicas para extração e purificação da biomolécula. Dessa forma, o presente trabalho consiste na otimização do meio de cultura utilizando como fonte de carbono resíduo de abacaxi para produção de biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747. Além disso, teve como objetivos definir a melhor metodologia de extração da biomolécula, avaliar a estabilidade da biomolécula em diferentes temperaturas, pHs e concentrações salinas e analisar a influência do biossurfactante no crescimento microbiano em água contaminada. O resíduo de abacaxi foi escolhido visto que o Brasil é um dos maiores produtores do mundo dessa fruta e no seu processo industrial cerca de 50% do seu peso é descartado, gerando uma enorme quantidade de lixo orgânico. Em relação à levedura, *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, ela foi isolada do ambiente antártico e apresenta características desejáveis para produção da biomolécula, como crescimento e produção do metabólito em aproximadamente 24 horas, temperaturas de crescimento baixas (15 °C) e baixa exigência quanto ao meio de cultivo. Os resultados da otimização do meio de cultura mostraram que a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 é capaz de produzir o biossurfactante utilizando o resíduo de abacaxi como fonte de carbono, além disso, ao realizar uma suplementação com o resíduo de abacaxi, após 10 horas de fermentação, a produtividade aumentou de 21,2 g.L⁻¹ para 36 g.L⁻¹ em 16 horas de fermentação. A biomolécula extraída também apresentou estabilidade em uma ampla faixa de pH (2 a 10), temperatura (-70 a 100 °C) e salinidade (5 a 100 g.L⁻¹), o que torna possível a sua aplicação em atividades biotecnológicas que apresentem alterações dessas variáveis. A emulsão formada pela água e óleo mineral, com a adição do biossurfactante permaneceu inalterada ao longo de 30 dias de experimento. Entre as seis metodologias de extração da biomolécula testadas a que utiliza acetona fria como solvente foi a que obteve melhor resultado, com extração de 27 g.L⁻¹. Na

análise do crescimento microbiano em água contaminada, a presença do biossurfactante foi imprescindível para o crescimento do microrganismo, sendo viável sua aplicação na biorremediação. Portanto, evidencia a necessidade do prosseguimento com os estudos da produção de biossurfactante pela levedura, uma vez que se confirmou o elevado potencial biotecnológico da biomolécula e a vantagem na utilização da levedura, pois esta possui uma alta produtividade utilizando resíduo agroindustrial como fonte de carbono.

ABSTRACT

Biosurfactants are obtained from the metabolism of microorganisms. These natural molecules have little or no toxicity, are biodegradable, and are stable under extreme conditions. They can be used in different industrial sectors, including bioremediation, due to the different properties they have. Despite the various advantages, the biosurfactants are still unable to compete economically in the market because of their cost of production on an industrial scale being very high when compared to chemical surfactants. To solve these problems different strategies are used, such as search for new microorganisms that produce biosurfactants, use of cheap raw material, optimization of the culture medium and of the conditions of cultivation and study and development of techniques for the extraction and purification of the biomolecule. Then, the present work consists of the optimization of the culture medium using pineapple residue as a carbon source to produce biosurfactant by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747. In addition, had of the objective to define the best extraction methodology of the biomolecule, evaluate the biomolecule stability at different temperatures, pHs and saline concentrations and analyze the influence of the biosurfactant on microbial growth in contaminated water. Brazil is one of the world's largest producers of the pineapples and in its industrial process about 50% of its weight is discarded, generating an enormous amount of organic waste. The yeast, *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, was isolated from the Antarctic and has desirable characteristics for the production of the biomolecule, such as growth and production of the metabolite in approximately 24 hours, low growth temperatures (15 ° C) and is not demanding as to the medium of culture. The results of the optimization of the culture medium showed that the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 is capable to produce the biosurfactant using pineapple residue as a carbon source, in addition, when performing a supplementation with the pineapple residue, after 10 hours of fermentation, the productivity increased from 21.2 gL⁻¹ to 36 gL⁻¹ in 16 hours of fermentation. The extracted biomolecule also showed stability over a wide range of pH (2 to 10), temperature (-70 to 100 ° C) and salinity (5 to 100 gL⁻¹), which makes it possible to be applied in biotechnological activities that present changes in these variables. The emulsion formed by water and mineral oil, with the addition of the biosurfactant, remained unchanged over 30 days of the experiment. Among the six extraction methodologies of the biomolecule tested, the one that uses cold acetone as solvent was the one that obtained the best result, with extraction of 27 g.L⁻¹. In the analysis of microbial growth in contaminated water, the presence of the biosurfactant was essential for the growth of the microorganism, and its application in bioremediation is viable. Therefore, it evidences the need to continue with the

studies of the production of biosurfactant by yeast *Rhotorula mucilaginosa* CRM 747, because of the high biotechnological potential of biomolecule and the advantages in the use of yeast, this present high productivity using agro-industrial waste as a carbon source.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A - Via sintética das partes polar e apolar do biossurfactante, utilizando carboidratos como fonte de carbono. Enzimas envolvidas: A. fosfofrutoquinase; B. piruvato quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato lipase; E. piruvato desidrogenase; F. piruvato carboxilase. B - Metabolismo bioquímico para síntese da molécula do surfactante, tendo como fonte de carbono hidrocarbonetos. As enzimas envolvidas são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose-1,6 bifosfatase. Fonte: Fontes et al. 2008.	29
Figura 2: Tensão superficial (mN.m^{-1}) e índice de emulsificação em óleo mineral (%) da levedura L69. A - Diferentes fontes de Carbono. B - Diferentes fontes de Nitrogênio. Legenda: Colunas representam os resultados da tensão superficial e os ■ representa os dados do índice de emulsificação.	45
Figura 3: Gráfico do Pareto: A - Tensão Superficial (mN.m^{-1}); B - Índice de Emulsificação (%); C - Rendimento (g.L^{-1}).	48
Figura 4: Superfície de resposta: Tensão superficial (mN.m^{-1}) 24 horas. A - Sulfato de amônio x Extrato do abacaxi; B - Peptona x Extrato do abacaxi; C - Sulfato de amônio x Peptona.	49
Figura 5: Superfície de resposta: Tensão superficial (mN.m^{-1}) 48 horas. A - Sulfato de amônio x Extrato do abacaxi; B - Peptona x Extrato do abacaxi; C - Sulfato de amônio x Peptona.	50
Figura 6: Curva de nível: Tensão superficial (mN.m^{-1}) - 24 horas. A - Extrato do abacaxi x Extrato de levedura; B - pH x Extrato do abacaxi.	50
Figura 7: Curva de nível: Rendimento (g.L^{-1}) - 24 horas. A - Extrato do abacaxi x Extrato de levedura; B - pH x Extrato do abacaxi.	50
Figura 8: Gráfico do Pareto: A - Tensão Superficial (mN.m^{-1}); B - Índice de Emulsificação (%); C - Rendimento (g.L^{-1}).	52
Figura 9: Superfície de resposta: A - Rendimento (g.L^{-1}) Sulfato de amônio x Extrato do abacaxi; B - Rendimento (g.L^{-1}) Peptona x Extrato do abacaxi; C - Tensão Superficial (mN.m^{-1}) Sulfato de amônio x Peptona; D - Tensão Superficial (mN.m^{-1}) Peptona x Extrato de abacaxi.	53
Figura 10: Gráfico do Pareto: A - Tensão Superficial (mN.m^{-1}); B - Índice de Emulsificação (%); C - Rendimento (g.L^{-1}).	55
Figura 11: Superfície de resposta: A - Tensão Superficial (mN.m^{-1}); B - Índice de Emulsificação (%); C - Rendimento (g.L^{-1}).	56
Figura 14: Curva de crescimento da Rhodotorula mucilaginosa CRM 747 e produção de biossurfactante, durante 24 horas.	58
Figura 15: Curva de crescimento da Rhodotorula mucilaginosa CRM 747 e produção de biossurfactante, durante 24 horas com suplementação após 10 horas de fermentação.	59
Figura 16: Curva de crescimento da Rhodotorula mucilaginosa CRM 747 e produção de biossurfactante, durante 30 horas com suplementação após 10 e 20 horas de fermentação.	60
Figura 12: Análise das metodologias de extração. Eixo Y: rendimento; valores sobrescritos: desvio padrão (SD).	61
Figura 13: Hidrofobicidade da levedura Rhodotorula mucilaginosa CRM 747 em querosene, óleo de soja e óleo mineral; valores sobrescritos: desvio padrão (SD).	62
Figura 17: Concentração micelar Diluída (CMD) do biossurfactante extraído.	63
Figura 18: Estabilidade de Emulsão: Extrato Bruto x BS (2CMD, CMD e 1/2 CMD). Legenda: BS - biossurfactante extraído; 2CMD - $118,28 \text{ g.L}^{-1}$, CMD - $59,14 \text{ g.L}^{-1}$ e 1/2CMD - $29,57 \text{ g.L}^{-1}$	65
Figura 19: $E_{24\%}$ em diferentes concentrações de biossurfactante após a aplicação do estresse em diversas temperaturas.	67
Figura 20: Tensão superficial em diferentes concentrações de biossurfactante após a aplicação do estresse em diversas temperaturas.	67

Figura 21: E _{24%} em diferentes concentrações de biossurfactante após a aplicação do estresse em diversos pH.	69
Figura 22: Tensão superficial em diferentes concentrações de biossurfactante após a aplicação do estresse em diversos pH.	69
Figura 23: E _{24%} em diferentes concentrações de biossurfactante após a aplicação do estresse em diversas concentrações de NaCl.	71
Figura 24: Tensão superficial em diferentes concentrações de biossurfactante após a aplicação do estresse em diversas concentrações de NaCl.	71
Figura 25: Aplicação biotecnológica: água doce contaminada por óleo de motor usado em condições estéreis. Condições: controle – água + hidrocarboneto; condição 1 – água + levedura (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CRM 747) + hidrocarboneto; condição 2 – água + levedura (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CRM 747) + hidrocarboneto + biossurfactante na concentração micelar crítica (59,14 g.L ⁻¹).	73
Figura 26: Aplicação biotecnológica: água doce contaminada por óleo de motor usado em condições não estéreis. Condições: controle – água + hidrocarboneto; condição 1 – água + hidrocarboneto + biossurfactante na concentração micelar crítica (59,14 g.L ⁻¹).	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fontes de carbono	35
Tabela 2: Fontes de nitrogênio	36
Tabela 3: Níveis e variáveis utilizados no planejamento experimental 25 – 1	38
Tabela 4: Matriz do planejamento experimental 2^{5-1}	38
Tabela 5: Níveis e variáveis utilizados no planejamento experimental composto central	40
Tabela 6: Matriz do planejamento experimental composto central	40
Tabela 7: Níveis e variáveis utilizados no segundo planejamento experimental composto central.....	41
Tabela 8: Matriz do planejamento experimental composto central	41
Tabela 9: Condições experimentais para teste de biorremediação da água doce contaminada por óleo de motor	44

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
• Selecionar entre as fontes de carbono e as de nitrogênio testadas as melhores para composição do meio de cultura para produção da biomolécula;.....	19
• Planejamento experimental para otimizar o meio de cultura.	19
• Avaliar diferentes metodologias de extração da biomolécula;.....	19
• Determinar a hidrofobicidade celular da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CRM747 em diferentes hidrocarbonetos;	19
• Avaliar a produção da biomolécula pela levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CRM747 ao longo de 24 e 30 horas de fermentação, com e sem suplementação de fonte de carbono;.....	19
• Analisar a aplicação biotecnológica do biossurfactante.	19
3. Revisão bibliográfica.....	20
3.1. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes.....	20
3.1.1. Surfactantes sintéticos	20
3.1.2. Surfactantes biológicos	21
3.1.3. Microrganismos.....	22
3.1.4. Propriedades dos surfactantes	25
3.1.5. Vantagens e desvantagens	27
3.1.6. Método de produção.....	27
3.1.7. Aplicações	32
4. Materiais e métodos	34
4.1. Microrganismos.....	34
4.2. Pré- inóculo	34
4.3. Resíduos agroindustriais	34
4.4. Influência da fonte de carbono e nitrogênio na produção do biossurfactante	34
4.4.1. Tensão superficial	35
4.4.2. Índice de Emulsificação ($E_{24\%}$).....	35
4.5. Otimização do meio utilizando resíduo agroindustrial.....	36
4.5.1. Rendimento	36
4.5.2. Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1}	38
4.5.3. Planejamento em estrela com três variáveis	39
4.5.4. Planejamento em estrela com duas variáveis	41
4.6. Curva de crescimento e produção do biossurfactante	42

4.7.	Hidrofobicidade Celular	42
4.8.	Caracterização da biomolécula.....	42
4.8.1.	Concentração Micelar Diluída (CMD).....	42
4.8.2.	Estabilidade da Emulsão	43
4.8.3.	Teste de Estabilidade.....	43
4.9.	Aplicação Biotecnológica	43
5.	Resultados e Discussão	45
5.1.	Influência da fonte de Carbono e Nitrogênio na produção de biossurfactante.....	45
5.2.	Otimização do meio utilizando resíduo agroindustrial.....	47
5.2.1.	Planejamento Fatorial Fracionário 25 – 1	47
5.2.2.	Planejamento composto central.....	51
5.2.3.	Segundo Planejamento Composto Central	54
5.3.	Curva de crescimento	57
5.4.	Metodologias de extração.....	60
5.5.	Hidrofobicidade celular.....	62
5.6.	Caracterização da biomolécula.....	63
5.6.1.	Concentração micelar diluída (CMD)	63
5.6.2.	Estabilidade da emulsão	64
5.6.3.	Teste de estabilidade	66
5.7.	Aplicação Biotecnológica	73
6.	Conclusão	75
7.	Referências	77

1. Introdução

Surfactantes são moléculas anfipáticas, isto é, constituídas por uma porção hidrofóbica e por outra hidrofílica. Devido a essa característica eles apresentam propriedades, como: redução da tensão superficial e interfacial de misturas imiscíveis, concentração micelar crítica, capacidade de emulsificação, dentre outras particularidades que os tornam alvos de estudo e interesse de diversas modalidades industriais (Saharan *et al.*, 2011).

Os tensoativos produzidos quimicamente são obtidos a partir de derivados de petróleo ou fontes oleoquímicas, por isso podem ser tóxicos e não biodegradáveis, restringindo a sua utilização (Marchant e Banat, 2012). A crescente conscientização em relação à proteção do meio ambiente, o surgimento de novas leis de controle ambiental e a intenção de contornar outras desvantagens na utilização de surfactantes sintéticos transformaram os biossurfactantes em alvos de pesquisas. Entretanto a produção dessas biomoléculas, em escala industrial, ainda não é viável quando comparada à dos surfactantes sintéticos (Amaral *et al.*, 2010; Sanches *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2017a).

Segundo Sanches e colaboradores (2021), surfactantes de origem natural são produzidos por diversos grupos de organismos, como: os microrganismos, as plantas e até os seres humanos. Os biossurfactantes são biomoléculas produzidas por microrganismos e apresentam praticamente todas as características dos surfactantes sintéticos. Além disso, eles possuem baixa ou nenhuma toxicidade, alta biodegradabilidade, alta biocompatibilidade, alta especificidade e são estáveis em condições ambientais extremas (variações de pH, de temperatura e de salinidade), tornando-os substitutos apropriados dos sintéticos (Liu *et al.*, 2011; Sanches *et al.*, 2021).

A classificação dos biossurfactantes é baseada nas suas propriedades físico-químicas: glicolipídios, lipopeptídeos, lipídios neutros, ácidos graxos, fosfolipídios e poliméricos (Amaral *et al.*, 2010; Cameotra *et al.*, 2010; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011; Steller e Vater, 2000). As funções biológicas dos biossurfactantes ainda não foram totalmente esclarecidas, contudo, sabe-se que eles são capazes de emulsificar, de transportar e de solubilizar hidrocarbonetos. Tais funções são valorizadas durante o processos de biorremediação de um ambiente contaminado, por exemplo, após um derramamento de óleo (Sharma e Saharan, 2016).

Ademais, as biomoléculas surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina, produzidas por *Bacillus sp*, possuem função de aderência-liberação da célula às superfícies e atividade antibiótica (Kim *et al.*, 2010; Maier, 2003; Steller e Vater, 2000).

A principal forma de obtenção dos biossurfactantes é através dos processos fermentativos, que consistem na utilização de fontes de carbono para geração de energia e metabólitos secundários (Barbieri *et al.*, 2012). A otimização do processo e do meio de cultura utilizado são importantes para obter o máximo de rendimento, preservando as propriedades da biomolécula (Fontes *et al.*, 2008). A otimização por métodos clássicos é um processo demorado, trabalhoso e com elevado custo, especialmente quando existem várias variáveis para serem analisadas, pois cada fator é avaliado separadamente; além disso, pode resultar em interpretações errôneas, visto que não levam em conta a interação entre as variáveis estudadas. Portanto utilizar técnicas mais avançadas para a otimização das condições de fermentação e do meio fermentativo são necessárias. Métodos estatisticamente projetados se apresentam como uma abordagem alternativa mais eficiente, ou seja, menos demorada, trabalhosa e gerando menos gastos, e evitam erros por considerarem as interações entre os fatores estudados. Esse tipo de abordagem estuda todos os níveis das variáveis de interesse simultaneamente (Bruns *et al.*, 2006; Rufino *et al.*, 2008). O desenho experimental (planejamento experimental) e a análise das superfícies de respostas são exemplos dessas abordagens mais avançadas (Deepika *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2005). O planejamento experimental é uma ferramenta que necessita de quantidade limitadas de experimentos para gerar informações úteis. A partir desses experimentos é possível analisar a influência de cada fator e das suas interações sobre as respostas, definindo o melhor caminho para se atingir o objetivo, ou seja, a maior produção da biomolécula (Bruns *et al.*, 2006; Ratnam *et al.*, 2005).

A utilização de resíduos agroindustriais que apresentam uma alta quantidade de carboidratos e lipídeos são uma opção adequada para produção de biossurfactantes (Meneses *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2016). Esses resíduos podem ser provenientes de variadas atividades humanas, como processamento de batatas, de diversos óleos (de soja, de milho, de coco, de amendoim, de canola, entre outros), detritos domésticos e comerciais (óleos de frituras) (Meneses *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 2000). Anualmente milhões de toneladas de resíduos danosos ao meio ambiente e a saúde da população são gerados, portanto utilizar esses resíduos como matérias-primas de processos biotecnológicos representa uma alternativa viável para reduzir a poluição e os custos de produção industrial de biomoléculas (Araújo *et al.*, 2019; Maneerat, 2005). O principal empecilho na utilização de resíduos para meio de cultivo está na adequada composição de nutrientes necessários para crescimento dos microrganismos e para a formação da biomolécula de interesse. Além disso, gastos com

transporte, armazenamento e tratamento prévio do resíduo podem encarecer o processo, que o torna pouco atrativo (Nitschke e Pastore, 2003; Singh *et al.*, 2019).

Arelado a isso, o interesse das indústrias na produção dos biossurfactantes promoveu o aumento na investigação de microrganismos capazes de produzi-los, logo, intensificou a pesquisa de culturas microbianas isoladas de ecossistemas variados. Entre os biossistemas, o ambiente Antártico recebeu destaque, pois é um local inóspito e, apesar disso, possui uma extraordinária biodiversidade (Buzzini *et al.*, 2012; Connell *et al.*, 2008; Pavlova *et al.*, 2011). Os microrganismos, plantas e animais que vivem nesse ambiente se adaptaram metabólica e fisiologicamente garantindo a sua existência. As bactérias, as leveduras, os fungos e as algas unicelulares provenientes de locais extremos são importantes cientificamente, pois produzem substâncias biologicamente ativas diferenciadas (D'amico *et al.*, 2006; Gerday *et al.*, 2000). Entre os microrganismos mais estudados encontram-se os fungos, com foco especial nas leveduras.

Os fungos são organismos que conseguiram se adaptar bem as condições do planeta, habitando a Terra há milhões de anos. Podem ser encontrados em diversos locais da natureza, apresentando papéis importantes, como decompositores de matéria orgânica (Zucconi *et al.*, 2020). Muitas pesquisas utilizando leveduras para produção de biossurfactante concentram-se na utilização das *Candidas*, no entanto, as espécies de *cândidas* são consideradas patógenos oportunistas, não apresentando *status* GRAS (*generally regarded as safe*) (Albuquerque *et al.*, 2014; Carneiro *et al.*, 2019). Esse *status* indica que o microrganismo não possui toxicidade e/ou patogenicidade, sendo possível a aplicação deles e de seus metabólitos em diversos setores industriais (Santos *et al.*, 2016).

Por causa disso, outros microrganismos produtores de biossurfactantes têm sido investigados por muitos pesquisadores, e as leveduras do gênero das *Rhodotorulas* têm-se destacado para utilização nas indústrias em processos fermentativos, principalmente pela sua alta taxa de crescimento em matéria-prima barata (Branco *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2011; Wirth e Goldani, 2012). Contudo, o estudo do biossurfactante a partir da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foi reportado em apenas um trabalho, pertencente a Kawahara e seu grupo de pesquisadores (2013). Eles estudaram a capacidade estabilizadora de astaxantina, comprovando que a astaxantina foi estável à oxidação nas novas micelas de biossurfactantes. Apesar dos resultados promissores, um intervalo de tempo significativo separa o atual trabalho deste publicado, confirmando a necessidade de continuação dos estudos relacionados a produção da biomolécula por esse microrganismo.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal a otimização da produção de biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, utilizando planejamento experimental e resíduo agroindustrial como fonte de carbono; ademais analisar a estabilidade da biomolécula em diferentes condições; e, por fim, avaliar a sua capacidade de biorremediação em água doce contaminada por hidrocarbonetos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de um meio de cultura ótimo para produção de biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 utilizando planejamento experimental, caracterização da biomolécula e sua aplicação biotecnológica.

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar entre as fontes de carbono e as de nitrogênio testadas as melhores para composição do meio de cultura para produção da biomolécula;
- Planejamento experimental para otimizar o meio de cultura.
 - Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} ;
 - Planejamento em estrela com três variáveis;
 - Planejamento em estrela com duas variáveis.
- Avaliar diferentes metodologias de extração da biomolécula;
- Determinar a hidrofobicidade celular da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 em diferentes hidrocarbonetos;
- Avaliar a curva de crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 e produção do biossurfactante;
- Avaliar a produção da biomolécula pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 ao longo de 24 e 30 horas de fermentação, com e sem suplementação de fonte de carbono;
- Determinar a concentração micelar diluída do biossurfactante;
- Avaliar a estabilidade da emulsão ao longo de 30 dias;
- Testar a estabilidade da biomolécula em diversas temperaturas, pHs e concentrações salinas;
- Analisar a aplicação biotecnológica do biossurfactante.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Surfactantes sintéticos e biosurfactantes

3.1.1. Surfactantes sintéticos

Surfactantes, ou tensoativos, são agentes de atividade superficial, ou seja, compostos capazes de modificar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido - propriedade relacionada à sua natureza anfipática (Ramanathan *et al.*, 2013). A parte apolar é frequentemente constituída por uma cadeia de hidrocarbonetos, enquanto a porção polar pode ser iônica: catiônica, em solução aquosa possui carga positiva e apresenta atividade condicionante e antibacteriana; aniônica, quando dissolvida apresenta íon com carga negativa e é amplamente empregada em cosméticos; não-iônica, por não possuir carga pode ser utilizado junto com os aniônicos ou catiônicos e é destinado, principalmente, para produtos de uso infantil e para peles sensíveis e; anfotérica, exibe um sítio positivo e outro negativo, a carga dependerá do pH da solução (Desai e Banat, 1997; Vaz *et al.*, 2012). Um surfactante possui uma estrutura típica R-X, em que R representa a porção hidrofóbica e o X a parte polar (Khan *et al.*, 2020).

Devido à presença de grupos polares e apolares, os surfactantes tendem a se concentrar na interface de dois líquidos imiscíveis formando uma camada, a qual é responsável pela redução da tensão interfacial e superficial. O termo interface indica o limite entre dois líquidos imiscíveis, enquanto o termo superfície é utilizado quando uma das fases está no estado gasoso (Ramanathan *et al.*, 2013; Sanches *et al.*, 2021).

Além dessa propriedade, os tensoativos produzem espontaneamente agregados denominados micelas. A produção das micelas está atrelada a capacidade de detergência e solubilização apresentada por essas moléculas. A menor concentração na qual ocorre a formação das micelas é chamada de concentração micelar crítica (CMC).

A determinação da CMC é um ponto importante para caracterização do surfactante. Quanto menor a CMC melhor, porque necessita de uma menor quantidade para reduzir ao máximo a tensão superficial. Abaixo da CMC, os surfactantes estão, predominantemente, na forma de monômeros; acima da CMC, existe um equilíbrio entre monômeros e micelas (Araújo *et al.*, 2019; Wanderley Neto *et al.*, 2020).

As características supracitadas fazem com que os surfactantes apresentem diferentes propriedades: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases; tornando-os versáteis para diversas aplicações (Banat *et al.*, 2010).

Os surfactantes sintéticos são obtidos a partir de derivados de petróleo ou fontes oleoquímicas. Todavia por causa da crescente conscientização em relação à proteção do meio ambiente e o surgimento de novas leis de controle ambiental, alternativas “amigas do ecossistema” têm sido estudadas, pensando em substituir os surfactantes sintéticos pelos naturais. Os surfactantes produzidos por microrganismos apresentam-se como uma alternativa viável para esta substituição (Sanches *et al.*, 2021).

3.1.2. Surfactantes biológicos

Nos últimos anos aumentou o interesse nos surfactantes naturais, moléculas produzidas por diferentes organismos vivos. Os surfactantes produzidos a partir do metabolismo de microrganismos são chamados de biossurfactantes (Sanches *et al.*, 2021). De acordo com Singh e colaboradores (2019) a produção inicial de biossurfactante no mercado mundial de 2013 era de 344.068,40 toneladas e previa um aumento para 461.991,67 toneladas para 2020, com taxa de crescimento anual de 4,3%.

O uso dos biossurfactantes iniciaram em 1949 quando Jarvis e Johnson descobriram atividades antibióticas e hemolíticas de um ramnolipídios. Posteriormente, em 1968, Arima e colaboradores descobriram a produção da surfactina, um biossurfactante muito estudado produzido por *Bacillus subtilis*. Passado algum tempo, estudiosos se depararam com a produção de biossurfactantes em meios hidrofóbicos, desencadeando estudos relacionados à utilização de microrganismos produtores de surfactantes no tratamento de resíduos oleosos, na recuperação de petróleo e na biorremediação de áreas contaminadas (Barros *et al.*, 2007).

Semelhante aos sintéticos, os surfactantes microbianos são constituídos por duas porções distintas, uma lipofílica e outra hidrofílica. Normalmente, a parte apolar é composta por uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, podendo apresentar diferenças estruturais (Sharma e Saharan, 2016).

A classificação dos biossurfactantes é baseada nas suas propriedades físico-químicas: glicolipídios, lipopeptídeos, lipídios neutros, ácidos graxos, fosfolipídios, poliméricos e particulados (Amaral *et al.*, 2010; Cameotra *et al.*, 2010; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011). Os biossurfactantes poliméricos são compostos por diversos grupos químicos diferentes, enquanto os particulados são vesículas ou células microbianas que possuem atividade de surfactante (Shah *et al.*, 2016). Os lipopeptídeos são os principais representantes das biomoléculas que apresentam atividade antibiótica, antiviral, antitumoral, imunomoduladora, inibidora de enzimas e de toxinas.

Além da classificação acima, os tensoativos biológicos são classificados conforme a sua massa molecular. Os particulados e poliméricos são do grupo de alta massa molecular,

exibindo como principal propriedade a capacidade de formar emulsões. Por outro lado, os surfactantes naturais que possuem baixa massa molecular - glicolipídios, lipopeptídeos e ácidos graxos - são melhores redutores de tensão (Banat *et al.*, 2010)

3.1.3. Microrganismos

Dentre os microrganismos produtores de biossurfactante, os mais estudados são as bactérias e as leveduras. Embora vários estudos foquem nas bactérias, algumas espécies são patogênicas impossibilitando a aplicação dos produtos em algumas indústrias (Fontes *et al.*, 2008). Em compensação, algumas leveduras apresentam o *status* GRAS (*generally regarded as safe*) indicando que não possuem toxicidade e patogenicidade, logo, o emprego de suas biomoléculas em diversos setores industriais é possível (Carneiro *et al.*, 2019).

3.1.3.1. Leveduras

Os fungos são organismos que conseguiram se adaptar bem as condições do planeta, habitando a Terra há milhões de anos. Eles podem ser encontrados em diversos locais da natureza apresentando papéis importantes, por exemplo decompositores de matéria orgânica (Schell, 1995).

As leveduras geralmente são unicelulares, brancas ou avermelhadas, com tamanho variando de 1 a 5 µm de diâmetro e de 5 a 30 µm de comprimento, a forma também é diversificada: esféricas, elípticas ou quase filamentosas. Elas apresentam uma membrana citoplasmática lipoproteica, responsável por regular as trocas com o meio externo, e uma parede celular rígida. As leveduras são células eucarióticas, isto é, os núcleos são envolvidos por uma membrana denominada carioteca. As formas de reprodução das leveduras podem ser sexuadas ou assexuadas, a primeira envolve a formação de esporos e a segunda ocorre por brotamento, divisão binária ou formação de artroconídios (Hoog *et al.*, 2000).

Diversos estudos utilizando leveduras para produção de biossurfactante e com diferentes objetivos já foram relatados na literatura. Sharma e colaboradores (2019) tiveram como objetivo a otimização da produção de biossurfactante pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* YK32. Camargo e colaboradores (2018) analisaram a produção de biossurfactante por oito leveduras em condições ácidas utilizando óleo de soja residual como fonte de carbono. As leveduras avaliadas pelo grupo foram: *Meyerozyma guilliermondii* (accession number KX455858), *Candida orthopsilosis* (accession number KR136231), *Cryptococcus luteolus* (accession number KR136232), *Rhodotorula glutinis* (accession number KR136236), *Rhodotorula mucilaginosa* (accession number KR136233), *Hannaela sinensis* (accession number KR136235), *Dipodascus australiensis* (accession number KR136229) and *Metschnikowia koreensis* (accession number KR136230). Visando aplicação no setor

alimentício, Ribeiro e colaboradores (2020) avaliaram a possibilidade de utilizar o biossurfactante produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670 para substituir a gema de ovo em uma formulação de biscoito.

3.1.3.1.1. *Rhodotorula mucilaginosa*

As leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* são fungos saprofíticos, pertencentes ao filo Basidiomycota. Normalmente as culturas dos fungos pertencentes ao gênero *Rhodotorula* demandam de 24 a 48 horas de incubação para serem detectáveis visualmente, apresentam uma coloração amarelada/avermelhada e possuem um aspecto liso e/ou mucoso. A temperatura ótima de crescimento varia de 25 °C a 37 °C e não são capazes de fermentar carboidratos (Fell *et al.*, 2000; Gan *et al.*, 2017; Hoog *et al.*, 2000; Kwon-Chung e Bennett, 1992).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Rhodotorula* apenas a *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula minuta* são patogênicas para os humanos. Todavia, a *Rhodotorula mucilaginosa* apesar de ser classificada como uma levedura patogênica oportunista, ela apresenta características interessantes para aplicações biotecnológicas, como produção de carotenoides (Gan *et al.*, 2017).

Elas podem ser isoladas de diferentes ambientes, solo, água, ar, poeira e substratos comumente encontrados no ambiente humano. Atualmente cresceu o interesse em fungos isolados de diferentes ecossistemas, incluindo locais com condições pouco favoráveis, como exemplo as profundezas do mar, solo e vegetação da Antártica, ambientes aquáticos hipersalinos de alta temperatura, entre outros (Butinar *et al.*, 2005; Gan *et al.*, 2017; Pavlova *et al.*, 2011). As *Rhodotorulas* têm-se destacado, para utilização em processos fermentativos, principalmente pela sua alta taxa de crescimento em matéria-prima barata (Branco *et al.*, 2010; Kwon-Chung e Bennett, 1992).

Estudos realizados por Oloke e Glick (2005) utilizando leveduras *Rhodotorula glutinis*, demonstraram que o microrganismo produziu bioemulsificante e este apresentou níveis de emulsificação significativos em querosene e óleo cru (80%). Além do que, a biomolécula apresentou taxas acima de 76% na remoção de óleo bruto de poluentes.

3.1.3.1.2. Leveduras da antártica

O interesse em microrganismos, principalmente leveduras, isolados de ambientes extremos aumentou nos últimos tempos. Pode-se encontrar locais com condições extrema nos oceanos, nas fontes termais, em locais contaminados, no Ártico e na Antártica, entre outros (Cai *et al.*, 2014). Apesar do crescente interesse nesses lugares, há poucos trabalhos envolvendo o estudo de microrganismos em ambientes frios, como o da Antártica. Então, o estudo da

microbiota da Antártica não se restringe apenas no âmbito para novas aplicações biotecnológicas, mas também para colher informações ecológicas e taxonômicas (Cabrera e Blamey, 2018; Cai *et al.*, 2014; Rosa *et al.*, 2010).

Ademais, devido às características adversas do seu ambiente de origem, microrganismos extremófilos podem apresentar características positivas, tornando atrativo o seu emprego em processos industriais. O estudo de suas substâncias bioativas também despertou o interesse de diversos pesquisadores, acredita-se que seus metabólitos secundários incomuns sejam adaptações químicas para competir por substratos ou para a defesa (Bhadury *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2011). Por exemplo, os biosurfactantes provenientes de microrganismos de ambiente frio apresentam baixa temperatura de Krafft, o que permite que sejam utilizados em diferentes temperaturas sem perderem sua atividade (Cai *et al.*, 2014).

A Antártica é um ambiente extremamente hostil, possuindo o clima mais frio e seco do planeta; mais de 99% do continente é coberto de gelo por longos períodos de tempo; possui baixa temperatura e alta variação, de 15 °C no verão a – 80 °C no inverno; ventos fortes que ultrapassam a velocidade de 100 kmh⁻¹; alta taxa de sublimação e evaporação; elevada incidência de radiação, principalmente ultra violeta e; baixa disponibilidade de água, o que influencia no crescimento e desenvolvimento de qualquer ser vivo. Apesar de todas essas condições adversas para a sobrevivência de qualquer organismo, a Antártica apresenta uma enorme diversidade biológica (Cabrera e Blamey, 2018; Margesin e Miteva, 2011; Rosa *et al.*, 2010; Ruisi *et al.*, 2007; Yergeau e Kowalchuk, 2008).

Os microrganismos são capazes de desenvolver mecanismos fisiológicos e metabólicos para superar as barreiras impostas pelo ambiente, principalmente as baixas temperaturas (Buzzini *et al.*, 2012; Ruisi *et al.*, 2007; Zucconi *et al.*, 2020). De maneira geral, organismos adaptados ao frio podem ser divididos em psicrófilos, englobam os incapazes de crescer em temperaturas acima de 20 °C, e os facultativos, os que crescem em temperaturas baixas, porém apresentam uma taxa de crescimento mais elevada quando cultivados em temperaturas acima de 20 °C (Brunati *et al.*, 2009; Buzzini *et al.*, 2012).

A biota da antártica é constituída por microrganismos que não regulam a temperatura interna, apresentam a mesma temperatura do meio, e, apesar do efeito negativo da baixa temperatura nas reações químicas, esses microrganismos conseguem crescer e mover-se em taxas similares aos de ambientes temperados (Cowan e Tow, 2004; Zucconi *et al.*, 2020). Eles apresentam diferentes tipos de adaptações, como: presença de micélios estéreis, produção de melanina e produção de vários compostos - por exemplo proteínas anticongelantes - com o objetivo de protegê-los do congelamento intracelular e reduzir os resultados deletérios da

formação dos cristais de gelo (Gilbert *et al.*, 2004; Kawahara, 2017; Margesin e Fell, 2008; Shivaji e Prakash, 2010; Zucconi *et al.*, 2020). O segredo para sobrevivência em ambientes com baixas temperaturas é a capacidade de contornar os efeitos negativos causados por elas, adaptando-se funcional e estruturalmente (Margesin e Miteva, 2011).

Kimura e Morita (1975) estudaram o efeito do biossurfactante *mannosylerythritol lipidico*, produzido pela levedura *Pseudozyma antarctica*, sobre a hidratação de peles danificadas. Eles notaram que a aplicação dessas biomoléculas reverteu os danos, de forma dose dependente, na pele. Essa pesquisa revelou que na Antártica existe leveduras capazes de produzir biossurfactantes e esses apresentam aplicabilidade em diferentes setores industriais, por exemplo na área dos cosméticos. Gesheva e colaboradores (2010) estudaram um tensoativo produzido pela levedura *Rhodococcus fascians*, também isolada da Antártica. A biomolécula reduziu a tensão superficial da água/ar para 27 mNm^{-1} , inibiu o crescimento de *B subtilis* ATCC 6633 e apresentou atividade hemolítica.

3.1.4. Propriedades dos surfactantes

Dentre as diversas propriedades dos surfactantes, a adsorção, a concentração micelar crítica, a solubilidade, a solubilização de substâncias hidrofóbicas, a microemulsão e o balanço hidrofílico/lipofílico (HLB) são as que recebem maior destaque.

A adsorção é a capacidade de acumular ou aumentar a concentração de uma determinada substância sobre a superfície de outro composto. Graças à característica anfipática do surfactante, ele se acumula na superfície de líquidos polares ou apolares e, dependendo da sua concentração, pode ficar distribuído de forma desordenada ou ordenada (Varjani e Upasani, 2017). Quando a concentração do surfactante está baixa, as moléculas tendem a se distribuir na superfície paralelamente. Com o aumento da concentração, essas moléculas se organizam de modo a formar uma camada unidirecional. Quando a camada unidirecional é formada a concentração do surfactante é denominada concentração micelar crítica (CMC) (Porter, 1991; Varjani e Upasani, 2017).

A CMC é a concentração de surfactante em que ocorre a formação das micelas. Logo, os surfactantes estão preferencialmente na forma de moléculas individuais abaixo da CMC e, acima da CMC existe um equilíbrio entre monômeros e micelas (Bognolo, 1999; Varjani e Upasani, 2017). Além disso, as micelas formadas em solução polar apresentam a parte hidrofóbica do surfactante voltadas para o centro e são chamadas de micelas diretas. Em soluções apolares encontram-se as micelas inversas, cujos núcleos são formados pela parte hidrofílica do surfactante. A CMC é influenciada por diversos fatores: a estrutura do tensoativo,

quanto maior a parte hidrofóbica menor a CMC; a temperatura; o pH e; a presença de eletrólitos e/ou compostos orgânicos (Mesquita, 2004).

A temperatura micelar crítica (TMC) ocorre quando as três fases – cristais, monômeros e micelas – encontram-se em equilíbrio e a concentração do surfactante é igual à concentração micelar crítica (Bhairi e Mohan, 2001). O ponto de turvação é a temperatura na qual a solução fica turva e é importante conhecê-la, pois ela influencia nas aplicações dos surfactantes não iônicos ou anfóteros (Nascentes *et al.*, 2002).

Solubilidade é outra propriedade importante dos surfactantes e está relacionada ao tamanho das cadeias hidrofóbicas e hidrofílicas que compõe a molécula. Se o tamanho da parte polar permanecer constante, então a solubilidade da molécula em água reduzirá com o aumento da parte hidrofóbica. O contrário também ocorre: conservando o tamanho da cadeia carbônica, à medida que aumenta o grupo polar também aumenta a solubilidade em água. A temperatura influencia na solubilização dos surfactantes em água. Os surfactantes em temperaturas muito baixas estão na forma cristalina insolúvel em água, e à proporção que a temperatura aumenta também a solubilidade.

Substâncias orgânicas são insolúveis ou pouco solúveis em água, todavia a adição de surfactantes pode aumentar essa solubilidade por meio da formação de micelas, as quais permitem que essas substâncias sejam incorporadas no interior das biomoléculas (Mulligan *et al.*, 2001; Porter, 1991; Varjani e Upasani, 2017). Microemulsão são soluções, aparentemente límpidas e estáveis, de compostos orgânicos em água, no entanto para que líquidos imiscíveis formem soluções é necessária uma grande quantidade de surfactante (Porter, 1991).

O HLB é a relação entre as partes hidrofílicas e hidrofóbicas do surfactante e é um parâmetro importante, visto que afeta as propriedades físico-químicas da molécula. Ele é alterado com a variação no tamanho das partes polares e apolares do tensoativo, aumentando com a elevação da parte hidrofílica e reduzindo com o crescimento da parte apolar (Varjani e Upasani, 2017).

3.1.4.1. Propriedades Específicas dos Biossurfactantes

Ao realizar uma comparação entre os surfactantes sintéticos e biológicos, estes apresentam desempenhos melhores em algumas propriedades do que aqueles. Por exemplo, na redução da tensão superficial e interfacial os biossurfactantes necessitam de uma menor concentração para obter os mesmos resultados que os surfactantes sintéticos (Banat, 1995; Cooper *et al.*, 1981; Mulligan, 2005).

Além disso, os biossurfactantes são estáveis em uma ampla faixa de temperaturas e de pH, ademais suportam altas concentrações salinas. Essas propriedades são interessantes para

diferentes aplicações industriais. Enquanto isso, os surfactantes sintéticos são mais susceptíveis às variações drásticas, perdendo atividade (Jezierska *et al.*, 2018).

Os surfactantes naturais são também biodegradáveis, biocompatíveis e apresentam baixa toxicidade. Por causa da preocupação da população na aplicação de surfactantes em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, além da conscientização na preservação ambiental, o interesse nessas biomoléculas aumentou (Jezierska *et al.*, 2018).

3.1.5. Vantagens e desvantagens

A biodegradabilidade e baixa toxicidade são as principais vantagens dos biosurfactantes sobre os surfactantes sintéticos, substituindo-os em alimentos, em cosméticos e em produtos farmacêuticos. Além dessas possibilidades, apresentam um elevado potencial em aplicações ambientais: aumento da recuperação de petróleo e na biorremediação de poluentes insolúveis em água (Araújo *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2014).

Essas biomoléculas também apresentam baixa concentração micelar crítica (CMC) e melhor desempenho na formação de complexo com metais pesados, na formação de espuma, na emulsificação e na solubilização. Ainda, são estáveis em variações de pH, de temperatura e de salinidade; são altamente seletivos e específicos; apresentam atividade antimicrobiana e; exibem diversidade estrutural que pode estar associado à propriedades únicas (Banat *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Nitschke e Pastore, 2002; Souza *et al.*, 2014).

Entre as desvantagens, a principal é o elevado custo de produção. Pretendendo contornar essa situação, são desenvolvidas diversas pesquisas na utilização de substratos mais baratos, utilização de microrganismos menos exigentes e otimização do processo produtivo, visando uma maior produção e menor gasto econômico (Araújo *et al.*, 2019; Gallert e Winter, 2002; Rahman *et al.*, 2002). A extração da biomolécula é outro ponto importante ao longo da cadeia produtiva, determinando a viabilidade do processo. Diferentes métodos podem ser empregados, no entanto, em larga escala, a maioria demanda grandes volumes de solvente, gerando uma alta quantidade de resíduos e encarecendo o processo (Jimoh e Lin, 2019; Kuyukina *et al.*, 2001).

3.1.6. Método de produção

Neste tópico, será abordado os tipos de fermentação mais comumente utilizados na produção industrial de surfactantes biológicos e suas vantagens. Serão relatadas também as principais fontes de resíduos agroindustriais utilizadas para substituir fontes de carbono e/ou de nitrogênio na composição do meio de cultura.

3.1.6.1. Processo fermentativo

Muitos produtos comerciais são obtidos por processos fermentativos, que consistem na utilização de fontes de carbono para geração de energia e algum outro produto (Barbieri *et al.*, 2012). As principais vantagens na utilização desses processos são: obter os produtos em qualquer época do ano, menor custo, oportunidade de utilizar substratos baratos, espaço utilizado relativamente pequeno e a possibilidade de controlar as condições de cultivo (Barbieri *et al.*, 2012). Diversos produtos podem ser obtidos por esse método, as enzimas, os antibióticos, os corantes, as vitaminas, os aminoácidos, os biopolímeros, as bebidas alcoólicas, entre outros.

Os processos fermentativos podem ser descontínuos, semicontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo. Batelada e batelada alimentada são os comumente utilizados na produção de biossurfactante, pois apresentam diversas vantagens: custos de equipamentos, acompanhamento e manutenção relativamente baixos e segurança em relação às condições de assepsia (Fontes *et al.*, 2008).

Durante o processo de batelada, adiciona-se antiespumante, ácido ou base para controlar o pH e, nos processos aeróbicos, oxigênio. Na batelada alimentada, alguns nutrientes são adicionados ao longo do processo aumentando o volume. Este último é empregado quando o microrganismo é susceptível aos fenômenos de inibição por substrato ou repressão catabólica (Fontes *et al.*, 2008).

A temperatura, o pH, a aeração e a agitação são pontos significativos relacionados às condições de fermentação, portanto, durante a otimização do processo, eles devem ser estudados. A otimização do processo e a seleção do meio de cultura utilizado é de suma relevância para se obter o máximo de rendimento com o menor custo (Fontes *et al.*, 2008).

3.1.6.1.1. Fatores que afetam a produção

O meio de cultivo afeta a capacidade do microrganismo de produzir biossurfactante, interferindo também na estrutura da biomolécula e modificando suas propriedades, estas mudanças podem ser benéficas quando alguma propriedade específica é almejada. Estudos realizados por Das e colaboradores (2008) demonstraram que ao utilizar a glicose como fonte de carbono, o biossurfactante produzido apresentou um melhor desempenho quanto à atividade antimicrobiana quando comparada ao glicerol, ao amido e à sacarose. Portanto, é imprescindível definir a composição do meio.

As fontes de carbono, nitrogênio e a presença de outros compostos (fósforo, ferro, manganês e magnésio) interferem no cultivo do microrganismo. Além disso, alguns microrganismos só produzem biossurfactantes quando estão em condições de estresse, ou quando o meio possui compostos lipofílicos (Jimoh e Lin, 2019). Após definir o meio, as

condições de cultivo - temperatura, pH, agitação e aeração - também devem ser otimizadas para garantir a qualidade e a alta produtividade (Jimoh e Lin, 2019). Logo, um estudo preliminar das condições de fermentação é fundamental para se obter a máxima produção.

A produção dessas biomoléculas pode ocorrer quando as fontes de carbono são solúveis ou insolúveis em água, todavia, na literatura há relatos que é preferível combinar substratos insolúveis em água e carboidratos. A princípio, os carboidratos seriam utilizados para gerar a parte polar da molécula do biossurfactante, enquanto os compostos lipofílicos formariam a parte apolar (Adetunji e Olaniran, 2021; Fontes *et al.*, 2008). Contudo existem vias metabólicas em que carboidratos originam hidrocarbonetos, e que compostos apolares originam compostos polares.

Compostos hidrofílicos são degradados originando intermediários da via glicolítica, precursores dos carboidratos, entretanto, eles também podem ser convertidos a acetil-CoA pela via da glicólise, posteriormente a acetil-CoA unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA formando, em seguida, ácido graxo, precursor da síntese dos lipídios (Fontes *et al.*, 2008).

Quando a fonte de carbono é um hidrocarboneto, as vias bioquímicas utilizadas para gerar a parte apolar e a polar são a lipolítica e a gliconeogênese, respectivamente. Na gliconeogênese, os ácidos graxos são oxidados gerando acetil-CoA ou propionil-CoA. A partir desses dois compostos, a via para geração dos precursores de polissacarídeo é o inverso da apresentada na glicólise. Porém, na glicólise, algumas reações são irreversíveis, as catalisadas pelas enzimas piruvato quinase e a fosfofrutoquinase-1, dessa forma outras enzimas são necessárias para reverter as reações (Fontes *et al.*, 2008).

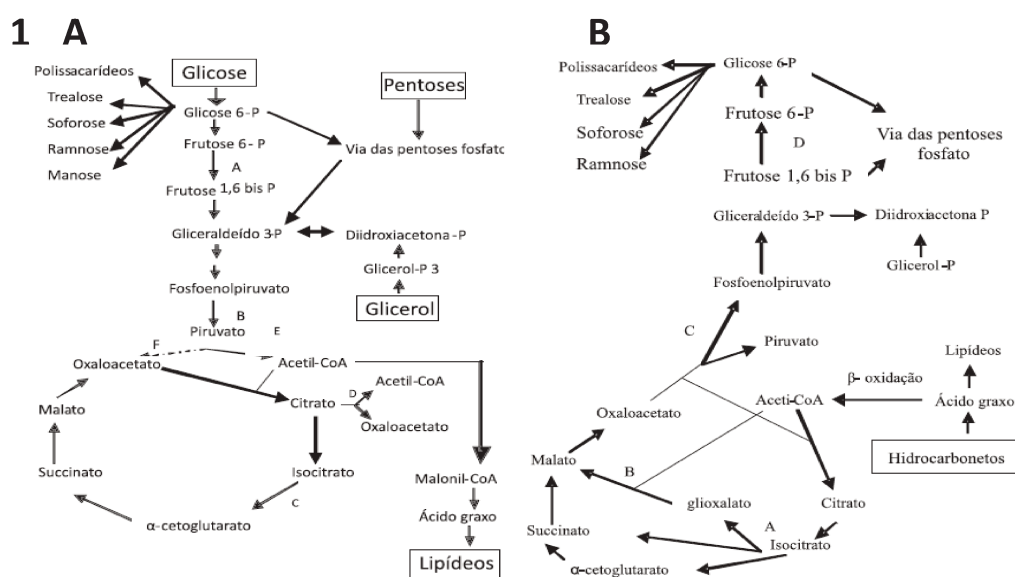


Figura 1: A - Via sintética das partes polar e apolar do biossurfactante, utilizando carboidratos como fonte de carbono. Enzimas envolvidas: A. fosfofrutoquinase; B. piruvato

quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato lipase; E. piruvato desidrogenase; F. piruvato carboxilase. **B** - Metabolismo bioquímico para síntese da molécula do surfactante, tendo como fonte de carbono hidrocarbonetos. As enzimas envolvidas são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose-1,6 bifosfatase. **Fonte:** Fontes *et al.* 2008.

O nitrogênio é indispensável para o crescimento celular e para a síntese de proteínas. O extrato de levedura é a principal fonte de nitrogênio utilizada nas culturas, todavia, a quantidade varia de acordo com o microrganismo (Fontes *et al.*, 2008).

Teóricos afirmam que a produção do biossurfactante ocorre principalmente quando a fonte de nitrogênio está esgotada, ou seja, durante a fase estacionária (Jezierska *et al.*, 2018). Albrecht e colaboradores (1996) definiram um mecanismo para investigar como a falta de nitrogênio influenciava na produção do surfactante natural. De acordo com eles, a escassez do nitrogênio reduz a atividade específica da isocitrato desidrogenase (dependente de NAD⁺ e NADP⁺), enzima responsável pela oxidação do isocitrato a α -cetoglutarato, levando ao acúmulo de isocitrato e citrato na mitocôndria. Estes dois compostos são transportados para dentro do citosol sendo o citrato clivado pela citrato sintase originando acetil-CoA (precursor da síntese de ácido graxo). A síntese da parte apolar do biossurfactante aumenta e, conseqüentemente, a produção da biomolécula também.

A relação quantitativa entre as fontes de carbono e nitrogênio é um parâmetro muito estudado. Em pesquisa realizada com a *Rhodotorula glutinis* utilizando diferentes razões C/N na produção de bioemulsificantes, notou um aumento na emulsificação com o acréscimo da relação C/N, com o nitrogênio em quantidades limitantes (Fontes *et al.*, 2008).

3.1.6.1.2. Resíduos agroindustriais

Anualmente são gerados milhões de toneladas de resíduos danosos ao meio ambiente e à saúde da população. A tentativa de utilizar esses resíduos como matéria-prima de processos biotecnológicos apresenta duas principais vantagens: redução dos custos de produção industrial de biomoléculas e redução dos descartes desses resíduos no meio ambiente (Jimoh e Lin, 2019).

Resíduos agroindustriais que possuem em sua composição alta quantidade de carboidratos e lipídeos são considerados promissores para aplicação na produção de biossurfactantes (Banat *et al.*, 2000). Esses resíduos provêm de diferentes atividades industriais - processamento de batatas e de óleos de sojas, de milho, de cocos, de amendoins, de canoas, dentre outras - e de detritos domésticos e comerciais, como os óleos de fritura (Gallert e Winter, 2002; Jimoh e Lin, 2019).

Thavasi e colaboradores (2007) produziu biossurfactante utilizando fontes renováveis, baratas e facilmente disponíveis. Testaram três microrganismos e observaram que todos produziram um complexo glicopeptídico capaz de emulsionar diferentes hidrocarbonetos.

O principal empecilho na utilização de resíduos para o meio de cultivo está na adequada composição de nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos e para a formação da biomolécula de interesse. Além disso, despesas com transporte, armazenamento e tratamento prévio podem encarecer o processo (Nitschke e Pastore, 2003; Singh *et al.*, 2019).

3.1.6.1.2.1. Abacaxi (*Ananas comosus*)

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de abacaxi (*Ananas comosus*), possuindo 58.000 hectares plantados e sua produção abrange todo o território nacional. A maior parte dos frutos é comercializada no mercado interno na forma de fruta in natura, e a produção está distribuída principalmente nos Estados do Norte e do Nordeste. A cultivar nacional Pérola, também chamada de Branco de Pernambuco, é a mais cultivada, visto que possui uma acidez menos pronunciada, é colhida em regiões quentes durante o ano inteiro e foi mais aceita pelo consumidor brasileiro (Meletti *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2012).

A cultivar Smooth Cayenne ou Hawai é produzida principalmente pelos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Estima-se que a área de plantio de abacaxi na região do Triângulo Mineiro seja de 5000 hectares, com média de 2500 a 3000 hectares/ano e com produção de 30 a 35 toneladas de fruta/hectare. No período de abril a setembro, as indústrias mineiras e as da região Sul do país processam cerca de 60% da produção nacional de abacaxi, sendo 40% utilizados para o consumo “in natura”. No período de outubro a março, o consumo do abacaxi “in natura” aumenta para 60% (Ferreira, 2007).

Durante o processo industrial, coroa, folhas e talo são removidos. Os resíduos gerados - casca, talo, coroa e folhas - contabilizam cerca de 50% (p/p) do peso total do abacaxi. Esses resíduos possuem elevado potencial econômico uma vez que podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado através de processos biotecnológicos.

3.1.6.1.2.2. Caju (*Anacardium occidentale*)

O cajueiro (*Anacardium occidentale*) pertence à família *anacardiaceae*, é nativo da América do Sul e cresce também nos trópicos das Américas, da África e da Ásia. Ele é comumente dividido em dois grupos, o comum e o anão, sendo o primeiro de maior porte e mais difundido do que o segundo (Crisóstomo *et al.*, 2003; Pinho, 2009).

A castanha é o verdadeiro fruto do cajueiro, com 2.5 a 3.0 cm de comprimento; 2.5 cm de largura e; coloração marrom-acinzentado. O pedúnculo é o pseudofruto do caju, com 5

a 10 cm de comprimento, 4 a 8 cm de largura e casca fina e cerosa de coloração avermelhada, amarelada ou vermelha e amarelada. A polpa é amarela pálida, macia, fibrosa, succulenta, adstringente, ácida a subácida e apresenta aroma característico. O pedúnculo é altamente nutritivo e apresenta em sua composição diferentes vitaminas, minerais e compostos fenólicos (Pinho, 2009).

A produção anual no Nordeste de castanha de caju é cerca de 200 mil toneladas por ano, resultando em uma produção de aproximadamente 2 milhões de toneladas de pedúnculo por ano, das quais 80% são desperdiçadas (1.5 milhões de toneladas) todo ano. Os principais fatores para o elevado desperdício estão relacionados, principalmente, ao pequeno período de pós-colheita e de safra, insuficiente aproveitamento pela indústria e ausência de métodos efetivos para preservar o pseudofruto (Paiva *et al.*, 2000; Pinho, 2009).

A utilização do pseudofruto como componente de meio de cultivo em processos fermentativos justifica-se pelo seu alto valor nutritivo e pela incapacidade do mercado em utilizar totalmente as toneladas geradas anualmente. Além disso, esse acúmulo de material orgânico pode ser danoso ao meio ambiente.

3.1.7. Aplicações

Em razão das suas propriedades, os surfactantes apresentam inúmeras utilizações nos setores industriais. Possui propriedades que possibilitam sua utilização em produtos de higiene pessoal, cosméticos e farmacêuticos. Eles também podem ser empregados na recuperação de áreas contaminadas por meio de uma técnica biológica intitulada biorremediação (Jimoh e Lin, 2019).

A biorremediação utiliza organismos vivos ou os seus metabólitos para remover, reduzir ou neutralizar poluentes orgânicos e inorgânicos. A molécula de tensoativo seria produzida pelos microrganismos do próprio local contaminado, por microrganismos adicionados na área afetada, ou ainda produzida *ex situ* e depois inserida no ambiente. A aplicação do surfactante tem como propósito auxiliar os microrganismos na degradação dos contaminantes (Tonini *et al.*, 2010).

Os surfactantes também podem ser empregados na limpeza de reservatórios de óleos; na recuperação melhorada do petróleo (MEOR); nos tratamentos terapêuticos, com função de antibióticos, de antivirais, de antifúngicos e de antitumorais; nas formulações de herbicidas e pesticidas e; na mineração, manipulados para a flotação e separação de alguns minerais (Jezierska *et al.*, 2018).

Das e colaboradores (2008) relataram que frações lipopetídicas do biosurfactante produzido por *B. circulans* têm ação antimicrobiana. Resultados semelhantes foram obtidos por

Mukherjee e colaboradores (2009). Estudando *B. circulans* marinhos, eles purificaram um biossurfactante com atividade contra microrganismos. Em relação às outras aplicações, diversos estudos envolvendo remoção de metais pesados já foram realizados. Das e colaboradores (2009) observaram que biossurfactantes, de baixa CMC, concentrados removeram 100 ppm de chumbo e cádmio.

4. Materiais e métodos

4.1. Microrganismos

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (código de isolamento L69) obtida a partir de algas (algas marinhas) coletadas em Punta Plaza (Admiralty Bay, Ilha King George, Antártica) e taxonomicamente identificada de acordo com Duarte e colaboradores (2013) foi usada no presente estudo. Esta cepa está depositada no Centro de Recursos Microbianos (CRM – UNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Brasil) sob o número de acesso CRM 747. A levedura foi conservada pelo método de criopreservação com 50% (v/v) de glicerol.

4.2. Pré- inóculo

Para adaptação e crescimento da levedura, 1 mL do criotubo (glicerol e microrganismo) foi incubado em 100 mL de YPD (g.L⁻¹): glicose (10), peptona (5) e extrato de levedura (3) por 72 horas e 15 °C com 120 rpm de agitação.

4.3. Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais de abacaxi (*Ananas comosus*) e caju (*Anacardium occidentale*) foram adquiridos nos mercados locais, lavados com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% (v/v) e processados no laboratório. Os resíduos do abacaxi constaram basicamente de casca e folhas do abacaxizeiro. Os resíduos do caju constaram basicamente do pedúnculo do fruto do cajueiro. Realizou-se a quantificação de açúcares totais pela metodologia modificada descrita por Miller (1959). Inicialmente procedeu-se com a hidrólise ácida, adicionando HCl 2N (v/v), permanecendo 5 minutos em banho-maria e, posteriormente, 5 minutos em banho de gelo, adicionando em seguida NaOH 2N. Após a hidrólise ácida, fez-se diluições das amostras e adicionou-se em tubos *folin wu* 0.5 mL das amostras diluídas e 1 mL do reagente DNS, deixando em banho-maria e banho de gelo por 5 minutos cada. Completou-se os tubos *folin wu* com água destilada até a marcação de 12.5 e, finalmente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados das absorbâncias foram transformados em g.L⁻¹ utilizando a equação $y = 3570,5x$ obtida pela plotagem dos dados da curva padrão, com coeficiente de correção linear (R^2) = 0.9973. As análises foram realizadas em triplicatas e procedendo com três leituras para cada repetição, gerando nove resultados.

4.4. Influência da fonte de carbono e nitrogênio na produção do biossurfactante

Para análise da influência da fonte de carbono e da de nitrogênio na produção do biossurfactante, uma densidade óptica (DO), a 600 nm, do pré-inóculo foi transferida para Erlenmeyer de 200 ml contendo 150 ml do meio YPD modificado para seleção da fonte de carbono e da de nitrogênio. Para a seleção da fonte de carbono realizou-se a substituição da glicose por fontes alternativas em quantidades suficientes para atingir uma concentração final

de 10 g.L⁻¹ de açúcares redutores. A avaliação da fonte de nitrogênio foi realizada substituindo-se o extrato de levedura e a peptona a uma concentração de 2 g.L⁻¹. Análises do índice de emulsificação em óleo mineral e da tensão superficial foram realizadas para avaliar o desempenho do microrganismo em produzir biossurfactante em relação às fontes alternativas testadas. A Tabela 1 apresenta as fontes de carbono testada, e a Tabela 2 as fontes de nitrogênio.

4.4.1. Tensão superficial

Para análise da tensão superficial, utilizou-se 5 ml da amostra. O método utilizado foi o do anel de Noüy (1925), com o tensiômetro modelo K6 (Krüss GmbH, Humburgo, Alemanha), à temperatura ambiente. Concomitantemente a análise da amostra foi realizada a tensão do álcool etílico com o intuito de calibrar, realizando posteriormente uma divisão do valor padrão pelo valor real, razão multiplicada com o valor da tensão obtida da amostra.

4.4.2. Índice de Emulsificação (E_{24%})

O índice de emulsificação foi determinado a partir da metodologia descrita por Cai e colaboradores (2014), a qual consiste na mistura da amostra com óleo mineral, na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi agitada vigorosamente em vortex durante dois minutos à temperatura ambiente e deixada em repouso por 24 horas. A taxa de emulsificação foi calculada pela divisão da altura da parte emulsificada pela altura total e a razão multiplicada por 100 (para obter o resultado em porcentagem), como demonstrado na equação (1):

$$\% = \frac{\text{altura da emulsão} \times 100}{\text{altura total}} \quad (1)$$

Tabela 1: Fontes de carbono

Fonte de Nitrogênio (2 g.L ⁻¹)	Fonte de Carbono (10 g.L ⁻¹)	Solução Salina
Nitrato de Amônio	Acetato de sódio	
	Citrato de sódio	
	Glicose	10 g.L ⁻¹ NaCl
	Sacarose	5 g.L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄
	Peptona	2 g.L ⁻¹ KH ₂ PO ₄
	Extrato de levedura	0.2 g. L ⁻¹
	Extrato do abacaxi	MgSO ₄ .7H ₂ O
	Extrato do caju	

* fermentação submersa: 56 horas a 120 rpm de agitação e 15 °C.

Tabela 2: Fontes de nitrogênio

Fonte de Carbono (10 g.L ⁻¹)	Fonte de Nitrogênio (2 g.L ⁻¹)	Solução Salina
sacarose	Citrato de amônio	10 g.L ⁻¹ NaCl
	Nitrato de amônio	5 g.L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄
	Sulfato de amônio	2 g.L ⁻¹ KH ₂ PO ₄
	Peptona	0.2 g.L ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O
	Extrato de levedura	

** fermentação submersa: 56 horas a 120 rpm de agitação e 15 °C.*

4.5. Otimização do meio utilizando resíduo agroindustrial

Para todos os planejamentos experimentais, uma densidade óptica (DO), a 600 nm, do pré-inóculo foi transferida para Erlenmeyer de 200 ml contendo 150 ml do meio determinado na matriz do planejamento, Tabelas 4, 6 e 8. As respostas para os diferentes ensaios realizados com as variáveis foram: tensão superficial, índice de emulsificação em óleo mineral (descritas no item: 4.3.1 e 4.3.2) e rendimento.

4.5.1. Rendimento

Ao longo do planejamento experimental a extração do biossurfactante foi realizada segundo a metodologia de Silva e colaboradores (2010) utilizando como solvente uma solução de clorofórmio e metanol (item 4.5.1.1). Após a otimização do meio de cultura, realizou-se uma análise com seis diferentes metodologias gravimétricas para extração de biossurfactante, objetivando selecionar a mais eficiente e eficaz. Após a centrifugação do caldo fermentado por 20 minutos a 8.000 G, para remoção das células, as seguintes etapas foram realizadas para cada metodologia

4.5.1.1. Extração por Clorofórmio e metanol

A amostra foi acidificada para pH 2 utilizando HCl 6M. Após adicionou-se na amostra a solução de clorofórmio/metanol na proporção de 2:1 (v/v). A mistura manteve-se em agitação a 120 rpm por 15 minutos. Em seguida, deixou-se a mistura em repouso, em um funil de separação, até a ser possível definir as duas fases (a orgânica e a inorgânica) e recuperou-se a fase orgânica. Extraíu-se a maior parte do solvente, da fase que continha o biossurfactante, utilizando o rotaevaporador a 60 °C. O resíduo do solvente foi evaporado em estufa de circulação forçada a 37 °C. O rendimento do biossurfactante foi obtido através do método gravimétrico (Silva *et al.*, 2010).

4.5.1.2. Extração por acetato de etila e metanol

Segundo metodologia descrita em Rivardo e colaboradores (2009), a amostra foi acidificada para pH 2 utilizando HCl 6M e deixada incubando por quatro horas a 4 °C. Após adicionou-se na amostra a solução de acetato de etila/metanol na proporção de 4:1 (v/v). A mistura manteve-se em agitação a 120 rpm por 10 minutos. Em seguida, deixou-se a mistura em repouso, em um funil de separação, até ser possível definir as duas fases (a orgânica e a inorgânica) e recuperou-se a fase orgânica. Extraíu-se a maior parte do solvente, da fase que continha o biossurfactante, utilizando o rotaevaporador a 80 °C. O resíduo do solvente foi evaporado em estufa de circulação forçada a 37 °C. O rendimento do biossurfactante foi obtido através do método gravimétrico.

4.5.1.3. Extração por acetato de etila

A amostra foi acidificada para pH 2 utilizando HCl 6M e deixada incubando overnight a 4 °C. Após adicionou-se na amostra acetato de etila (v/v). A mistura manteve-se em agitação a 120 rpm por 10 minutos. Em seguida, deixou-se a mistura em repouso, em um funil de separação, até ser possível definir as duas fases (a orgânica e a inorgânica) e recuperou-se a fase orgânica. Extraíu-se a maior parte do solvente, da fase que continha o biossurfactante, utilizando o rotaevaporador a 80 °C. O resíduo do solvente foi evaporado em estufa de circulação forçada a 37 °C. O rendimento do biossurfactante foi obtido através do método gravimétrico (Sen *et al.*, 2017).

4.5.1.4. Extração por acetato de etila com agitação vigorosa

A metodologia descrita no trabalho de Yin e colaboradores (2009) foi modificada. De forma resumida: adicionou-se acetato de etila na amostra (v/v). A mistura foi submetida a rigorosa agitação em vortex por 2 minutos. Em seguida, deixou-se a mistura em repouso, até ser possível definir as duas fases (a orgânica e a inorgânica) e recuperou-se a fase orgânica. O solvente, da fase que continha o biossurfactante, foi evaporado em estufa de circulação forçada a 37 °C. O rendimento do biossurfactante foi obtido através do método gravimétrico.

4.5.1.5. Extração por acetato de etila e hexano

Adicionou-se na amostra acetato de etila (v/v). Em seguida, deixou-se a mistura em repouso, em um funil de separação, até ser possível definir as duas fases (a orgânica e a inorgânica) e recuperou-se a fase orgânica. Extraíu-se o solvente, da fase que continha o biossurfactante, utilizando o rotaevaporador a 80 °C. O biossurfactante foi ressuscitado em hexano e submetido novamente a rotaevaporação a 70 °C, repetindo este procedimento três vezes. Por fim, o resíduo do solvente (hexano) foi evaporado em estufa de circulação forçada a

37 °C. O rendimento do biossurfactante foi obtido através do método gravimétrico (Daverey e Pakshirajan, 2010).

4.5.1.6. Extração por acetona fria

Segundo metodologia descrita em Ilori e Amund (2001), adicionou-se na amostra acetona fria na proporção 1:3 (v/v) e deixou-se incubando por 10 horas a 4 °C. A presença da acetona fria provocou a precipitação do biossurfactante, que, após a incubação, foi ressuspenso em água destilada. A água foi evaporada em estufa de circulação forçada a 37 °C. O rendimento do biossurfactante foi obtido através do método gravimétrico.

4.5.2. Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1}

A metodologia de resposta de superfície e a curva de contorno descrita por Box e colaboradores (1978) foi utilizada no planejamento experimental e otimização, tendo em vista que estes são os desenhos experimentais de primeira-ordem mais populares. Após selecionar a fonte de carbono e nitrogênio, o melhor substrato agroindustrial para a produção de biossurfactante foi avaliado conjuntamente com outras variáveis (Tabela 3) em um Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} , em dois níveis (+1 e -1), com quatro repetições dos ensaios apenas no ponto central, resultando em um total de 20 ensaios.

Tabela 3: Níveis e variáveis utilizados no planejamento experimental 2^{5-1}

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração do Abacaxi (g.L ⁻¹)	5	10	15
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	5	10	15
pH	4	6	8
Sulfato de amônio (g.L ⁻¹)	0.5	1.0	1.5
Peptona (g.L ⁻¹)	0.5	1.0	1.5

*solução salina (g.L⁻¹): NaCl (10), Na₂HPO₄ (5), KH₂PO₄ (2) e MgSO₄.7H₂O (0.2).

*fermentação submersa: 15 °C e 120 rpm de agitação, em dois intervalos de tempo: 24 e 48 horas.

Tabela 4: Matriz do planejamento experimental 2^{5-1}

Ensaio	Extrato de levedura	Extrato do abacaxi	Peptona	Sulfato de amônio	pH
1	-1	-1	1	-1	-1
2	-1	-1	-1	-1	1

3	1	1	-1	1	-1
4	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	1
6	-1	-1	-1	-1	-1
7	1	-1	-1	-1	-1
8	1	-1	-1	1	1
9	1	1	1	-1	-1
10	-1	1	-1	1	1
11	1	-1	1	-1	1
12	0	0	0	0	0
13	-1	1	1	1	-1
14	-1	-1	1	1	1
15	1	-1	1	1	-1
16	0	0	0	0	0
17	1	1	-1	-1	1
18	-1	1	1	-1	1
19	0	0	0	0	0
20	-1	1	-1	-1	-1

4.5.3. Planejamento em estrela com três variáveis

O planejamento em estrela ou planejamento composto central é utilizado com o intuito de encontrar o ponto ótimo das variáveis estudadas e é o que requer menos ensaios para se propor um modelo quadrático. A realização desse planejamento se fez necessária, visto que com o planejamento anterior não foi possível obter a região de maximização para as variáveis estudadas. Para fazer o planejamento em estrela, acrescentou-se ao planejamento inicial um planejamento idêntico, porém girado 45° em relação à orientação de partida. Os novos pontos ficaram localizados a uma distância de $(2^n)^{\frac{1}{4}}$ do ponto central, onde n é o número de entradas, neste trabalho, $(2^3)^{\frac{1}{4}} = (8)^{\frac{1}{4}} = \sqrt[4]{8}$. O planejamento em estrela foi realizado em dois níveis (+1 e -1), com quatro repetições dos ensaios apenas no ponto central. Os dados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 5: Níveis e variáveis utilizados no planejamento experimental composto central

Variáveis	Níveis				
	$-\sqrt[4]{8}$	-1	0	+1	$\sqrt[4]{8}$
Concentração do Abacaxi (g.L ⁻¹)	1.59104	5	10	15	18.40896
Sulfato de amônio (g.L ⁻¹)	0.159104	0.5	1.0	1.5	1.840896
Peptona (g.L ⁻¹)	0.159104	0.5	1.0	1.5	1.840896

*solução salina (g.L⁻¹): NaCl (10), Na₂HPO₄ (5), KH₂PO₄ (2) e MgSO₄.7H₂O (0.2); extrato de levedura: 15 g.L⁻¹; pH = 8.

*fermentação submersa: 24 horas a 120 rpm de agitação e 15 °C.

Tabela 6: Matriz do planejamento experimental composto central

Ensaio	Extrato do abacaxi	Peptona	Sulfato de amônio
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	$-\sqrt[4]{8}$	0	0
10	$\sqrt[4]{8}$	0	0
11	0	$-\sqrt[4]{8}$	0
12	0	$\sqrt[4]{8}$	0
13	0	0	$-\sqrt[4]{8}$
14	0	0	$\sqrt[4]{8}$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	-1	-1	-1

20	-1	-1	1
----	----	----	---

4.5.4. Planejamento em estrela com duas variáveis

Um segundo planejamento experimental composto central em dois níveis (-1 e +1), com quatro repetições dos ensaios apenas no ponto central foi realizado, pois apenas com os dois planejamentos experimentais anteriores não foi possível determinar as concentrações ótimas das variáveis analisadas. Neste planejamento, as variáveis avaliadas foram concentração do extrato do abacaxi e peptona, deslocando o ponto central do fator concentração do caldo de abacaxi para 20 g.L⁻¹. Como o novo planejamento envolvia apenas duas variáveis, os novos pontos ficaram localizados a uma distância de $\sqrt[4]{4} = \sqrt{2}$. Os dados do segundo planejamento em estrela encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Níveis e variáveis utilizados no segundo planejamento experimental composto central

Variáveis	Níveis				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$\sqrt{2}$
Concentração do Abacaxi (g.L ⁻¹)	12.92893	15	20	25	27.07107
Peptona (g.L ⁻¹)	0.292893	0.5	1.0	1.5	1.707107

*solução salina (g.L⁻¹): NaCl (10), Na₂HPO₄ (5), KH₂PO₄ (2) e MgSO₄.7H₂O (0.2); extrato de levedura: 15 g.L⁻¹; Sulfato de amônio: 1 g.L⁻¹; pH = 8.

* fermentação submersa: 24 horas a 120 rpm de agitação e 15 °C.

Tabela 8: Matriz do planejamento experimental composto central

Ensaio	Extrato do abacaxi	Peptona
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	$-\sqrt{2}$	0
6	$\sqrt{2}$	0
7	0	$-\sqrt{2}$
8	0	$\sqrt{2}$
9	0	0

10	0	0
11	0	0
12	0	0

4.6. Curva de crescimento e produção do biossurfactante

Para traçar a curva de crescimento e produção do biossurfactante no meio otimizado, uma densidade óptica (DO), a 600 nm, do pré-inóculo foi transferida para Erlenmeyer de 200 ml contendo 150 ml do meio otimizado (g.L⁻¹): extrato do abacaxi (25), extrato de levedura (15), peptona (1.5), Sulfato de amônio (1); em solução salina (g.L⁻¹): NaCL (10), Na₂HPO₄ (5), KH₂PO₄ (2) e MgSO₄.7H₂O (0.2).

Os Erlenmeyers foram incubados a 15 °C e 120 rpm por 24 horas ou 30 horas, com ou sem suplementação da fonte de carbono após 10 e 20 horas de fermentação. Para os testes em que realizaram a suplementação, foi feito adicionando extrato de abacaxi com o objetivo de a concentração final do meio possuir 25 g.L⁻¹ de glicose. Amostras foram coletadas de duas em duas horas durante a produção do biossurfactante para determinar a concentração da biomassa, produção do biossurfactante (metodologia descrita no item: 4.5.6) e consumo de açúcar redutores. O crescimento da levedura foi determinado medindo a densidade ótica a 600 nm.

4.7. Hidrofobicidade Celular

A hidrofobicidade celular foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Lin e colaboradores (2005). As células de uma pré-cultura foram lavadas duas vezes com água destilada e ressuspensas em tampão PUM (g.L⁻¹): K₂HPO₄.3H₂O (22.2), KH₂PO₄ (7.26), ureia (1.8), MgSO₄.7H₂O (0.2), com volume final de 2 mL e 1 de densidade ótica a 600 nm. A essas células adicionou-se os hidrocarbonetos em diferentes volumes, permanecendo a mistura incubada a 30 °C por 10 minutos. Posteriormente agitou-se a mistura em vortex por 2 minutos, permanecendo em repouso por mais 10 minutos para separar os hidrocarbonetos da fase aquosa. Retirou-se a fase aquosa cuidadosamente e mensurou a absorbância a 600 nm. Os hidrocarbonetos testados foram: querosene, óleo mineral e óleo de soja, nos volumes (mL): 0, 0.4, 0.8 e 1.2.

4.8. Caracterização da biomolécula

4.8.1. Concentração Micelar Diluída (CMD)

Para determinar a concentração micelar diluída empregou-se a medição da tensão superficial utilizando a técnica descrita por Desai e Banat (1997) denominada diluição micelar crítica (CDM). Quando a concentração do surfactante é maior que a CMD a tensão superficial se mantém constante num valor mínimo, porém quando esta concentração está abaixo da CMD

a tensão superficial aumenta. No teste a amostra foi diluída em diferentes concentrações (de 300 a 0.05 g.L⁻¹) e a tensão superficial foi determinada para cada concentração.

4.8.2. Estabilidade da Emulsão

A estabilidade da emulsão foi realizada ao longo de 30 dias com coleta de dados nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 de experimento. A análise do E_{24%}, segundo metodologia de Cai e colaboradores (2014) descrita no item 4.3.2, foi utilizada para determinar a variação da emulsão durante os 30 dias. As concentrações do biossurfactante extraído testadas foram: ½ CMD (29,57 g.L⁻¹), CMD (59,14 g.L⁻¹) e 2CMD (118,28 g.L⁻¹), além das concentrações do biossurfactante extraído, o extrato bruto (caldo fermentado livre de células) também foi submetido ao teste.

4.8.3. Teste de Estabilidade

A estabilidade do biossurfactante produzido foi avaliada sob diferentes estresses seguindo a metodologia de Dubey e colaboradores (2012). As amostras do biossurfactante, em três diferentes concentrações: ½CMD, CMD e 2CMD, foram submetidas aos estresses por 10 minutos. Seguidamente, realizou-se os testes de E_{24%}, segundo metodologia de Cai e colaboradores (2014) descrita no item 4.3.2, e de tensão superficial, de acordo com a metodologia de Noiyy (1925) descrita no item 4.3.1. Os resultados foram comparados ao controle, amostras que não foram submetidas a nenhum estresse.

4.8.3.1. Temperatura

No teste de estabilidade térmica as amostras foram submetidas às seguintes temperaturas (°C): -70, -4, 10, 20, 40, 60, 80 e 100. A câmara fria foi utilizada para o teste na temperatura de -70 °C, empregou-se o congelador para atingir a temperatura de -4 °C e para as demais temperaturas usou-se banho em termociclador.

4.8.3.2. pH

Na análise da estabilidade em relação ao pH diferentes tampões foram empregados com o intuito de manter o pH das amostras inalterado no decorrer das análises. Os valores testados foram: 2, 4.2, 6.2, 8.2 e 10.

4.8.3.3. Salinidade

No teste para averiguar a estabilidade do biossurfactante em relação à salinidade, testou-se 7 diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (g.L⁻¹): 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100.

4.9. Aplicação Biotecnológica

Para os experimentos da aplicação biotecnológica utilizou-se óleo de motor usado e água doce obtida na represa localizada no Complexo Parque do Sabiá, Uberlândia, Minas

Gerais, Brasil. Os experimentos foram realizados segundo a metodologia modificada de Santos e colaboradores (2017). Frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo água da represa e 1 mL do hidrocarboneto, sendo o volume final após adição de todos os componentes de 50 mL. Os frascos foram incubados em shaker rotativo a 120 rpm e 28°C durante 30 dias. Amostras foram retiradas nos dias 1, 7, 21 e 30 de experimento totalizando quatro amostras. Todo o experimento foi realizado em triplicata. O experimento foi conduzido nas seguintes condições:

Tabela 9: Condições experimentais para teste de biorremediação da água doce contaminada por óleo de motor

Amostras	Composição
Controle - estéril	Água + hidrocarboneto
Controle - não estéril	Água + hidrocarboneto
Condição 1 - estéril	Água + hidrocarboneto + L69
Condição 2 - estéril	Água + hidrocarboneto + L69 + BS (CMD)
Condição 1 - não estéril	Água + hidrocarboneto + BS (CMD)

Legenda: L69 – adição de 1DO do pré-inóculo da levedura Rhodotorula mucilaginosa CRM 747; BS (CMD) – adição de 59,14 g.L⁻¹ do biossurfactante extraído.

5. Resultados e Discussão

5.1. Influência da fonte de Carbono e Nitrogênio na produção de biossurfactante

No presente trabalho a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, codificada por L69, foi submetida a diferentes condições de meio de cultura, onde duas variáveis foram testadas, fonte de carbono e fonte de nitrogênio. A temperatura e o tempo de fermentação para crescimento e produção da biomolécula foi 15 °C e 56 hr. Nas Tabelas 1 e 2, contidas no subtópico 4.3, encontram-se as concentrações de cada composto para formulações dos meios, contendo diferentes fontes de carbono ou diferentes fontes de nitrogênio.

As Figuras abaixo demonstraram os resultados de tensão superficial e índice de emulsificação em óleo mineral com a finalidade de selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a levedura L69.

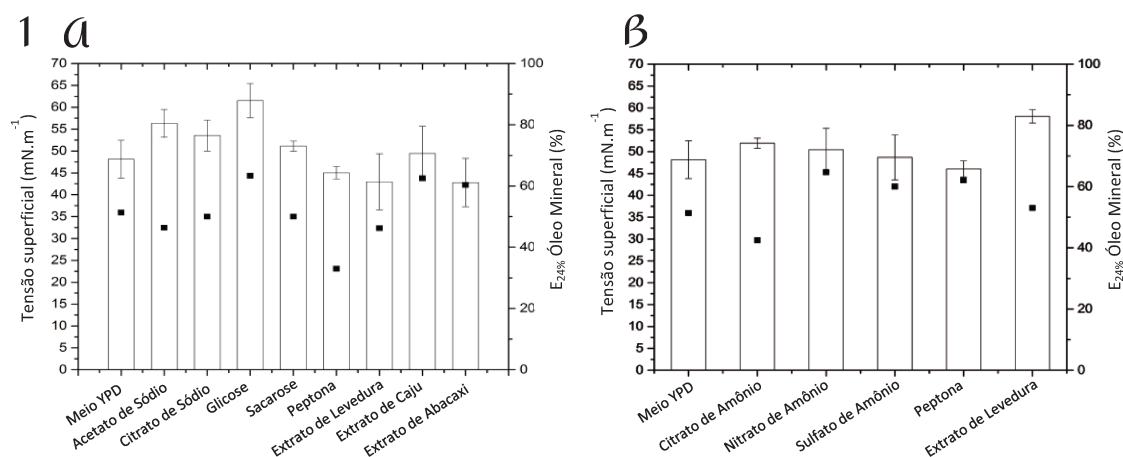


Figura 2: Tensão superficial (mN.m^{-1}) e índice de emulsificação em óleo mineral (%) da levedura L69. **A** - Diferentes fontes de Carbono. **B** – Diferentes fontes de Nitrogênio. **Legenda:** Colunas representam os resultados da tensão superficial e os ■ representa os dados do índice de emulsificação.

Os testes de tensão superficial e índice de emulsificação em óleo mineral ($E_{24\%}$) foram escolhidos para seleção dos melhores meios, pois, de acordo com a literatura, as duas principais propriedades dos surfactantes estão relacionadas as suas capacidades de reduzir a tensão superficial e interfacial e de emulsionar soluções imiscíveis.

De acordo com análises da Figura 2-A, observa-se que os melhores resultados para índice de emulsificação foram obtidos pelos meios contendo como fontes de carbono a glicose, o extrato do abacaxi e o de caju, quando comparados ao meio padrão YPD e os demais meios testados, com índices acima de 60%. Segundo Bharali e colaboradores (2011), um índice de emulsificação para ser significativo precisar ser igual ou superior a 60 %, justificando a escolha desses meios. Em relação à análise da tensão superficial, considerando que inicialmente o meio

apresentava tensão superficial de aproximadamente 60 mN.m^{-1} , os melhores resultados foram obtidos com a peptona (45 mN.m^{-1}), o extrato de levedura (43 mN.m^{-1}) e o extrato do abacaxi (43 mN.m^{-1}).

Realizou-se análise estatística, com 95% de confiança, comparando os dados do extrato do abacaxi e do extrato do caju. Após essa análise comprovou-se que eles são estatisticamente iguais, portanto, nos testes eles produzem resultados semelhantes. Os meios selecionados por apresentarem o melhor desempenho nos dois testes foram o de abacaxi e o de extrato de levedura. A preferência na utilização do meio obtido através dos resíduos do abacaxi deve-se pela facilidade em encontrar a fruta, pois é típica da região Sudeste. O extrato de levedura foi selecionado por ter apresentado maior redução da tensão superficial (43 mN.m^{-1}). Estudos semelhantes foram realizados por Sarubbo e colaboradores (2007). Eles estudaram a produção de biossurfactante pela levedura *Candida lipolytica* em diferentes meios. Os pesquisadores observaram que a biomolécula produzida no meio contendo 10% de óleo de canola e 10% de glicose foi capaz de reduzir a tensão superficial de 71 para 34 mN.m^{-1} nas primeiras 48 horas de fermentação.

Os dados referentes aos meios para análise das melhores fontes de nitrogênio estão representados na Figura 2-B. Os meios que obtiveram os melhores resultados na avaliação do índice de emulsificação foram os que tinham em sua composição o nitrato de amônia (65%), o sulfato de amônio (60%) e a peptona (62%). Em relação ao teste da tensão superficial, os melhores resultados foram os dos meios com o Sulfato de amônio (48 mN.m^{-1}) e a peptona (46 mN.m^{-1}) como fontes de nitrogênio. Avaliou-se os resultados obtidos pelos três melhores meios (o nitrato de amônia, o sulfato de amônio e a peptona) nos dois ensaios considerados e optou-se por selecionar como fontes de nitrogênio mais promissoras o sulfato de amônio e a peptona, pois apresentaram resultados satisfatórios nos dois testes.

Abouseoud e colaboradores (2008) estudaram a influência das fontes de carbono e de nitrogênio no crescimento e produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas fluorescens*. Eles utilizaram os testes de índice de emulsificação em gasolina e da tensão superficial para compararem o desempenho da bactéria em cada meio analisado. As fontes de carbono testadas foram o hexadecano, o óleo de oliva e a glicose. A bactéria foi capaz de crescer em todos os meios testados, porém o rendimento foi limitado quando utilizou a glicose ou hexadecano como fontes de carbono. Os resultados obtidos com a utilização do hexadecano e da glicose foram similares. Em ambos o surfactante conseguiu reduzir a tensão superficial (cerca de 40 dyne/sm), porém não obteve um índice de emulsificação significativo ($E_{24\%} = 10\%$). O óleo de oliva foi o que obteve o melhor resultado, a biomolécula foi capaz de reduzir

a tensão superficial para 28 dyne/cm e o $E_{24\%}$ atingiu o valor de 49%. Em relação à fonte de nitrogênio, eles testaram o cloreto de amônia ($E_{24\%} = 60\%$ e tensão superficial de 40 dyne/cm), o nitrato de amônia ($E_{24\%} = 56\%$ e tensão superficial de 31 dyne/cm) e o nitrato de sódio ($E_{24\%} = 10\%$ e tensão superficial de 35 dyne/cm). A máxima atividade de emulsificação e a maior redução da tensão superficial foi alcançada com o meio contendo o nitrato de amônia.

Em concordância com os dados apresentados pelos Abouseoud e pesquisadores utilizando hexadecano como fonte de carbono, Cai e colaboradores (2014) caracterizaram o biossurfactante através das análises de tensão superficial e de índice de emulsificação de diferentes linhagens de microrganismos. Os resultados para três *Acinetobacter* (P1-1A, P7-1A e P9-1A) e duas *Rhodococcus* (P5-1A e P6-4P) apresentaram resultados significativos para emulsificação em hexadecano ($E_{24\%} > 50\%$), contudo o mesmo desempenho não foi apresentado no teste de tensão superficial, apresentando valores elevados próximos ou superiores a 50 dynes/cm. Dessa forma, demonstraram que a diminuição da tensão superficial e a capacidade emulsionante não estão necessariamente correlacionadas.

5.2. Otimização do meio utilizando resíduo agroindustrial

Após a seleção das melhores fontes de carbono e de nitrogênio, buscou-se selecionar o meio de cultura ótimo para crescimento e produção do biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 através de planejamentos experimentais.

5.2.1. Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1}

O planejamento experimental fatorial fracionário 2^{5-1} estudou a influência das variáveis extrato de levedura, extrato do abacaxi, peptona, sulfato de amônio, pH e tempo de fermentação, sobre as respostas: tensão superficial, índice de emulsificação e produção de biossurfactante. Os fatores foram analisados em três níveis (-1, 0 e +1). O software *Statistica* versão 12.5 foi utilizado para rodar os dados do trabalho, considerando 95% de intervalo de confiança e erro puro.

Os dados dos experimentos foram utilizados para a construção dos gráficos do Pareto, representados na Figura 3. Nesses gráficos a linha vermelha na vertical é chamada de limiar de significância. As barras na horizontal localizadas à esquerda do limiar de significância não apresentam efeito significativo, enquanto as barras à direita da linha influenciam significativamente a variável analisada.

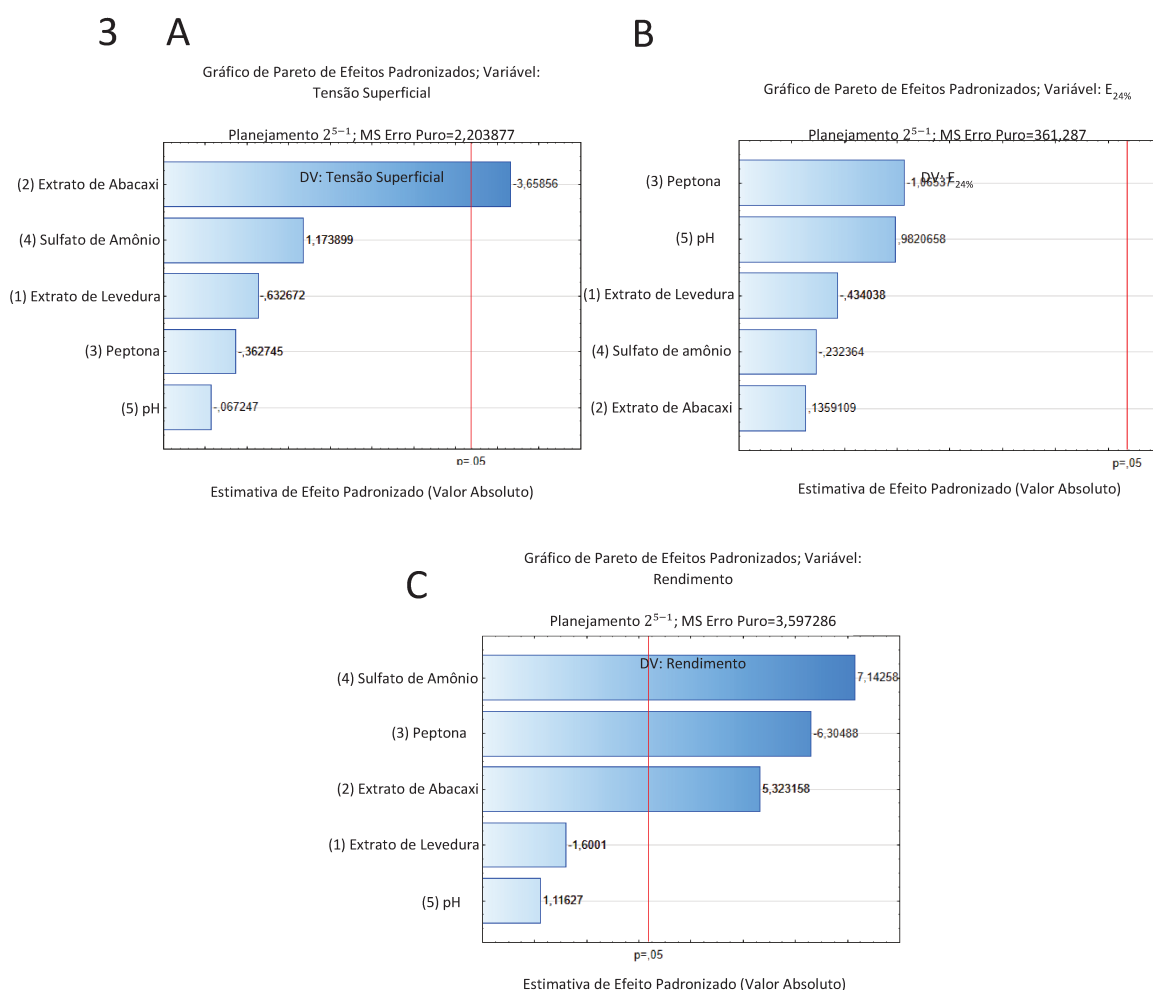


Figura 3: Gráfico do Pareto: **A** – Tensão Superficial (mN.m^{-1}); **B** – Índice de Emulsificação (%); **C** – Rendimento (g.L^{-1}).

As respostas tensão superficial e índice de emulsificação são análises qualitativas importantes para comprovar a produção do surfactante e confirmar suas propriedades, enquanto a análise do rendimento é quantitativa e tem como finalidade determinar a quantidade da biomolécula produzida.

No estudo do índice de emulsificação nenhuma variável apresentou efeito significativo, sendo os maiores valores obtidos pelos ensaios 2, 3 e 4 com 61, 54,5 e 60,5% respectivamente. No caso da tensão superficial apenas o extrato do abacaxi apresentou influência significativa, e os melhores resultados foram obtidos quando o extrato do abacaxi se encontrava no nível +1 (15 g.L^{-1}). O menor valor da tensão superficial foi obtido no ensaio 17 ($42,88 \text{ mN.m}^{-1}$). Na avaliação do rendimento o extrato de abacaxi, a peptona e o sulfato de amônio apresentaram efeitos significativos, com o melhor resultado no nível +1 para o extrato de abacaxi (15 g.L^{-1}) e o sulfato de amônio e a peptona no nível -1 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) produzindo aproximadamente $30,5 \text{ g.L}^{-1}$ de biosurfactante. Diante desses resultados, os estudos para os

planejamentos experimentais subsequentes concentraram-se no extrato de abacaxi, sulfato de amônio e peptona.

Almeida e colaboradores (2015) realizaram um delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar a produção de biosurfactante pela levedura *Candida tropicalis*. As variáveis estudadas foram: resíduos indústrias, agitação e concentração de inóculo, elas foram analisadas em 5 níveis (+2, +1, 0, -1 e -2). Os ensaios 7, 3 e 2 obtiveram os melhores resultados na análise da tensão superficial, reduzindo-a para 29,19, 29,47 e 29,52 mN.m^{-1} , respectivamente. Posteriormente, ao analisarem a efetividade do processo associada ao custo de produção consideraram o ensaio 2 mais apropriado, visto que, os resíduos industriais se encontravam no nível -1 e obtiveram resultados semelhantes aos ensaios 7 e 3. No ensaio 2 o rendimento foi de 3 g.L^{-1} .

Após análise das superfícies de resposta, Figuras 4 e 5, o tempo de fermentação de 24 horas foi determinado como mais adequado para as fermentações subsequentes em comparação com 48 horas, pois uma superfície de resposta mais inclinada facilita o deslocamento dos valores e a obtenção de resultados significativamente diferentes, que são características desejáveis para otimização usando um planejamento experimental. Como o extrato de levedura e o pH não exerceram influência estatística no bioprocessos, seus valores foram fixados respectivamente em 15 g.L^{-1} e 8 para os testes subsequentes com base nos resultados relacionados à tensão superficial, Figura 6, e rendimento, Figura 7.

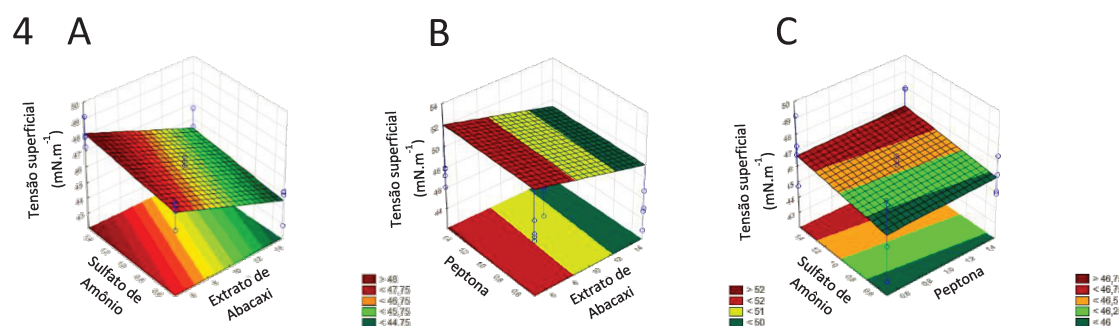


Figura 4: Superfície de resposta: Tensão superficial (mN.m^{-1}) 24 horas. **A** – Sulfato de amônio x Extrato do abacaxi; **B** – Peptona x Extrato do abacaxi; **C** – Sulfato de amônio x Peptona.

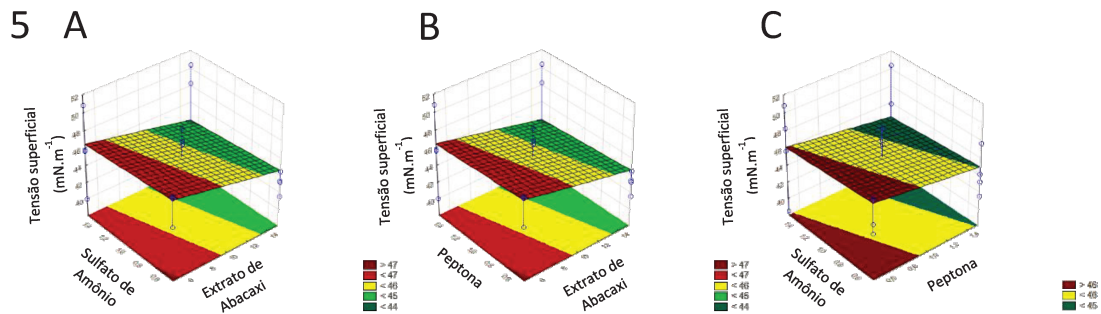


Figura 5: Superfície de resposta: Tensão superficial (mN.m^{-1}) 48 horas. **A** – Sulfato de amônio x Extrato do abacaxi; **B** – Peptona x Extrato do abacaxi; **C** – Sulfato de amônio x Peptona.

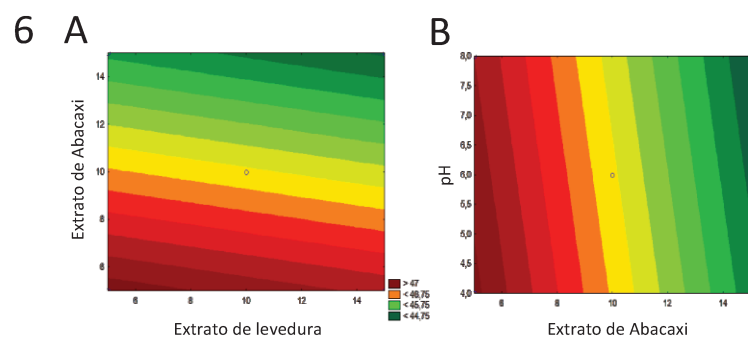


Figura 6: Curva de nível: Tensão superficial (mN.m^{-1}) – 24 horas. **A** - Extrato do abacaxi x Extrato de levedura; **B** – pH x Extrato do abacaxi.

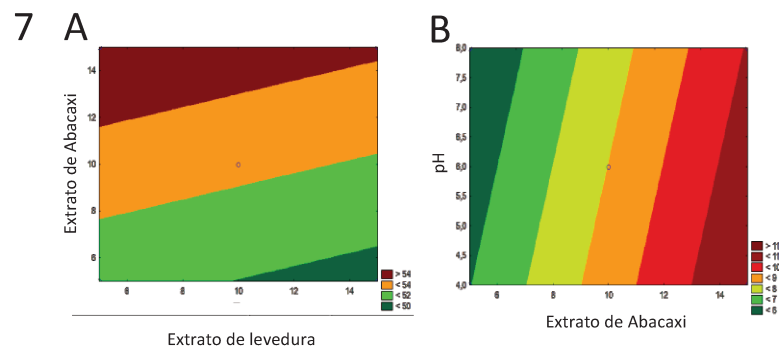


Figura 7: Curva de nível: Rendimento (g.L^{-1}) – 24 horas. **A** – Extrato do abacaxi x Extrato de levedura; **B** – pH x Extrato do abacaxi.

Batista e colaboradores (2010) estudaram o efeito dos componentes do meio na produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* e utilizaram óleo de fritura como única fonte de carbono. Para estudo das variáveis: $\frac{C}{N}$, $\frac{C}{Fe}$, $\frac{C}{P}$ e extrato de levedura, realizaram um designer fatorial fracionado 2^{5-1} . As respostas avaliadas foram: redução da tensão superficial, produção de biossurfactante, atividade de emulsificação e biomassa. Diferente do que foi analisado no presente trabalho, o nível do extrato de levedura que obteve o melhor resultado na

redução da tensão superficial ($33,66 \text{ mN.m}^{-1}$) foi o nível -1 (0,01%). Para a análise do rendimento, similar ao encontrado neste trabalho, o extrato de levedura não apresentou influência estatisticamente significativa. O maior rendimento alcançado foi de $3,61 \text{ g.L}^{-1}$.

5.2.2. Planejamento composto central

O planejamento composto central foi realizado para analisar a influência do extrato de abacaxi, da peptona e do sulfato de amônio sobre as variáveis dependentes anteriormente estudadas, pois apenas com o planejamento anterior não foi possível obter a região de maximização para essas variáveis.

Os experimentos baseados no planejamento composto central apresentam um ponto central, representado pelo nível '0', níveis inferiores (-1) e superiores (+1) e pontos axiais, importantes para determinar os termos quadráticos, $(-\sqrt[4]{8}$ e $+\sqrt[4]{8}$). Os valores em g.L^{-1} de cada fator analisado estão representados na Tabela 5. Utilizou-se o software *Statistica* versão 12.5 para análise dos dados, considerando 95% de intervalo de confiança e erro puro.

Os dados experimentais foram utilizados para a construção dos gráficos do Pareto, representados na Figura 8.

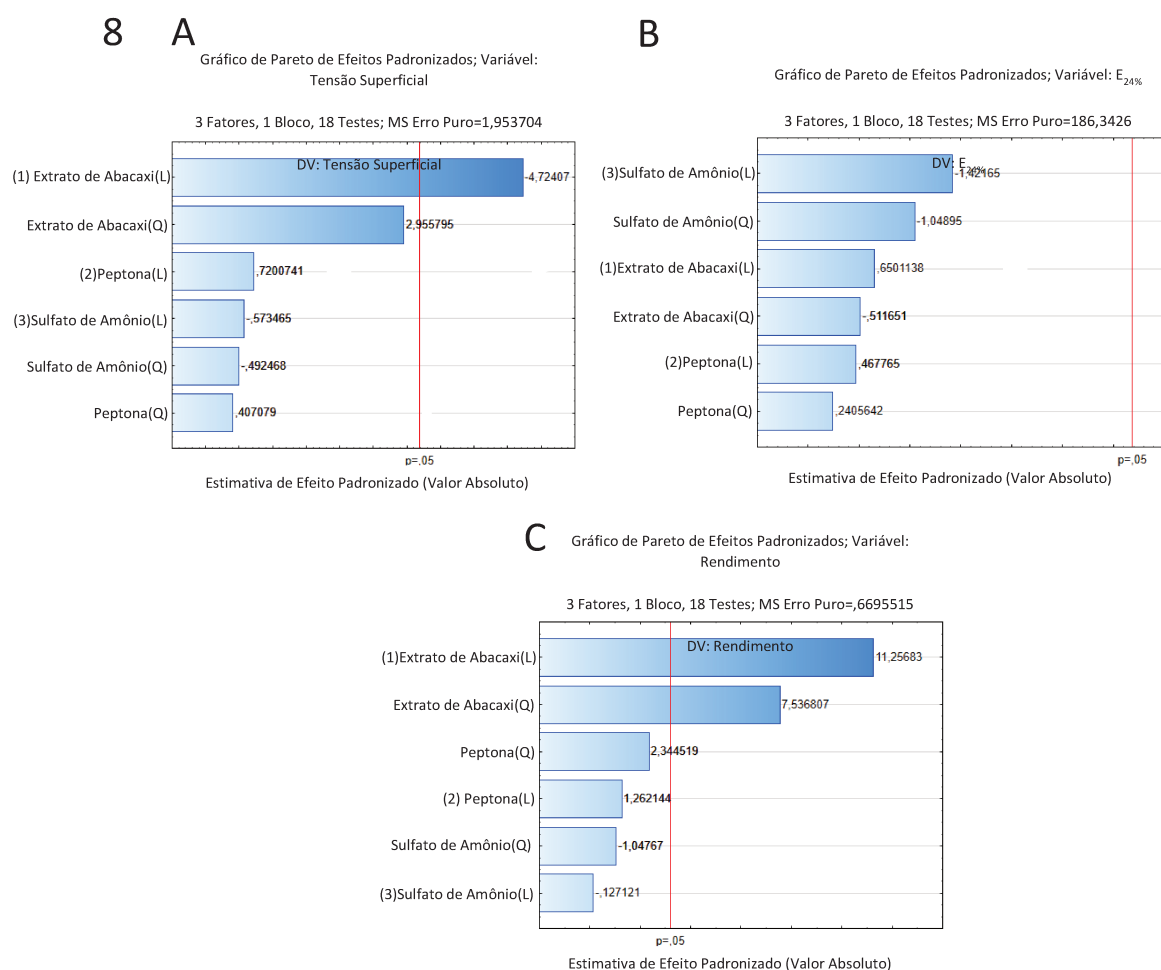


Figura 8: Gráfico do Pareto: **A** – Tensão Superficial ($mN.m^{-1}$); **B** – Índice de Emulsificação (%); **C** – Rendimento ($g.L^{-1}$).

Analisando a Figura 8, determinou-se que apenas o extrato de abacaxi interferiu significativamente nas respostas de tensão superficial e de rendimento. Para o teste de tensão superficial, somente o termo linear do extrato de abacaxi apresentou influência significativa, enquanto na avaliação do rendimento ambos termos, linear e quadrático, apresentaram efeitos significativos.

Nos efeitos positivos o aumento da concentração resulta em um aumento da resposta, já nos efeitos negativos o aumento da concentração gera uma redução na resposta. O resultado esperado no caso da tensão superficial é a sua redução, então, o efeito negativo do extrato de abacaxi (-4,72407) informa que o aumento da concentração do extrato de abacaxi ocasiona uma maior redução na tensão superficial. Contudo o melhor resultado no rendimento é o aumento da produção, por isso, o efeito positivo dos termos linear (11,25683) e quadrático (7,53681) expressa que o aumento da concentração do extrato de abacaxi acarreta um aumento no rendimento. Em relação às demais análises nenhuma variável apresentou efeito significativo.

Para a análise do índice de emulsificação os melhores resultados foram obtidos nos testes 3 (63%), 6 (56,5%) e 17 (57,5%). O menor valor da tensão superficial ($46,25 \text{ mN.m}^{-1}$) e maior do rendimento (17 g.L^{-1}) foi obtido no experimento 10, com concentração do extrato do abacaxi utilizada de $18,40896 \text{ g.L}^{-1}$.

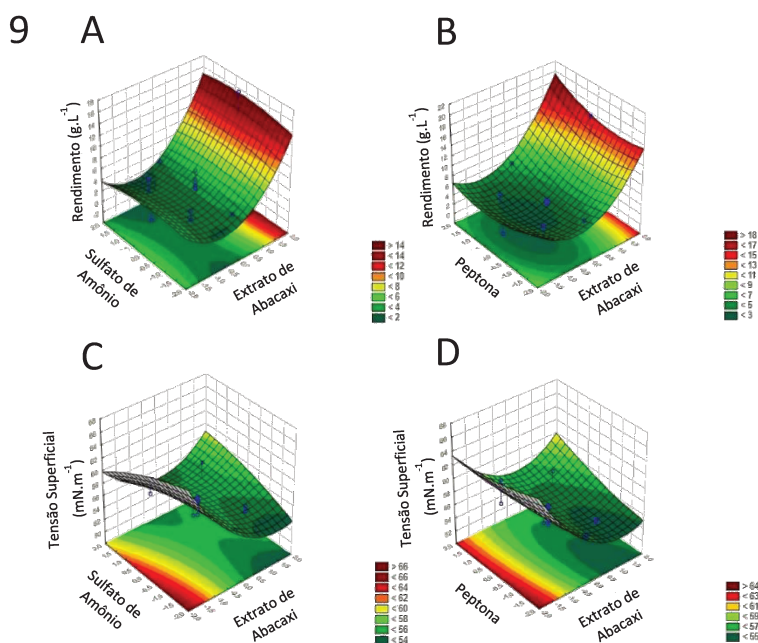


Figura 9: Superfície de resposta: **A** – Rendimento (g.L^{-1}) Sulfato de amônio x Extrato do abacaxi; **B** – Rendimento (g.L^{-1}) Peptona x Extrato do abacaxi; **C** – Tensão Superficial (mN.m^{-1}) Sulfato de amônio x Peptona; **D** – Tensão Superficial (mN.m^{-1}) Peptona x Extrato de abacaxi.

Notou-se na Figura 9-A que a concentração do sulfato de amônio não alterou o rendimento, portanto fixou-se o valor deste, para experimentos futuros, no ponto central (1 g.L^{-1}). Esse valor foi escolhido por dois motivos: o sulfato de amônio não apresentou efeito significativo sobre nenhuma variável e qualquer nível utilizado não interferiria no rendimento, porém, optou-se por trabalhar no ponto central visto que o sulfato de amônio é uma importante fonte de nitrogênio para o crescimento da biomassa.

As Figuras 9-A, B, C e D demonstram a necessidade de efetuar um deslocamento na variável do extrato do abacaxi no sentido de aumentar a sua concentração, por isso, nos próximos experimentos as novas quantidades para essa variável serão: -1 (15 g.L^{-1}), 0 (20 g.L^{-1}) e +1 (25 g.L^{-1}). Em relação à influência da concentração da peptona, as Figuras 9-B e 9-D apresentaram resultados contraditórios. As Figuras 9-B e 9-D expõem, respectivamente, o desempenho da concentração de peptona em relação ao rendimento e à tensão superficial. Observou-se que o aumento na concentração interferiu favoravelmente no rendimento, todavia,

o mesmo não ocorreu para o teste de tensão superficial, por isso essa variável persistirá com os mesmo valores utilizados neste planejamento: -1 (0,5 g.L⁻¹), 0 (1 g.L⁻¹) e +1 (1,5 g.L⁻¹)

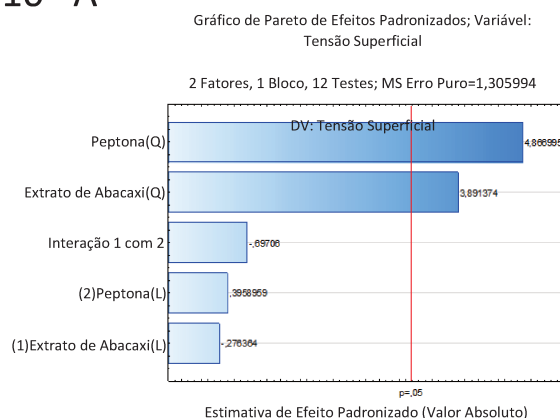
Brumano e colaboradores (2017) avaliaram a influência da aeração e concentração da fonte de carbono na produção do biossurfactante pela *Aureobasidium pullulans* LB 83. A produção da biomolécula foi baseada na atividade do tensoativo, ou seja, capacidade de reduzir a tensão superficial. Similar aos resultados do presente trabalho, eles notaram que o aumento da concentração da fonte de carbono e o aumento da aeração obtiveram o melhor resultado para a atividade de tensoativo, 8,05 cm, enquanto os menores valores das variáveis atingiram o menor valor para a atividade, 0,55 cm. A produtividade também aumentou com a concentração do substrato chegando ao valor de 0,0838 cm.h⁻¹.

5.2.3. Segundo Planejamento Composto Central

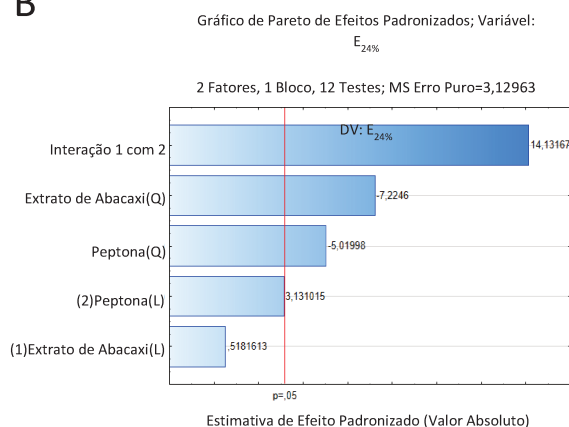
Para verificar a influência do aumento da concentração do extrato do abacaxi nas variáveis dependentes: tensão superficial, rendimento, índice de emulsificação, biomassa e consumo de açúcares totais, foi necessário realizar um segundo planejamento composto central, pois os dois primeiros não foram suficientes para determinar as concentrações ótimas das variáveis analisadas. Para isso, deslocou-se o ponto central do resíduo agroindustrial para 15 g.L⁻¹ (antes era de 10 g.L⁻¹), os valores dos demais pontos estão descritos na Tabela 7 no tópico 4.4.5. As concentrações da segunda variável independente, a peptona, permaneceu as mesmas utilizadas no primeiro planejamento composto central. O software *Statistic* versão 12.5 foi utilizado para análise dos dados, considerando 95% de intervalo de confiança e erro puro.

Os dados experimentais foram utilizados para a construção dos gráficos do Pareto, representados na Figura 10.

10 A



B



C

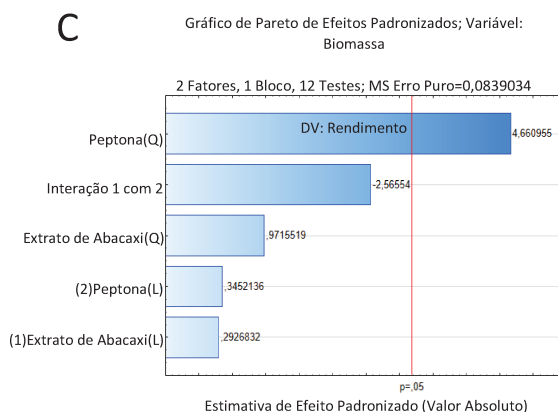


Figura 10: Gráfico do Pareto: **A** – Tensão Superficial (mN.m^{-1}); **B** – Índice de Emulsificação (%); **C** – Rendimento (g.L^{-1}).

As variáveis estudadas no segundo planejamento composto central, o extrato do abacaxi e a peptona, influenciaram significativamente às respostas estudadas. Em relação à tensão superficial e ao índice de emulsificação, ambos os termos quadráticos do extrato do abacaxi (3,89137 e -7,2246) e da peptona (4,86699 e -5,01998) foram significativos. Enquanto no rendimento apenas o termo linear do extrato do abacaxi (4,66096) apresentou resultados consideráveis. Para as análises relacionadas ao crescimento do microrganismo, com exceção do termo linear do extrato de abacaxi, os demais termos analisados apresentaram resultados relevantes, além disso para a resposta relacionada ao consumo de açúcares redutores totais o termo linear do extrato do abacaxi e o quadrático da peptona foram expressivos estatisticamente.

Foi possível concluir que o aumento da concentração dos componentes do meio estudados interfere de forma negativa no desempenho do biossurfactante. O efeito positivo na tensão superficial indica que ao aumentar a concentração dos componentes a tensão superficial reduzirá menos, efeito contrário ao pretendido. O efeito negativo do extrato do abacaxi e da

peptona em relação ao índice de emulsificação aponta que ao aumentar as suas concentrações a porcentagem de emulsificação é reduzida. O efeito positivo do termo linear do extrato de abacaxi para a resposta do rendimento assinala que o aumento da concentração desse componente tem um efeito favorável no aumento da produção da biomolécula de interesse.

Os maiores índices de emulsificação obtidos foram nos testes 1 (55%), 4 (63%) e 11 (51%). No caso da tensão superficial, os menores valores foram alcançados nos testes 9 (47 mN.m⁻¹), 11 (45,5 mN.m⁻¹) e 12 (47,5 mN.m⁻¹). Os melhores resultados para os rendimentos foram obtidos nos testes 3 (17 g.L⁻¹), 6 (21 g.L⁻¹) e 10 (16,5 g.L⁻¹).

Com o propósito de auxiliar na compreensão de como o aumento da concentração dos componentes do meio interferem nas variáveis: tensão superficial, índice de emulsificação e rendimento, plotou-se gráficos de superfície de respostas.

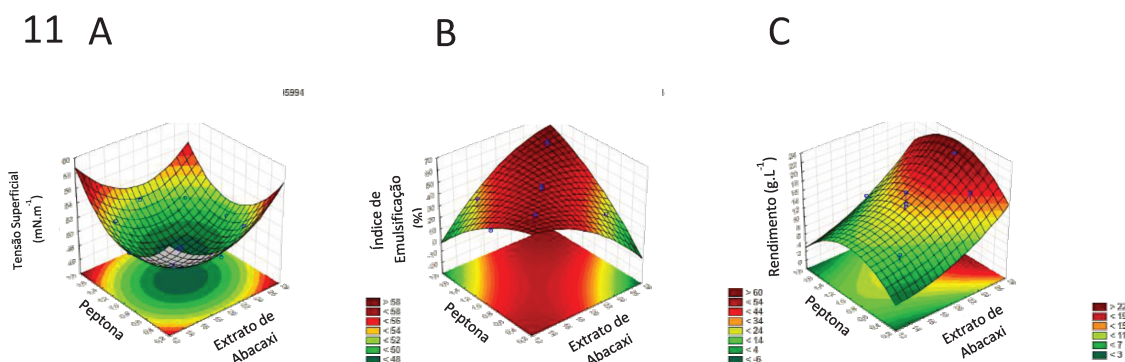


Figura 11: Superfície de resposta: **A** – Tensão Superficial (mN.m⁻¹); **B** – Índice de Emulsificação (%); **C** – Rendimento (g.L⁻¹).

As Figuras 11-A, B e C são superfícies de respostas para as análises da tensão superficial, do índice de emulsificação e do rendimento, respectivamente. As variáveis testadas foram a peptona e o extrato do abacaxi.

Examinando os dados plotados no gráfico 11-A, constatou-se que as concentrações do extrato do abacaxi e da peptona que obtiveram os melhores resultados para o teste de tensão superficial, ou seja, menores valores (área verde escuro), encontram-se nas faixas de 18 a 22 g.L⁻¹ do extrato do abacaxi e 0,8 a 1,2 g.L⁻¹ da peptona. Concentrações acima ou abaixo dessas causam aumento na tensão superficial. O gráfico esboçado na Figura 11-B retrata a influência da concentração dos compostos sobre a propriedade de emulsão do biossurfactante. As concentrações nas quais o extrato do abacaxi e a peptona obtiveram os melhores resultados foram quando eles estavam nas mesmas faixas, isto é, ambos nas maiores concentrações ou nas concentrações mais baixas (faixa central). Através da análise da Figura 11-C é perceptível que o rendimento cresce à medida que a concentração do extrato de abacaxi aumenta. A

concentração da peptona não influenciou de forma significativa a quantidade da biomolécula produzida, porém na faixa de 0,6 até 1,4 g.L⁻¹ obteve-se os melhores resultados, atingindo produção acima de 22 g.L⁻¹.

Dessa forma, considerou-se inviável utilizar concentrações do extrato do abacaxi acima de 25 g.L⁻¹, pois acarretaria aumento na tensão superficial. Portanto, fixou-se a concentração do extrato do abacaxi em 25 g.L⁻¹ e o da peptona em 1,5 g.L⁻¹, já que nessas faixas mantêm-se as propriedades da biomolécula e obtêm-se uma alta produtividade.

Resultados de Rufino e colaboradores (2008) corroboram com os obtidos no presente trabalho. Com o objetivo de melhorar as propriedades do agente emulsificante produzido pela *Candida lipolytica*, eles utilizaram planejamento fatorial com as seguintes variáveis independentes: resíduo da refinaria de óleo de soja, ácido glutâmico e extrato de levedura. Após o primeiro planejamento fatorial notaram que apenas o resíduo e a sua interação com o ácido glutâmico apresentaram efeitos significativos. O extrato de levedura apresentou efeito positivo, significando que a menor concentração do extrato de levedura resultou em uma menor tensão superficial. Posteriormente outros quatro planejamentos experimentais foram realizados com o resíduo e o ácido glutâmico como as variáveis independentes. Os pesquisadores concluíram que os melhores valores foram obtidos nos níveis mais baixos para o ácido glutâmico (fonte de nitrogênio) e níveis intermediários e altos para o resíduo (fonte de carbono). Com as condições otimizadas eles foram capazes de reduzir a tensão superficial do caldo de cultura de 50 mN.m⁻¹ para 25,29 mN.m⁻¹.

5.3. Curva de crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas ao longo de 24 ou 30 horas, com ou sem suplementação de fonte de carbono. Os testes realizados foram: dosagem de açúcar redutores totais; biomassa através da aferição da densidade óptica; e rendimento do biossurfactante pela extração utilizando a acetona fria como solvente. Os resultados obtidos encontram-se expostos nas Figuras 14,15 e 16.

Inicialmente a concentração de açúcares redutores totais era de 25 g.L⁻¹, visto que corresponde ao valor do resíduo de abacaxi adicionado, conforme determinado pelo planejamento experimental. A fermentação ocorreu na temperatura de 15 °C e com rotação de 120 rpm. Os dados foram coletados de duas em duas horas durante o período de fermentação.

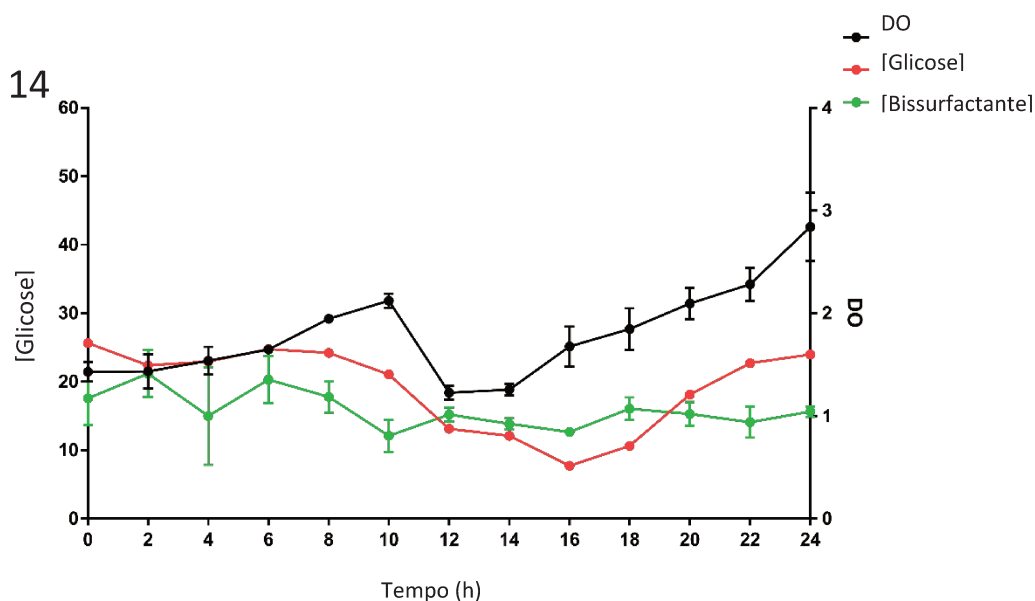


Figura 12: Curva de crescimento da *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 e produção de biossurfactante, durante 24 horas.

O gráfico acima representa a curva de crescimento durante 24 horas de fermentação e sem suplementação. De acordo com o exposto, a quantidade inicial de glicose disponível para o crescimento da *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 e produção de metabólitos secundários por ela conseguiu suprir sua demanda por fonte de carbono durante 10 horas de fermentação. Posteriormente a isso, notou-se um declive na densidade óptica, possivelmente indicando a morte do microrganismo. Observou-se em relação à produção da biomolécula uma produção acelerada no início da fermentação, atingindo um rendimento de $21,2 \text{ g.L}^{-1}$. Em seguida a quantidade decresceu no período de 6 e 10 horas. Após 10 horas de experimento o rendimento manteve-se praticamente estável até o final da fermentação.

Após 12 horas de fermentação a densidade óptica retornou a aumentar e permaneceu em auge até o final do experimento. A concentração de glicose também aumentou após 16 horas de fermentação. A elevação de ambas as análises indicam que o biossurfactante pode desempenhar função de reserva energética.

Com o objetivo de analisar a influência da suplementação com fonte de carbono, após 10 horas de fermentação adicionou-se extrato de abacaxi retornando para 25 g.L^{-1} a concentração de glicose no meio de cultura. Com os dados obtidos plotou-se o gráfico abaixo.

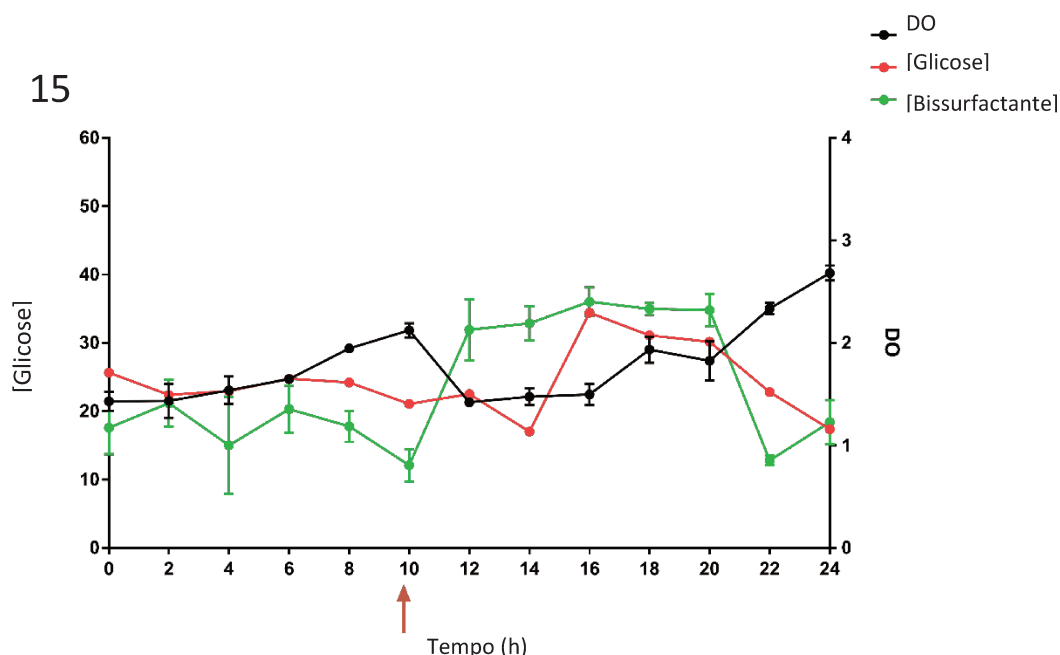


Figura 13: Curva de crescimento da *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 e produção de biossurfactante, durante 24 horas com suplementação após 10 horas de fermentação.

Analisando o gráfico da Figura 15, verifica-se que após a suplementação com extrato de abacaxi a produção de biossurfactante atingiu seu pico de produção às 16 horas com 36 g.L^{-1} de rendimento. Às 20 horas a sua concentração no meio começou a decair e às 22 horas atingiu $12,8 \text{ g.L}^{-1}$, subindo para $18,4 \text{ g.L}^{-1}$ às 24 horas.

A concentração de glicose no meio começou a baixar às 16 horas. A densidade óptica decaiu das 10 horas até às 12 horas, porém, posterior a esse intervalo permaneceu crescente até o final da fermentação.

Portanto, confirmou-se que a suplementação melhora o rendimento, este passando de $21,2 \text{ g.L}^{-1}$, sem suplementação, para 36 g.L^{-1} , com suplementação. A queda da concentração da biomolécula foi acompanhada do decréscimo da concentração de glicose no meio e do aumento da densidade óptica, reforçando a hipótese de que o biossurfactante pode desempenhar função de reserva energética.

Um segundo experimento foi traçado suplementando o meio com extrato de abacaxi em dois momentos, após 10 e 20 horas de fermentação. A quantidade de resíduo agroindustrial adicionado foi na quantidade necessária para retornar à concentração de glicose para 25 g.L^{-1} . Os resultados deste experimento estão expressos na Figura 16.

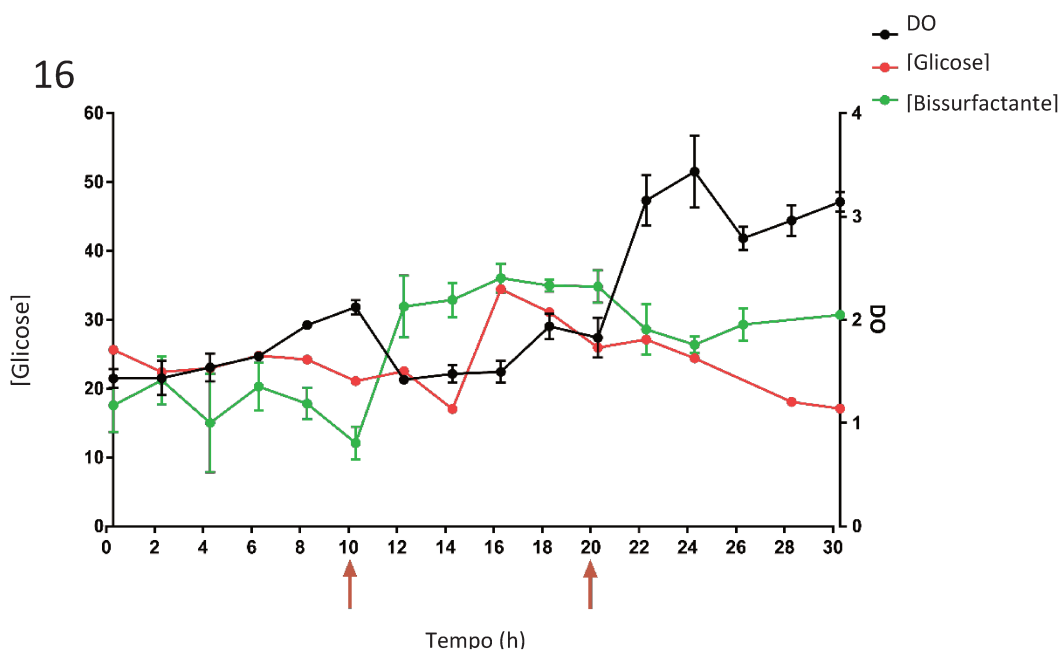


Figura 14: Curva de crescimento da *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 e produção de biossurfactante, durante 30 horas com suplementação após 10 e 20 horas de fermentação.

A avaliação da Figura 16 demonstra que a suplementação com extrato de abacaxi na vigésima hora da fermentação não influenciou na produtividade da biomolécula, apenas culminou no aumento da densidade óptica. Com isso, apenas a suplementação com resíduos agroindustriais na décima hora de fermentação é necessária. Em relação ao tempo de fermentação, 16 horas é o suficiente para se obter o máximo de produtividade, pois após 20 horas a concentração da biomolécula começa a decrescer no meio.

He e colaboradores (2017) compararam a eficiência na produção de ramnolipídios de três diferentes formas de fermentação: batelada, batelada alimentada e batelada alimentada sequencial. Eles obtiveram uma produção total de ramnolipídios de $57,5 \text{ g.L}^{-1}$ para a batelada tradicional, $74,9 \text{ g.L}^{-1}$ para a batelada alimentada e $151,2 \text{ g.L}^{-1}$ utilizando a batelada alimentada sequencial. O rendimento da conversão foi de 84% para a batelada alimentada sequencial, de 53,2% para a batelada e 42,7% para a batelada alimentada. Os dados deles indicam que a alimentação com meio fresco e a diluição do caldo de cultura na batelada alimentada sequencial é um passo fundamental para manter a alta produtividade de ramnolipídios ao longo do tempo.

5.4. Metodologias de extração

Seis metodologias gravimétricas de extração de biossurfactante foram testadas com o objetivo de selecionar a mais eficiente e a que apresentou maior repetibilidade. No gráfico abaixo, encontra-se expresso os dados obtidos após a extração em triplicatas.

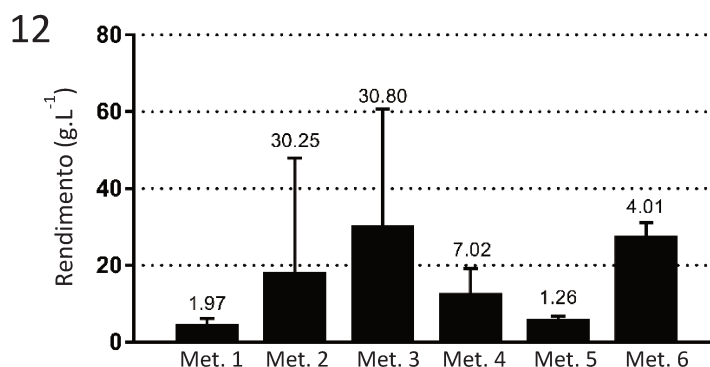


Figura 15: Análise das metodologias de extração. **Eixo Y:** rendimento; **valores sobrescritos:** desvio padrão (SD).

Após análise da Figura 12, notou-se que os resultados das metodologias dois e três não apresentaram repetibilidade (SD de aproximadamente 30), embora possuíssem elevada produtividade (cerca de 18 e 30 g.L⁻¹ respectivamente). As metodologias um (1,97) e cinco (1,26), exibiu os menores desvios padrão, porém o rendimento foi baixo (4 e 5,5 g.L⁻¹ nesta ordem). A metodologia quatro ostentou um desvio padrão de 7 e um rendimento de 13,69 g.L⁻¹. Ademais, a metodologia seis teve 4 de desvio padrão e 27 g.L⁻¹ de rendimento. A metodologia seis, a qual utiliza acetona fria como solvente extrator da biomolécula, foi selecionada para as demais etapas do presente trabalho, pois dentre todas as metodologias avaliadas ela apresentou os melhores resultados (27 g.L⁻¹) ao analisar a eficiência e repetibilidade.

Santos e colaboradores (2017) também utilizaram o método com acetona fria (metodologia seis) para extrair o biossurfactante produzido pela levedura *Candida lipolytica* em biorreator. Eles empregaram um meio de baixo custo composto de 5% de gordura animal e de 2,5% licor de maceração de milho e obtiveram um rendimento de 10 g.L⁻¹ após 96 horas de fermentação. Luna e colaboradores (2013) aplicaram resíduo de refinaria de óleo de amendoim e licor de infusão de milho como substratos para a produção de biossurfactante pela *Candida sphaerica* UCP0995. Eles realizaram a extração com metanol gelado e conquistaram uma produção de 9 g.L⁻¹ após 144 horas de fermentação. Daverey e Pakshirajan (2010) também estudaram a produção de um soforolipídeo produzido por *S. bombicola* usando soro desproteínado e glicose, como mistura de fonte de carbono, e fermentador com controle de pH e outras condições de operação. Como solvente de extração usaram o acetato de etila e o isopropanol na proporção 4:1 com posterior lavagem com hexano obtendo rendimento de 33 g.L⁻¹.

5.5. Hidrofobicidade celular

A hidrofobicidade celular foi avaliada em três diferentes hidrocarbonetos: o querosene, o óleo mineral e o óleo de soja. Os resultados obtidos encontram-se exibidos na Figura abaixo.

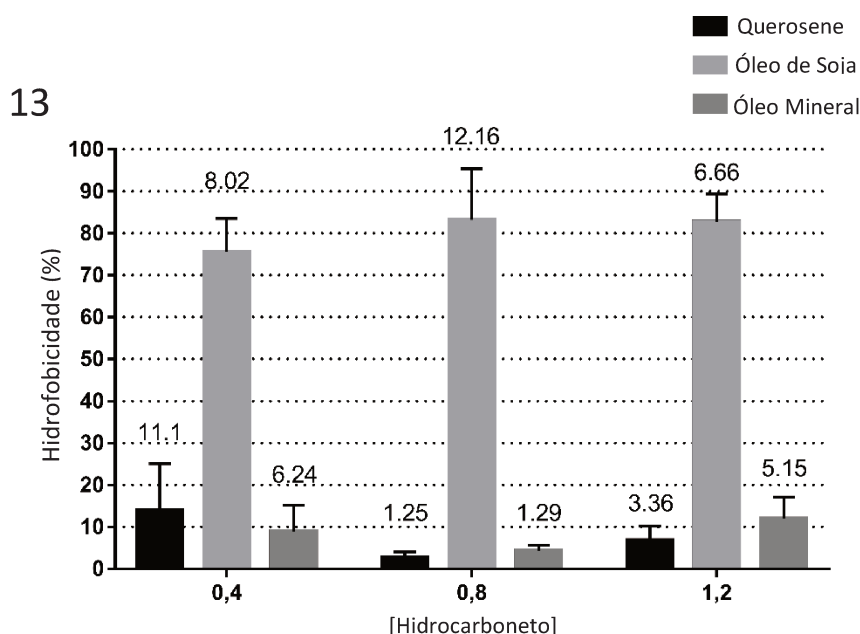


Figura 16: Hidrofobicidade da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 em querosene, óleo de soja e óleo mineral; **valores sobrescritos:** desvio padrão (SD).

De acordo com a literatura, as células são consideradas muito hidrofóbicas quando as taxas excedem a 60% e pouco hidrofóbicas quando as taxas são abaixo de 10%. Avaliando a Figura 13, pode-se concluir que a levedura estudada apresentou alta hidrofobicidade em óleo de soja, com taxas acima de 70% nas três concentrações do óleo testadas (0,4, 0,8 e 1,2). Todavia nos demais hidrocarbonetos estudados ela apresentou baixa hidrofobicidade com valores abaixo de 15%.

Segundo Vasileva-Tonkova e Gesheva (2005), a hidrofobicidade pode influenciar na adesão celular sendo, em alguns casos, um fator importante para que o microrganismo consiga aderir-se à superfície. Alguns microrganismos possuem a capacidade de metabolizar o hidrocarboneto líquido. Um fato interessante é que os biossurfactantes, na maioria das bactérias, melhoram o contato da fase oleosa com o microrganismo através da emulsificação e/ou solubilização do substrato ou aumentando a hidrofobicidade celular.

Hua e colaboradores (2003) analisaram a hidrofobicidade da levedura *Candida antarctica* em querosene. A hidrofobicidade, em %, apresentada pela levedura foi de 52, 47, 43 e 18 para os meios de culturas com fonte de carbono: n-undecano, n-hexadecano, óleo de soja

e glicose, respectivamente. Esse resultado demonstra que a hidrofobicidade celular é dependente dos componentes do meio de cultura.

Lin e colaboradores (2005) estudaram a hidrofobicidade da superfície celular de seis linhagens bacterianas degradadoras de diesel isoladas de locais contaminados por petróleo no centro de Taiwan. A hidrofobicidade da superfície celular foi testada para dois hidrocarbonetos, diesel e querosene, em diferentes volumes (0-0,2 mL). Dentre as seis linhagens bacterianas testadas apenas uma apresentou hidrofobicidade acima de 60%, *G. alkanivorans* CC-JG39, com 85% e 93% de hidrofobicidade para o querosene e o diesel, nesta ordem. Eles fizeram teste de flutuação com as seis bactérias estudadas e notaram uma relação entre a capacidade de flutuação e a hidrofobicidade da superfície celular, isto é, quanto maior a hidrofobicidade mais facilmente flutuavam.

5.6. Caracterização da biomolécula

5.6.1. Concentração micelar diluída (CMD)

A concentração micelar diluída (CMD) foi determinada conforme metodologia de Desai e Banat (1997) e os resultados experimentais foram plotados gerando a Figura 17.

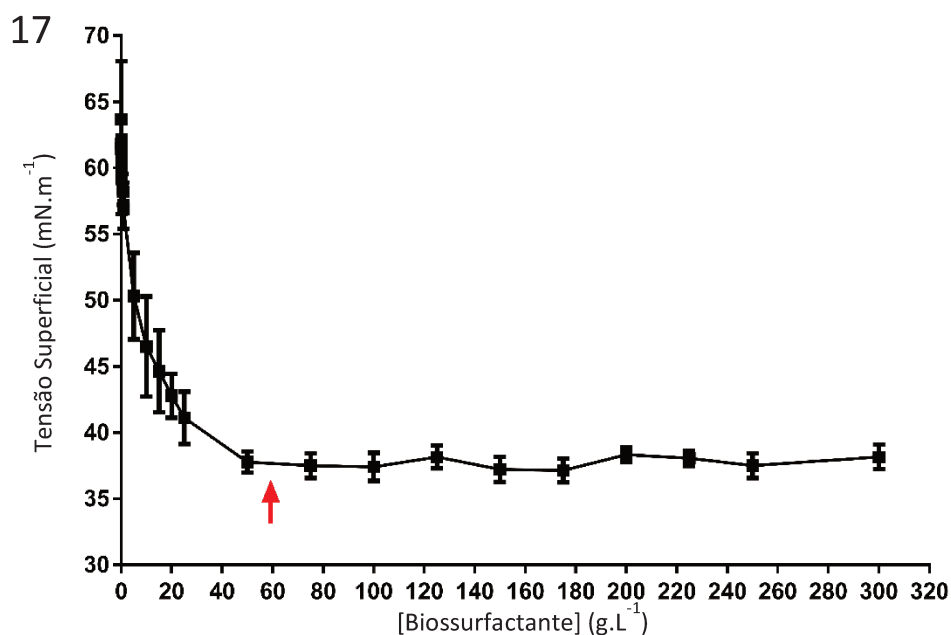


Figura 17: Concentração micelar Diluída (CMD) do biossurfactante extraído.

Com a análise da Figura 17, pode-se determinar que a estabilidade da tensão superficial ocorreu na concentração de 59,14 g.L⁻¹ do biossurfactante produzido pela *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, com redução da tensão superficial de aproximadamente 64 para 38 mN.m⁻¹.

Silva e colaboradores (2014) estudaram a produção de biossurfactante pela bactéria *P. cepacia* e determinaram a CMC da biomolécula. A tensão superficial mínima obtida pelo grupo foi de $29,77 \text{ mN.m}^{-1}$, para uma concentração de $0,156 \text{ mg.ml}^{-1}$ do biossurfactante. A CMC obtida por eles é considerada uma das mais baixas descritas na literatura. Khopade e colaboradores (2012) caracterizaram o biossurfactante produzido pela bactéria *Streptomyces-B3*. A CMC da biomolécula determinada foi de 110 mg.L^{-1} , com redução máxima da tensão superficial para 30 mN.m^{-1} .

Luna e colaboradores (2013) determinaram a concentração micelar crítica e o rendimento de produção do biossurfactante pela levedura *Candida sphaerica* UCP0995, utilizando meio otimizado composto por 9% de resíduos da refinaria de óleo de amendoim e 9% de aguardente de milho. A fermentação foi realizada durante 144 horas, obtendo um rendimento de 9 g.L^{-1} . A biomolécula reduziu a tensão superficial do meio para 25 mN.m^{-1} com uma concentração de $0,25 \text{ g.L}^{-1}$. Souza e colaboradores (2017) analisaram o tensoativo produzido pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* CCMA, em um meio de cultura contendo como fontes de carbono: 1 g.L^{-1} de glicose e 20 g.L^{-1} de óleo de oliva. A levedura obteve uma produção de $2,6 \text{ g.L}^{-1}$ após 24 horas de crescimento, o biossurfactante reduziu a tensão superficial da água para valores próximos de 31 mN.m^{-1} e sua concentração micelar crítica foi de $0,9 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Apesar da CMD obtida no presente trabalho apresentar um valor elevado quando comparada a alguns trabalhos publicados, a produtividade também é elevada, aproximadamente 35 g.L^{-1} , sendo necessária apenas 20 horas para atingir tal rendimento. Em relação à redução máxima da tensão superficial, o valor mínimo obtido neste trabalho se equipara aos resultados obtidos por outros pesquisadores.

5.6.2. Estabilidade da emulsão

A estabilidade de emulsão foi realizada ao longo de 30 dias e analisou-se o índice de emulsificação ($E_{24\%}$), segundo metodologia descrita por Cai e colaboradores (2014). Com os dados obtidos plotou-se o gráfico a seguir.

18

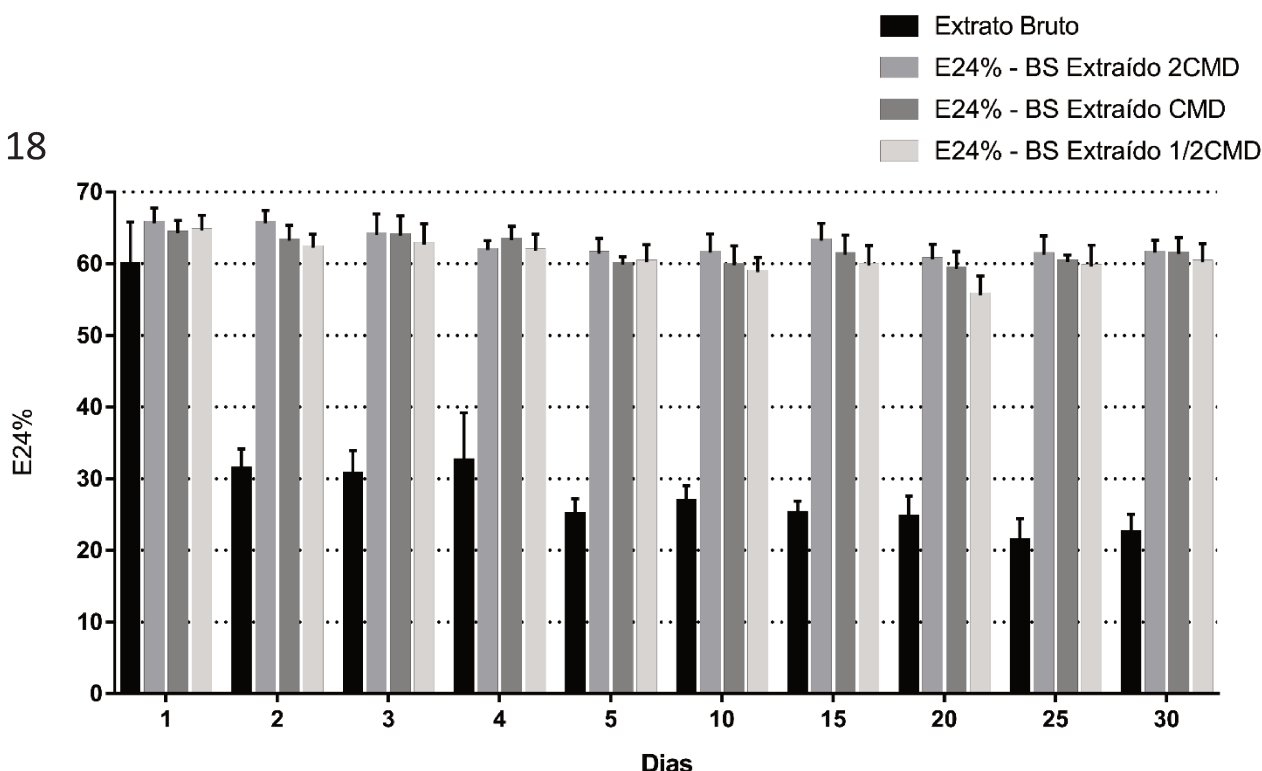


Figura 18: Estabilidade de Emulsão: Extrato Bruto x BS (2CMD, CMD e 1/2 CMD). Legenda: BS – biossurfactante extraído; 2CMD – $118,28 \text{ g.L}^{-1}$, CMD – $59,14 \text{ g.L}^{-1}$ e 1/2CMD – $29,57 \text{ g.L}^{-1}$.

Para averiguar a estabilidade da emulsão ao longo dos 30 dias de experimento e entre as condições testadas (extrato bruto, 2CMD, CMD e $\frac{1}{2}$ CMD), realizou-se o teste *t-student* com 95% de confiança.

Os resultados contidos na Figura 18 demonstram que o extrato bruto apresentou estabilidade entre o 4º e o 30º dia de experimento, com 32,5% de índice de emulsificação. O biossurfactante extraído na concentração de $118,28 \text{ g.L}^{-1}$, semelhante ao extrato bruto exibiu estabilidade entre o 4º e o 30º dia de experimento, com 61,8% de $E_{24\%}$. Na CMD ($59,14 \text{ g.L}^{-1}$), o índice de emulsificação permaneceu constante ao longo dos 30 dias com 64,5%, enquanto na concentração de $29,57 \text{ g.L}^{-1}$ de biossurfactante extraído o $E_{24\%}$ permaneceu invariável entre o 3º e 30º dia de experimento, com 62,6% de $E_{24\%}$.

Averiguou-se estatisticamente os valores obtidos por dia das três concentrações de biossurfactante extraído. Após os testes estatísticos foi possível constatar que não existiram diferenças significativas entre os valores, indicando que as três concentrações estudadas possuem a mesma capacidade de manter a estabilidade da emulsão em todos os pontos.

Portanto, é possível gerar economia ao utilizar o biossurfactante na menor concentração testada ($\frac{1}{2}$ CMD – 29,57 g.L⁻¹).

Comparando-se o desempenho do biossurfactante extraído na concentração de 59,14 g.L⁻¹ (CMD) com o extrato bruto, é visível que o primeiro apresenta melhor desempenho, visto que o seu E_{24%} foi de 64,5% e o do extrato bruto manteve-se com cerca de 32,5%.

Henkel e colaboradores (2012) analisaram a estabilidade de emulsão de um ramnolipídio ao longo de 30 dias e notaram que a faixa de pH afeta a estabilidade do surfactante. Na faixa pH 3 e 4, após 72 horas houve uma redução de 36 e 38% na atividade e após 30 dias não havia emulsão. Na faixa de pH de 5 a 9, foram estáveis entre 24 e 72 horas. Nos pH 5, 6 e 7, a atividade foi reduzida em cerca de 15% após 30 dias e no pH 8 a taxa de emulsificação permaneceu no mesmo nível pelos 30 dias estudados.

5.6.3. Teste de estabilidade

A estabilidade do biossurfactante extraído foi testada em relação à temperatura, ao pH e à salinidade nas concentrações de 2CMD, CMD e $\frac{1}{2}$ CMD. Testes de *t-student* com 95% de confiança foi realizado para confirmar estatisticamente a estabilidade da biomolécula.

Os gráficos das Figuras 19, 20, 21, 22 23 e 24 foram plotados utilizando os dados dos índices de emulsificação e tensão superficial em cada condição submetida ao biossurfactante extraído.

5.6.3.1. Temperatura

19

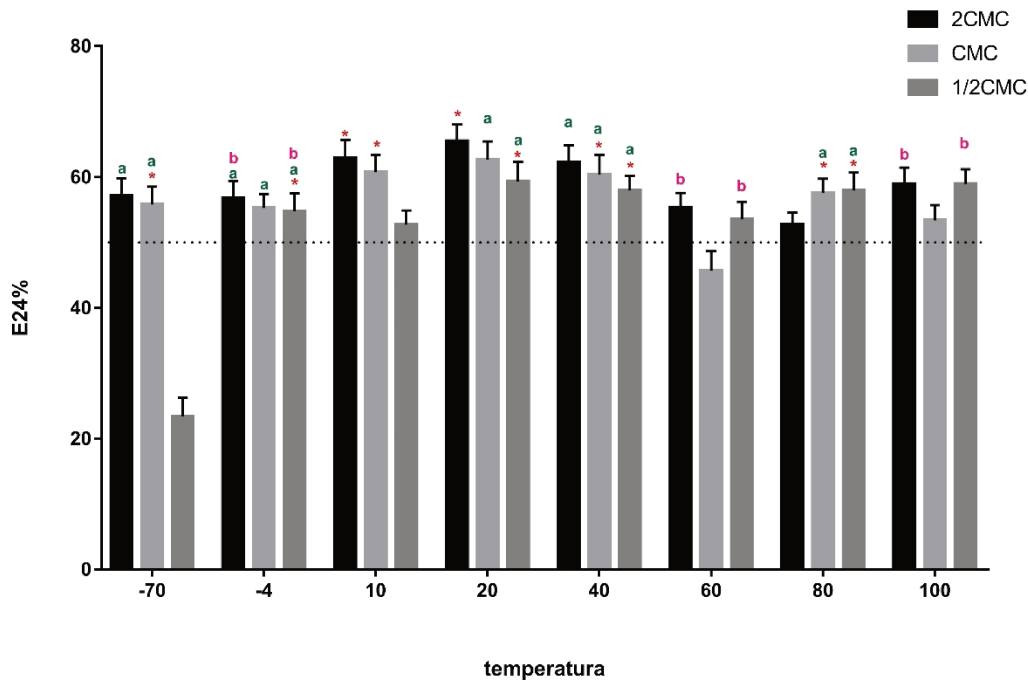


Figura 19: E_{24%} em diferentes concentrações de biosurfactante após a aplicação do estresse em diversas temperaturas.

* $p < 0,05$ comparado ao controle; ^a $p < 0,05$ comparado à CMD; ^b $p < 0,05$ comparado à 2CMD

20

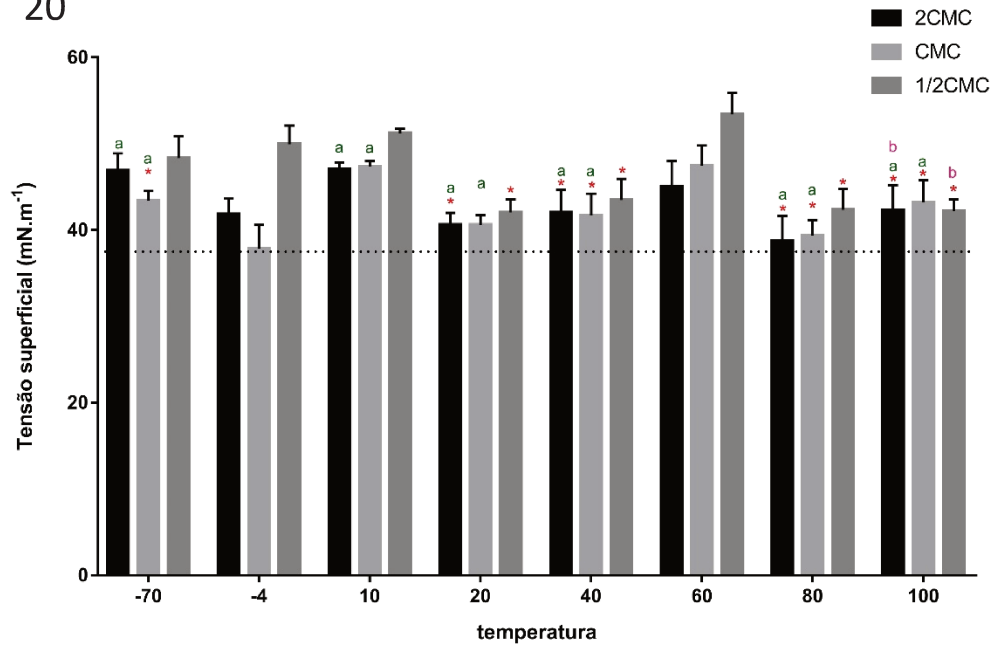


Figura 20: Tensão superficial em diferentes concentrações de biosurfactante após a aplicação do estresse em diversas temperaturas.

* $p < 0,05$ comparado ao controle; ^a $p < 0,05$ comparado à CMD; ^b $p < 0,05$ comparado à 2CMD

Examinando as Figuras 19 ($E_{24\%}$) e 20 (tensão superficial) foi possível inferir que, quando comparada ao controle, na $\frac{1}{2}$ CMD o índice de emulsificação manteve-se estável na temperatura de 10 e 20 °C e no teste de tensão superficial ela apresentou estabilidade em 20, 40, 80 e 100 °C. Comparando a CMD ao controle, esta ficou estável no teste de $E_{24\%}$ nas temperaturas -70, 10, 40 e 80 °C e no teste de tensão superficial apresentou estabilidade em -70, 40, 80 e 100 °C. Por outro lado, observou-se que a 2CMD, em relação ao controle, apresentou estabilidade nas temperaturas -4, 20, 40 e 80 °C, para o teste de $E_{24\%}$, e em 20, 40, 80 e 100 °C para o teste de tensão superficial.

Averiguou-se estatisticamente os valores obtidos entre as três concentrações de biossurfactante extraído. Após os testes estatísticos, foi possível constatar que entre a CMD e $\frac{1}{2}$ CMD para o teste de $E_{24\%}$ os resultados são estatisticamente iguais apenas nas temperaturas -70, -4 e 40 °C e para tensão superficial nas temperaturas -70, 10, 20, 40, 80 e 100 °C. Para CMD e 2CMD o teste de tensão superficial apresentou resultados significativamente diferentes em todas as temperaturas testadas, enquanto para o teste de emulsificação apresentaram relação nas temperaturas -4, 20, 40 e 80 °C. Para $\frac{1}{2}$ CMD e 2CMD no teste de tensão superficial apresentaram resultados iguais estatisticamente apenas na temperatura de 100 °C e no índice de emulsificação nas temperaturas -4, 60 e 100 °C.

No teste de índice de emulsificação, com exceção das temperaturas de 60 e 100 °C, pelo menos uma das concentrações estudadas ($\frac{1}{2}$ CMD, CMD e 2CMD) apresentaram resultados estatisticamente iguais ao do controle e em toda as temperaturas testadas alguma concentração apresentou resultado acima de 50% (acima da linha tracejada), como pode ser visualizado na Figura 19. No teste de tensão superficial, Figura 20, apenas nas temperaturas -4, 10 e 60 °C nenhuma das concentrações testadas apresentaram resultados semelhantes ao do controle, contudo na temperatura de -4 °C a CMD apresentou a maior redução da tensão superficial comparada aos demais resultados.

5.6.3.2. pH

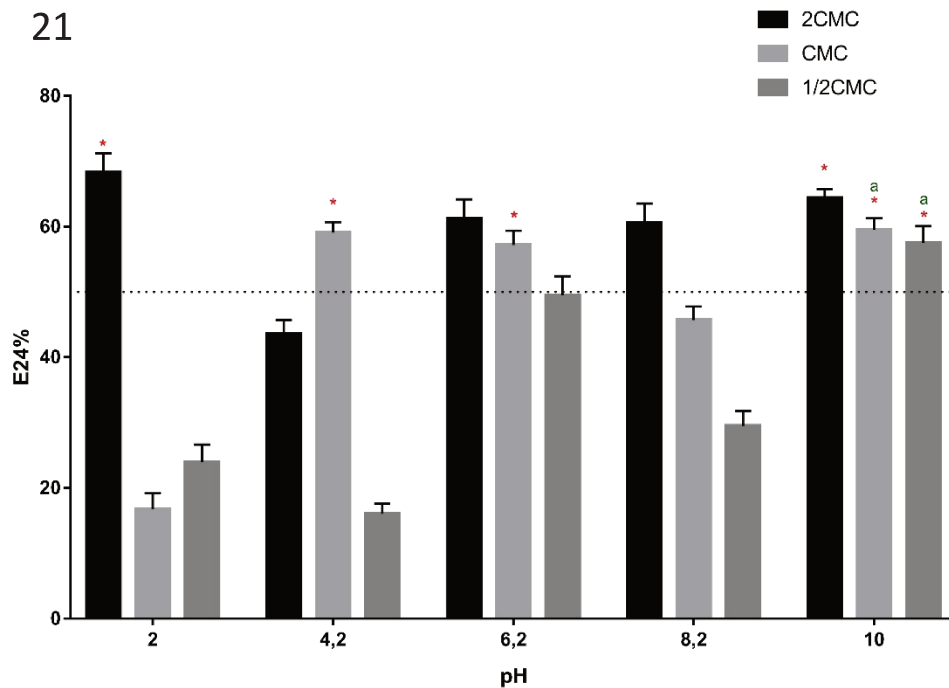


Figura 21: $E_{24\%}$ em diferentes concentrações de biosurfactante após a aplicação do estresse em diversos pH.

* $p < 0,05$ comparado ao controle; ^a $p < 0,05$ comparado à CMD; ^b $p < 0,05$ comparado à 2CMD

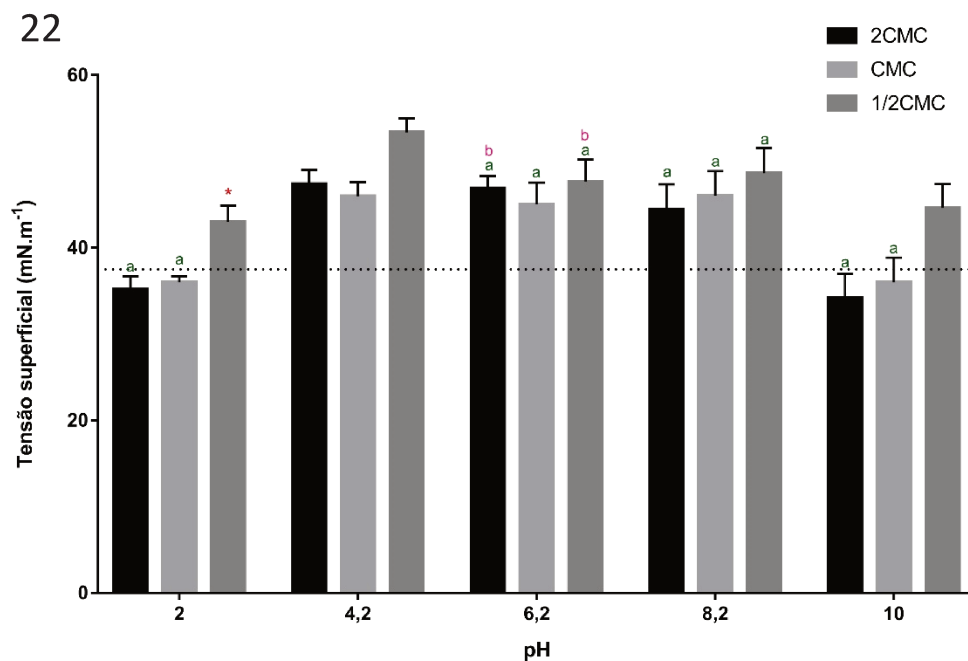


Figura 22: Tensão superficial em diferentes concentrações de biosurfactante após a aplicação do estresse em diversos pH.

* $p < 0,05$ comparado ao controle; ^a $p < 0,05$ comparado à CMD; ^b $p < 0,05$ comparado à 2CMD

Avaliando as Figuras 21 ($E_{24\%}$) e 22 (tensão superficial) foi possível inferir que, quando comparada ao controle, na $\frac{1}{2}$ CMD o índice de emulsificação manteve-se estável apenas no pH 10 e no teste de tensão superficial ela apresentou estabilidade no pH 2. Comparando a CMD ao controle, esta ficou estável no teste de $E_{24\%}$, nos pH 4,2, 6,2 e 10 e no teste de tensão superficial não apresentou estabilidade em nenhuma faixa de pH testada. Por outro lado, observou-se que a 2CMD, em relação ao controle, apresentou estabilidade no pH 2 e 10, para o teste de $E_{24\%}$, e em nenhum pH para o teste de tensão superficial.

Averiguou-se estatisticamente os valores obtidos entre as três concentrações de biossurfactante extraído. Após os testes estatísticos, foi possível constatar que entre a CMD e $\frac{1}{2}$ CMD para o teste de $E_{24\%}$ os resultados são estatisticamente iguais no pH 10 e para tensão superficial nos pH 6,2 e 8,2. Para CMD e 2CMD o teste de tensão superficial não apresentou resultados significativamente diferentes nos pH 2, 6,2, 8,2 e 10, enquanto para o teste de emulsificação não apresentaram relação nas faixas de pH testadas. Para $\frac{1}{2}$ CMD e 2CMD no teste de tensão superficial apresentaram resultados iguais estatisticamente apenas no pH 6,2.

No teste de índice de emulsificação, com exceção do pH 8,2, pelo menos uma das concentrações estudadas ($\frac{1}{2}$ CMD, CMD e 2CMD) apresentaram resultados estatisticamente iguais ao do controle e em todos os pHs testados alguma concentração apresentou resultado acima de 50% (acima da linha tracejada), como pode ser visualizado na Figura 21. No teste de tensão superficial, Figura 22, apenas o pH 2 apresentou resultado semelhante ao do controle e nos pHs 2 e 10 as concentrações $\frac{1}{2}$ CMD e CMD apresentaram as maiores reduções da tensão superficial.

5.6.3.3. Salinidade

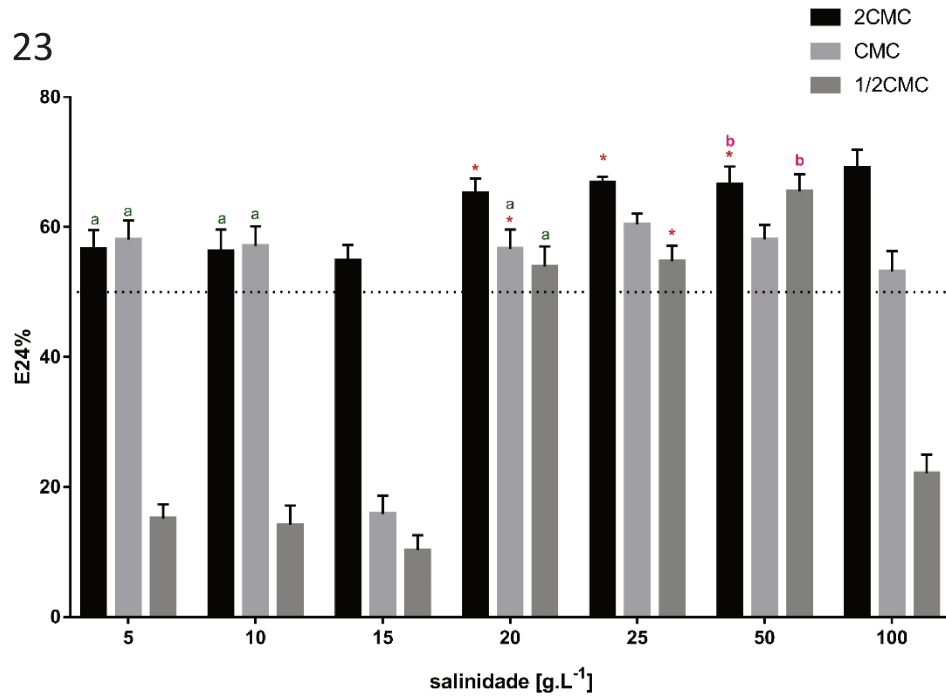


Figura 23: $E_{24\%}$ em diferentes concentrações de biossurfactante após a aplicação do estresse em diversas concentrações de NaCl.

* $p < 0,05$ comparado ao controle; ^a $p < 0,05$ comparado à CMD; ^b $p < 0,05$ comparado à 2CMD

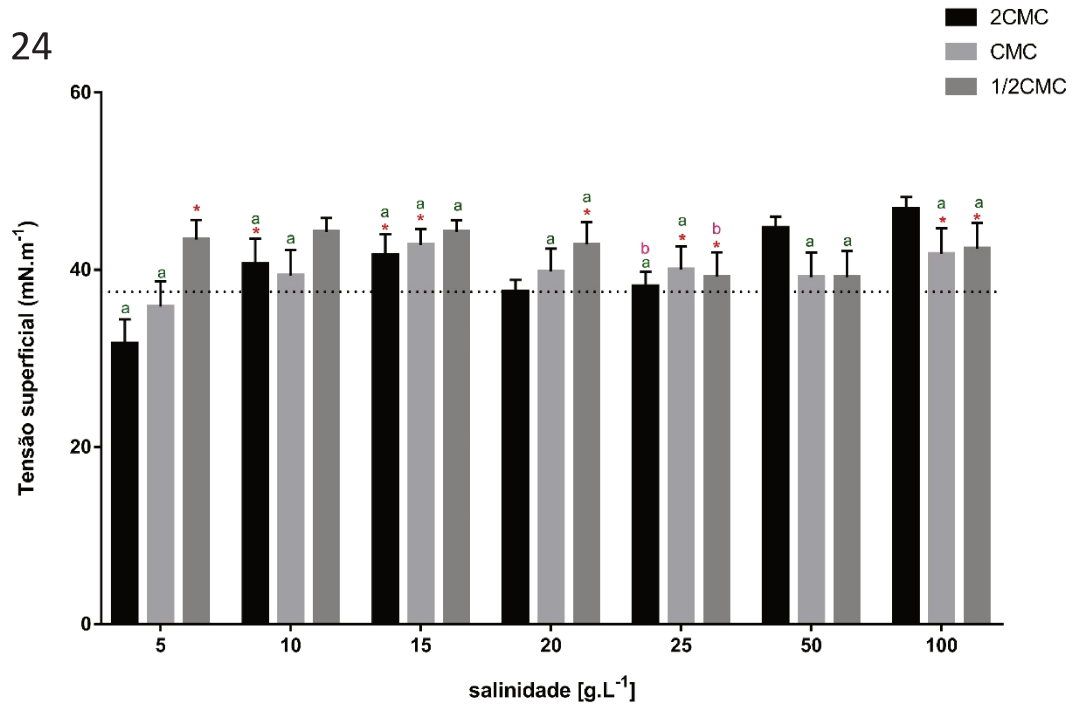


Figura 24: Tensão superficial em diferentes concentrações de biossurfactante após a aplicação do estresse em diversas concentrações de NaCl.

* $p < 0,05$ comparado ao controle; ^a $p < 0,05$ comparado à CMD; ^b $p < 0,05$ comparado à 2CMD

Analisando as Figuras 23 ($E_{24\%}$) e 24 (tensão superficial) foi possível inferir que, quando comparada ao controle, na $\frac{1}{2}$ CMD o índice de emulsificação manteve-se constante a 25 g.L^{-1} , enquanto no teste de tensão superficial ela apresentou estabilidade nas concentrações: 5, 20, 25 e 100 g.L^{-1} . Comparando a CMD ao controle, esta ficou estável no teste de $E_{24\%}$ na [NaCl] de 20 g.L^{-1} . No teste de tensão superficial, a CMD apresentou estabilidade nas concentração de 15, 25 e 100 g.L^{-1} de NaCl. Além disto, observou-se que a 2CMD, em relação ao controle, apresentou estabilidade nas concentração de cloreto de sódio: 20, 25 e 50 g.L^{-1} , para o teste de $E_{24\%}$, e nas de 10 e 15 g.L^{-1} para o teste de tensão superficial.

Averiguou-se estatisticamente os valores obtidos entre as três concentrações de biossurfactante extraído. Após os testes estatísticos, foi possível constatar que entre a $\frac{1}{2}$ CMD e a CMD para o teste de $E_{24\%}$ os resultados são estatisticamente iguais na concentração de NaCl de 20 g.L^{-1} e para tensão superficial nas [NaCl] 15, 20, 50 e 100 g.L^{-1} . Para CMD e 2CMD o teste de tensão superficial não apresentou resultados significativamente diferentes nas concentrações de 15, 20, 50 e 100 g.L^{-1} , enquanto para o teste de emulsificação não apresentaram resultados significativamente diferentes apenas na concentração de 20 g.L^{-1} . Para $\frac{1}{2}$ CMD e 2CMD no teste de tensão superficial apresentaram resultados iguais estatisticamente apenas na concentração de 25 g.L^{-1} e no teste de emulsificação apenas em 50 g.L^{-1} .

No teste de índice de emulsificação nas concentrações salinas de 20, 25 e 50 g.L^{-1} pelo menos uma das concentrações estudadas ($\frac{1}{2}$ CMD, CMD e 2CMD) apresentaram resultados estatisticamente iguais ao do controle e em todas as concentrações testadas alguma concentração apresentou resultado acima de 50% (acima da linha tracejada), como pode ser visualizado na Figura 23. No teste de tensão superficial, Figura 24, apenas na concentração de 50 g.L^{-1} nenhuma das concentrações do biossurfactante apresentaram resultados semelhantes ao do controle e nas concentrações de 5, 10, 20, 25 e 50 g.L^{-1} as concentrações apresentaram as maiores reduções da tensão superficial.

Os dados demonstram que o biossurfactante apresenta estabilidade em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade podendo ser aplicado em atividades biotecnológicas que apresentem alterações dessas variáveis ou condições extremas.

Segundo Purwasena e colaboradores (2019) o biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus licheniformis* DS1 apresentou boa estabilidade em manter a atividade de emulsificação em pH 4–10, altas temperaturas de até 120°C e com uma concentração de NaCl de até 10% (p / v). Resultados similares foram obtidos por Al-wahaibi e colaboradores (2014) ao estudarem o biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* B30. Eles confirmaram que a biomolécula apresentou estabilidade em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade. O

biossurfactante apresentou estabilidade nas faixas de 40 a 100 °C e nas temperaturas de 121 e 160 °C. Em relação ao pH apresentou estabilidade em pH neutro e alcalino, perdendo suas propriedades em pH ácido, em virtude do biossurfactante não ser muito solúvel em condições altamente ácidas. Em relação à concentração salina o desempenho favorável do biossurfactante ficou restrito à concentração de até 5% e NaCl.

5.7. Aplicação Biotecnológica

A aplicação biotecnológica do biossurfactante em água doce estéril contaminada por óleo de motor foi realizada sob três condições: água esterilizada e hidrocarboneto; água esterilizada, levedura (*Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747) e hidrocarboneto; e água esterilizada, *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, biossurfactante na concentração micelar crítica (59,14 g.L⁻¹) e hidrocarboneto. Os experimentos foram conduzidos ao longo de 30 dias e as análises foram realizadas nos dias 1, 7, 21 e 30. As informações foram utilizadas gerando o gráfico abaixo (Figura 25).

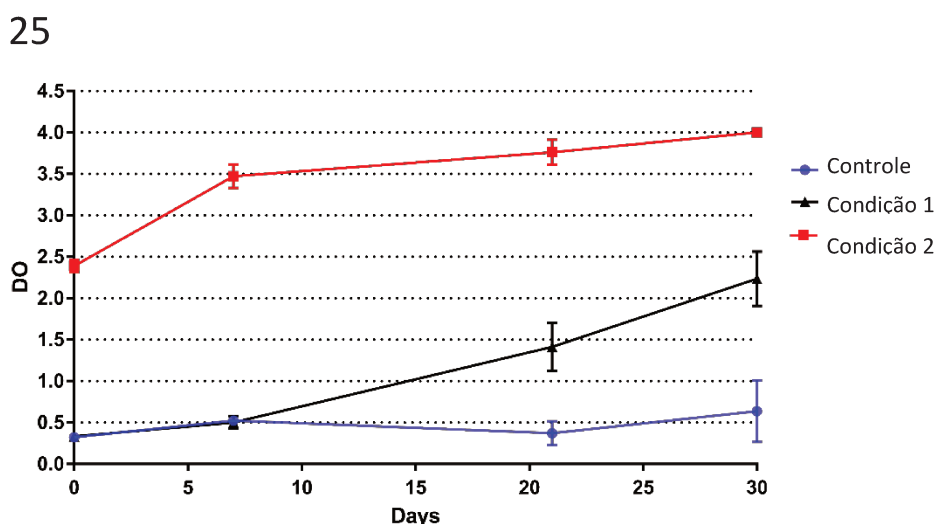


Figura 25: Aplicação biotecnológica: água doce contaminada por óleo de motor usado em condições estéreis. **Condições:** controle – água + hidrocarboneto; condição 1 – água + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747) + hidrocarboneto; condição 2 – água + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747) + hidrocarboneto + biossurfactante na concentração micelar crítica (59,14 g.L⁻¹).

A análise da Figura 25 demonstra a influência da presença do biossurfactante no crescimento microbiano. O crescimento da levedura sem o biossurfactante aconteceu apenas após 7 dias de fermentação, possivelmente por ser o período necessário para que o microrganismo conseguisse produzir a biomolécula. Após esse período apresentou um crescimento exorbitante entre o sétimo e trigésimo dia de experimento, com pico em

aproximadamente 2,3 de densidade óptica. No experimento em que o biossurfactante foi adicionado a levedura não precisou produzi-lo, apresentando um crescimento acelerado nos primeiros sete dias, alcançando cerca de 3,5 de densidade óptica. A linha azul representa o controle negativo. Com esses dados acredita-se que o biossurfactante tenha a função de tornar o hidrocarboneto biodisponível para utilização pelo microrganismo.

Realizou-se um segundo experimento de biorremediação utilizando água doce não esterilizada contaminada com óleo de motor. Apenas duas condições foram testadas: água não estéril e hidrocarboneto; e água não estéril, biossurfactante na concentração micelar crítica ($59,14 \text{ g.L}^{-1}$) e hidrocarboneto. O experimento durou 30 dias, com amostras coletadas no primeiro, sétimo, 21º e 30º dia de experimento. Com os resultados plotou-se o gráfico abaixo (Figura 26).

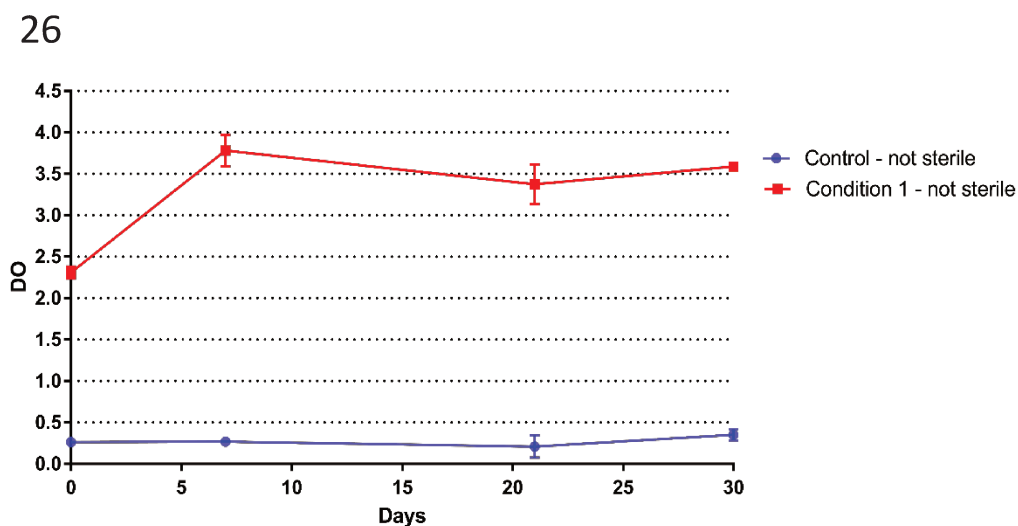


Figura 26: Aplicação biotecnológica: água doce contaminada por óleo de motor usado em condições não estéreis. **Condições:** controle – água + hidrocarboneto; condição 1 – água + hidrocarboneto + biossurfactante na concentração micelar crítica ($59,14 \text{ g.L}^{-1}$).

A avaliação da Figura 26 confirma a importância da presença do biossurfactante no meio para que o hidrocarboneto possa ser utilizado como fonte de carbono pelos microrganismos, pois a biomolécula atuou como bio estimulante para o crescimento dos microrganismos. Sem a adição da biomolécula (linha azul) não foi perceptível crescimento dos microrganismos durante os 30 dias de experimento, porém com a adição do biossurfactante (linha vermelha) percebeu-se um crescimento acelerado nos primeiros sete dias.

Esses dados reforçam a hipótese da possível função dos biossurfactantes: tornar o hidrocarboneto biodisponível para utilização pelos microrganismos. Além disso, como em ambos os experimentos, com água estéril e água não estéril, o crescimento estabilizou após sete

dias de fermentação. Possivelmente o que ocasionou essa estabilidade foi a ausência de fonte de carbono, ou seja, a quantidade de hidrocarbonetos adicionada não foi suficiente para manter o crescimento dos microrganismos ao longo dos 30 dias (Figura 25 e 26).

Batista e colaboradores (2010) estudaram a capacidade de remover contaminantes hidrofóbicos do biossurfactante produzido pela levedura *Candida tropicalis*. Eles testaram duas amostras de areia (areia brasileira padrão e areia da praia) impregnadas com 10% de petróleo ou óleo de motor. Os resultados obtidos para a remoção de petróleo e óleo de motor adsorvido nas amostras de areia testadas foram de aproximadamente 80%. Maiores porcentagens de remoção foram observadas na areia da praia provavelmente como resultado do menor tamanho das partículas da areia brasileira padrão, pois permitiu uma alta adsorção do contaminante e remoção reduzida pelos biossurfactantes.

Santos e colaboradores (2017) analisaram a performance do biossurfactante produzido pela levedura *Candida lipolytica* na biodegradação do óleo de motor através da atividade de microrganismos indígenas da água do mar. Eles analisaram a influência do biossurfactante em três concentrações diferentes: $\frac{1}{2}$ CMD, CMD e 2CMD. Os dados obtidos demonstram aumento do crescimento de bactérias na presença da maior concentração da biomolécula, enquanto a solução de menor concentração estimulou o crescimento de fungos. Observaram também que o crescimento dos fungos indígenas foi pobre na ausência do biossurfactante.

Estudos semelhantes foram desenvolvidos por Almeida e colaboradores (2018). Os pesquisadores analisaram a influência da biomolécula produzida pela levedura *Candida tropicalis* UCP0996 na biorremediação de água do mar contaminada por óleo de motor, também em três diferentes concentrações do biossurfactante: CMD, 2CMD e 5CMD. Os resultados do crescimento de microrganismos indígenas da água do mar foram superiores na presença do biossurfactante, quando comparados com o controle (ausência do tensoativo). Observaram, em todas as condições testadas, que o crescimento bacteriano atingiu o máximo no 14º dia de experimento, diminuindo o número de células microbianas após esse período. Em relação aos fungos, após o 14º dia ocorreu um aumento acelerado, podendo estar relacionado ao declínio do número de bactérias (redução na competição).

6. Conclusão

- Melhores fontes de carbono: extrato de abacaxi e extrato de levedura;
- Melhores fontes de nitrogênio: peptona e sulfato de amônia;
- Meio otimizado:
 - Extrato de levedura: 15 g.L⁻¹;

- Extrato de abacaxi: 25 g.L⁻¹;
- Peptona: 1,5 g.L⁻¹;
- Sulfato de amônio: 1 g.L⁻¹;
- pH: 8;
- Tempo de fermentação: 24 horas.
- Suplementação após 10 horas de fermentação aumenta a produção do biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, de 21,2 g.L⁻¹ para 36 g.L⁻¹;
- Metodologia de extração selecionada: extração com acetona fria;
- Hidrofobicidade celular: óleo de soja;
- Concentração micelar crítica: 59,14 g.L⁻¹;
- Estabilidade de emulsão: todas as concentrações testadas do biossurfactante extraído (½CMD, CMD e 2CMD) apresentaram estabilidade de emulsão e não apresentaram resultados diferentes entre si;
- Estabilidade:
 - Os dados demonstraram que o biossurfactante apresenta estabilidade em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade, podendo ser aplicado em atividades biotecnológicas que apresentem alterações dessas variáveis em condições extremas.
- A presença do biossurfactante influenciou positivamente o crescimento microbiano. Portanto confirma-se a hipótese de que essa biomolécula auxilia no processo de biodisponibilidade de hidrocarbonetos em ambientes contaminados, sendo viável sua aplicação na biorremediação.

Após o exposto acima, evidencia a necessidade do prosseguimento com os estudos da produção de biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, visto o extraordinário potencial para aplicações biotecnológicas ambientais e a alta produtividade da biomolécula. Configura-se como possíveis próximos passos a caracterização estrutural da biomolécula, estudos da produção do biossurfactante em biorreatores com controle de algumas condições, purificação da biomolécula e aplicações biotecnológicas, como: remediação de solo contaminado com hidrocarbonetos, entrega controlada de medicamentos, utilização em cosméticos, remediação de ambientes contaminados por metais pesados, entre outras.

7. Referências

- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, [S. l.], v. 223, n. 1–3, p. 143–151, 2008. DOI: 10.1016/j.desal.2007.01.198.
- ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 669–679, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.10.058.
- AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 114, p. 324–333, 2014. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.09.022.
- ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. Initial steps of sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 67–73, 1996. DOI: 10.1007/s002530050784.
- ALBUQUERQUE, T. L.; DA SILVA, I. J.; DE MACEDO, G. R.; ROCHA, M. V. P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 1779–1789, 2014. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.07.010.
- ALMEIDA, D. G.; DA SILVA, R. C. F. S.; BRASILEIRO, P. P. F.; DE LUNA, J. M.; DA SILVA, M. G. C.; RUFINO, R. D.; COSTA, A. F. S.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Application of a biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP 0996 produced in low-cost substrates for hydrophobic contaminants removal. **Chemical Engineering Transactions**, [S. l.], v. 64, p. 541–546, 2018. DOI: 10.3303/CET1864091.
- ALMEIDA, D. G. De; SILVA, R. C. F. S. Da; BRASILEIRO, P. P. F.; LUNA, J. M. De; SARUBBO, L. A. Utilização de planejamento experimental na produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* a partir de resíduos industriais. In: ANAIS DO XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XX, 2015, São Paulo. **Anais [...]**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2015. p. 2686–2693. DOI: 10.5151/chemeng-cobeq2014-1957-16679-177764.
- AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M. J.; COUTINHO, J. A. P. Biosurfactants from yeasts: Characteristics, production and application. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 672, p. 236–249, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_18.
- ARAÚJO, H. W. C.; ANDRADE, R. F. S.; MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; RUBIO-

- RIBEAUX, D.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 2, 2019. DOI: 10.1186/s12934-018-1046-0.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 1–12, 1995. DOI: 10.1016/0960-8524(94)00101-6.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 53, n. 5, p. 495–508, 2000. DOI: 10.1007/s002530051648.
- 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. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010. DOI: 10.1007/s00253-010-2589-0.
- BARBIERI, E.; SCHIAVANO, G. F.; SANTI, M.; VALLORANI, L.; CASADEI, L.; GUESCINI, M.; GIOACCHINI, A. M.; RINALDI, L.; STOCCHI, V.; BRANDI, G. Bacterial diversity of traditional Fossa (pit) cheese and its ripening environment. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 62–67, 2012. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.09.009.
- BARROS, F. F. C.; DE QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 409–414, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200031.
- BATISTA, R. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; DE SOUZA, J. E. G.; SARUBBO, L. A. Effect of Medium Components on the Production of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* Applied to the Removal of Hydrophobic Contaminants in Soil. **Water Environment Research**, [S. l.], v. 82, n. 5, p. 418–425, 2010. DOI: 10.2175/106143009X12487095237279.
- BHADURY, P.; MOHAMMAD, B. T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 325–337, 2006. DOI: 10.1007/s10295-005-0070-3.
- BHAIRI, S. M.; MOHAN, C.. **Detergentes - A Guide to the properties and uses of Detergents in biology and biochemistry**. 1. ed. San Diego: Calbiochem, 2001.
- BHARALI, P.; DAS, S.; KONWAR, B. K.; THAKUR, A. J. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. **International**

Biodeterioration and Biodegradation, [S. l.], v. 65, n. 5, p. 682–690, 2011. DOI: 10.1016/j.ibiod.2011.04.001.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 152, n. 1–2, p. 41–52, 1999. DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00684-0.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building**. 1. ed. New York: John Wiley and Sons, 1978.

BRANCO, L. S. C.; ALMEIDA, M. M. T.; CAETANO, T. M.; PINTO, G. A. S.; AZEREDO, H. M. C. Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa por. *In*: ANAIS DO XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA., XVIII, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais [...]**. Foz do Iguaçu p. 6926–6934.

BRUMANO, L. P.; ANTUNES, F. A. F.; SOUTO, S. G.; DOS SANTOS, J. C.; VENUS, J.; SCHNEIDER, R.; DA SILVA, S. S. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 243, p. 264–272, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.088.

BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; GÖTTLICH, E.; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI, F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Marine Genomics**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 43–50, 2009. DOI: 10.1016/j.margen.2009.04.002.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. B. **Statistical Design - Chemometrics**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2006.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 244, n. 2, p. 229–234, 2005. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.01.043.

BUZZINI, P.; BRANDA, E.; GORETTI, M.; TURCHETTI, B. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: Diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 217–241, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01348.x.

CABRERA, M. Á.; BLAMEY, J. M. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. **Biological Research**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 37, 2018. DOI: 10.1186/s40659-018-0186-3.

CAI, Q.; ZHANG, B.; CHEN, B.; ZHU, Z.; LIN, W.; CAO, T. Screening of biosurfactant

producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments.

Marine Pollution Bulletin, [S. l.], v. 86, n. 1–2, p. 402–410, 2014. DOI:

10.1016/j.marpolbul.2014.06.039.

CAMARGO, F. P.; DE MENEZES, A. J.; TONELLO, P. S.; DOS SANTOS, A. C. A.;

DUARTE, I. C. S. Characterization of biosurfactant from yeast using residual soybean oil

under acidic conditions and their use in metal removal processes. **FEMS Microbiology**

Letters, [S. l.], v. 365, n. 10, 2018. DOI: 10.1093/femsle/fny098.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S.; KAUR, J.; MEHTA, S. K. Synthesis of biosurfactants

and their advantages to microorganisms and mankind. **Advances in Experimental Medicine**

and Biology, [S. l.], v. 672, p. 261–280, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_20.

CARNEIRO, C. V. G. C.; E SILVA, F. C. P.; ALMEIDA, J. R. M. Xylitol production:

Identification and comparison of new producing yeasts. **Microorganisms**, [S. l.], v. 7, n. 11,

p. 1–15, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7110484.

COELHO, A. R.; NOBREGA, G. M. A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.;

HARADA, K.; HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando

biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v.

32, n. Suplp, p. 1879–1892, 2011. DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32Suplp1879.

CONNELL, L.; REDMAN, R.; CRAIG, S.; SCORZETTI, G.; ISZARD, M.; RODRIGUEZ,

R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. **Microbial Ecology**,

[S. l.], v. 56, n. 3, p. 448–459, 2008. DOI: 10.1007/s00248-008-9363-1.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced

production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation

additions. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 408–412, 1981.

DOI: 10.1128/aem.42.3.408-412.1981.

COWAN, D. A.; TOW, L. A. Endangered antarctic environments. **Annual Review of**

Microbiology, [S. l.], v. 58, p. 649–690, 2004. DOI:

10.1146/annurev.micro.57.030502.090811.

CRISÓSTOMO, L. A.; SANTOS, F. J. S.; OLIVEIRA, V. H.; RAIJ, B. V.; BERNARDI, A.

C. C.; SOARES, I. Cultivo do cajueiro anão precoce: Aspectos fitotécnicos com ênfase na

adubação e na irrigação. **Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica**, [S. l.], p. 1–8, 2003.

D'AMICO, S.; COLLINS, T.; MARX, J. C.; FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic

microorganisms: Challenges for life. **EMBO Reports**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 385–389, 2006.

DOI: 10.1038/sj.embor.7400662.

- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 104, n. 6, p. 1675–1684, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x.
- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 1015–1019, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.07.015.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 246–253, 2010. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.04.002.
- DEEPIKA, K. V.; KALAM, S.; RAMU SRIDHAR, P.; PODILE, A. R.; BRAMHACHARI, P. V. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 5, p. 38–47, 2016. DOI: 10.1016/j.bcab.2015.11.006.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106364>.
- DUARTE, A. W. F.; DAYO-OWOYEMI, I.; NOBRE, F. S.; PAGNOCCA, F. C.; CHAUD, L. C. S.; PESSOA, A.; FELIPE, M. G. A.; SETTE, L. D. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 1023–1035, 2013. DOI: 10.1007/s00792-013-0584-y.
- DUBEY, K. V.; CHARDE, P. N.; MESHRAM, S. U.; SHENDRE, L. P.; DUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanensis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 126, p. 368–374, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.024.
- FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 1351–1371, 2000. DOI: 10.1099/00207713-50-3-1351.
- FERREIRA, J. F. **Caracterização e purificação da enzima Bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato**. 2007. Dissertação (Mestrado Faculdade de Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por

levedura. **Química Nova**, [S. l.], v. 31, n. 8, p. 2091–2099, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000800033.

FREITAS, B. G.; BRITO, J. G. M.; BRASILEIRO, P. P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. OCT, p. 1–9, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01646.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, [S. l.], v. 89, n. 11, p. 483–496, 2002. DOI: 10.1007/s00114-002-0372-5.

GAN, H. M.; THOMAS, B. N.; CAVANAUGH, N. T.; MORALES, G. H.; MAYERS, A. N.; SAVKA, M. A.; HUDSON, A. O. Whole genome sequencing of *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the chewing stick (*Distemonanthus benthamianus*): Insights into *Rhodotorula* phylogeny, mitogenome dynamics and carotenoid biosynthesis. **PeerJ**, [S. l.], v. 2017, n. 11, 2017. DOI: 10.7717/peerj.4030.

GERDAY, C.; AITTALEB, M.; BENTAHIR, M.; CHESSA, J. P.; CLAVERIE, P.; COLLINS, T.; D'AMICO, S.; DUMONT, J.; GARSOUX, G.; GEORLETTE, D.; HOYOUX, A.; LONHIENNE, T.; MEUWIS, M. A.; FELLER, G. Cold-adapted enzymes: From fundamentals to biotechnology. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 103–107, 2000. DOI: 10.1016/S0167-7799(99)01413-4.

GESHEVA, V.; STACKEBRANDT, E.; VASILEVA-TONKOVA, E. Biosurfactant production by halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, antarctica. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 112–117, 2010. DOI: 10.1007/s00284-010-9584-7.

GILBERT, J. A.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R.; LAYBOURN-PARRY, J. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. **Microbiology**, [S. l.], v. 150, n. 1, p. 171–180, 2004. DOI: 10.1099/mic.0.26610-0.

HE, N.; WU, T.; JIANG, J.; LONG, X.; SHAO, B.; MENG, Q. Toward high-efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 157, p. 317–324, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.06.007.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 47, n. 8, p. 1207–1219, 2012. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.04.018.

- HOOG, G. S. De; GUARRO, J. ; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2000.
- HUA, Z.; CHEN, J.; LUN, S.; WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, [S. l.], v. 37, n. 17, p. 4143–4150, 2003. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00380-4.
- ILORI, M. O.; AMUND, D. I. Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 56, n. 7–8, p. 547–552, 2001. DOI: 10.1515/znc-2001-7-812.
- JEZIERSKA, S.; CLAUS, S.; VAN BOGAERT, I. Yeast glycolipid biosurfactants. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 592, n. 8, p. 1312–1329, 2018. DOI: 10.1002/1873-3468.12888.
- JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 184, n. June, p. 109607, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109607.
- KAWAHARA, H. Cryoprotectants and Ice-Binding Proteins. In: **Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 237–257. DOI: 10.1007/978-3-319-57057-0_11.
- KAWAHARA, H.; HIRAI, A.; MINABE, T.; OBATA, H. Stabilization of astaxanthin by a novel biosurfactant produced by *Rhodotorula mucilaginosa* KUGPP-1. **Biocontrol science**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 21–8, 2013. DOI: 10.4265/bio.18.21.
- KHAN, A. M.; KHIZAR, S.; KHAN, S. A.; ALI, S.; SHAH, A.; NAZAR, M. F.; IFTIKHAR, F. J.; SHAH, F.; KHAN, R. A.; KHAN, A. R. Investigation of counterion effects of transition metal cations (Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) on cetrimonium bromide using cyclic voltammetry. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 313, p. 113599, 2020. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.113599.
- KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X. Y.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 367, n. 1, p. 311–318, 2012. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.11.009.
- KIM, P. I.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. T. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 138–145, 2010. DOI: 10.4014/jmb.0905.05007.
- KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization

- of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 249, 2000. DOI: 10.1042/BA19990111.
- KIMURA, A.; MORITA, M. Fermentative production of CDP-choline. VII. Fermentative formation of CDP-choline by intact cells of a yeast, *Saccharomyces carlsbergensis* (IFO 0641) treated with a detergent, triton X-100. **Agricultural and Biological Chemistry**, [S. l.], v. 39, n. 7, p. 1469–1474, 1975. DOI: 10.1271/bbb1961.39.1469.
- KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 149–156, 2001. DOI: 10.1016/S0167-7012(01)00259-7.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Infections due to *Trichosporon* and miscellaneous fungi. In: **Medical Mycology**. 2^o ed. Filadelfia: Lea & Febiger, 1992. p. 866.
- LIN, T. C.; YOUNG, C. C.; HO, M. J.; YEH, M. S.; CHOU, C. L.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 99, n. 5, p. 466–472, 2005. DOI: 10.1263/jbb.99.466.
- LIU, Y.; KOH, C. M. J.; JI, L. Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 3927–3933, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.11.115.
- 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 and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 102, p. 202–209, 2013. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.08.008.
- MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. In: LASKIN, A. I.; BENNETT, J. W.; GADD, G. M. (org.). **Advances in Applied Microbiology**. volume 52 ed. [s.l: s.n.]. p. 101–121. DOI: 10.1016/S0065-2164(03)01004-9.
- MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 675–683, 2005.
- MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 30, n. 11, p. 558–565, 2012. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.003.
- MARGESIN, R.; FELL, J. W. *Mrakiella cryoconiti* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, anamorphic, basidiomycetous yeast from alpine and arctic habitats. **International Journal of**

- Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 2977–2982, 2008. DOI: 10.1099/ijs.0.2008/000836-0.
- MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in Microbiology**, [S. l.], v. 162, n. 3, p. 346–361, 2011. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.12.004.
- MELETTI, L. M. M.; RUGGIERO, A. C. S. C.; RUGGIERO, C. Avanços na fruticultura tropical no brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 073–080, 2011. DOI: 10.1590/S0100-29452011005000042.
- MENESES, D. P.; GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, F.; GONÇALVES, L. R. B.; RODRIGUES, L. R.; RODRIGUES, S. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 204, p. 40–47, 2017. DOI: 10.1016/j.micres.2017.07.004.
- MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 2004. Tese Doutorado em Ciências em Engenharia Civil - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 281–288, 2009. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02485.x.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, [S. l.], v. 60, n. 1–4, p. 371–380, 2001. DOI: 10.1016/S0013-7952(00)00117-4.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.06.009.
- NASCENTES, C. C.; ARRUDA, M. A. Z.; MANIASSO, N. Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fases e pré-concentração. **Química Nova**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 483–489, 2002. DOI: 10.1590/s0100-40422002000300023.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 106, n. 1–3, p. 295–301, 2003. DOI: 10.1385/ABAB:106:1-3:295.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química**

- Nova, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000500013.
- NOÜY., P. LECOMTE D. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, [S. l.], p. 625–632, 1925. DOI: 10.1085/jgp.7.5.625.
- OLOKE, J. K.; GLICK, B. R. Production of bioemulsifier by an unusual isolate of salmon/red melanin containing *Rhodotorula glutinis*. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 164–171, 2005. DOI: 10.5897/AJB2005.000-3033.
- PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 633–654, 2011. DOI: 10.3390/ijms12010633.
- PAIVA, F. F. A.; GARRUTTTI, D. S.; NETO, R. M. S. Aproveitamento roveitamento Industrial do caju. **Embrapa-CNPAT/SEBRAE/CE**, [S. l.], p. 1–88, 2000.
- PARK, P. K.; CHO, D. H.; KIM, E. Y.; CHU, K. H. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 429–434, 2005. DOI: 10.1007/s11274-004-1891-3.
- PAVLOVA, K.; RUSINOVA-VIDEVA, S.; KUNCHEVA, M.; KRATCHANOVA, M.; GOCHEVA, M.; DIMITROVA, S. Synthesis and characterization of an exopolysaccharide by antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL100. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 163, n. 8, p. 1038–1052, 2011. DOI: 10.1007/s12010-010-9107-9.
- PINHO, Livia Xerez. **Aproveitamento do resíduo do pedúnculo de caju (anacardium occidentale l.) Para alimentação humana**. 2009. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, [S. l.], 2009.
- PORTER, M. R. **Handbook of Surfactants**. Boston, MA: Springer US, 1991. DOI: 10.1007/978-1-4757-1293-3.
- PURWASENA, I. A.; ASTUTI, D. I.; SYUKRON, M.; AMANIYAH, M.; SUGAI, Y. **Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR** **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 2019. DOI: 10.1016/j.petrol.2019.106383.
- RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 1277–1281, 2002. DOI: 10.1021/bp020071x.
- RAMANATHAN, M.; SHRESTHA, L. K.; MORI, T.; JI, Q.; HILL, J. P.; ARIGA, K. Amphiphile nanoarchitectonics: from basic physical chemistry to advanced applications.

Physical Chemistry Chemical Physics, [S. l.], v. 15, n. 26, p. 10580, 2013. DOI: 10.1039/c3cp50620g.

RATNAM, B. V. V.; SUBBA RAO, S.; MENDU, D. R.; NARASIMHA RAO, M.; AYYANNA, C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from palmyra jaggery using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 399–404, 2005. DOI: 10.1007/s11274-004-2461-4.

RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. May, p. 1–13, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00434.

RIVARDO, F.; TURNER, R. J.; ALLEGRONE, G.; CERI, H.; MARTINOTTI, M. G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 83, n. 3, p. 541–553, 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-1987-7.

ROSA, M. M.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 1491–1502, 2010. DOI: 10.1007/s11274-010-0324-8.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; NETO, B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 8, p. 907–914, 2008. DOI: 10.1007/s10295-008-0364-3.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, [S. l.], v. 6, n. 1–3, p. 127–141, 2007. DOI: 10.1007/s11157-006-9107-y.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants : Fermentation , Applications , Current. [S. l.], v. 2011, p. 1–42, 2011.

SANCHES, M. A.; LUZEIRO, I. G.; CORTEZ, A. C. A.; DE SOUZA, E. S.; ALBUQUERQUE, P. M.; CHOPRA, H. K.; DE SOUZA, J. V. B. Production of Biosurfactants by Ascomycetes. **International Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 2021, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1155/2021/6669263.

SANTOS, D. K. F.; MEIRA, H. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity

- for application as a bioremediation agent. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 54, p. 20–27, 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.12.020.
- SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016. DOI: 10.3390/ijms17030401.
- SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 68–73, 2007. DOI: 10.1007/s00284-006-0412-z.
- SCHELL, W. A. New Aspects of Emerging Fungal Pathogens: A Multifaceted Challenge. **Clinics in Laboratory Medicine**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 365–387, 1995. DOI: 10.1016/S0272-2712(18)30336-6.
- SEN, S.; BORAH, S. N.; BORA, A.; DEKA, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 95, 2017. DOI: 10.1186/s12934-017-0711-z.
- SHAH, N.; NIKAM, R.; GAIKWAD, S.; SAPRE, V.; KAUR, J. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. **Indian Journal of Microbiology Research**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 5, 2016. DOI: 10.5958/2394-5478.2016.00002.9.
- SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. **Biotechnology Reports**, [S. l.], v. 11, p. 27–35, 2016. DOI: 10.1016/j.btre.2016.05.001.
- SHARMA, P.; SANGWAN, S.; KAUR, H. Process parameters for biosurfactant production using yeast *Meyerozyma guilliermondii* YK32. **Environmental Monitoring and Assessment**, [S. l.], v. 191, n. 9, 2019. DOI: 10.1007/s10661-019-7665-z.
- SHIVAJI, S.; PRAKASH, J. S. S. How do bacteria sense and respond to low temperature? **Archives of Microbiology**, [S. l.], v. 192, n. 2, p. 85–95, 2010. DOI: 10.1007/s00203-009-0539-y.
- SILVA, E. J.; SILVA, N. M. P. R.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SILVA, R. O.; SARUBBO, L. A. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 117, p. 36–41, 2014. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.012.
- SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 174–183, 2010.

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.050.

SILVEIRA, E.; MARQUES, P. P.; SILVA, S. S.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 230–235, 2009. DOI: 10.1016/j.ibiod.2008.09.007.

SINGH, N. S.; SHAO, N.; MCLEAN, J. R.; SEVUGAN, M.; REN, L.; CHEW, T. G.; BIMBO, A.; SHARMA, E.; TANG, X.; GOULD, K. L.; BALASUBRAMANIAN, M. K. SIN-inhibitory phosphatase complex promotes Cdc11p dephosphorylation and propagates SIN asymmetry in fission yeast. **Current Biology**, [S. l.], v. 21, n. 23, p. 1968–1978, 2011. DOI: 10.1016/j.cub.2011.10.051.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 126, n. 1, p. 2–13, 2019. DOI: 10.1111/jam.14057.

SOARES, P. A. G.; VAZ, A. F. M.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, A.; DA CUNHA, M. G. C. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**, [S. l.], v. 98, p. 389–395, 2012. DOI: 10.1016/j.seppur.2012.06.042.

SOUZA, E. C.; VESSONI-PENNA, T. C.; OLIVEIRA, R. P. S. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 89, p. 88–94, 2014. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.01.007.

SOUZA, K. S. T.; GUDIÑA, E. J.; AZEVEDO, Z.; DE FREITAS, V.; SCHWAN, R. F.; RODRIGUES, L. R.; DIAS, D. R.; TEIXEIRA, J. A. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 154, p. 373–382, 2017. a. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.041.

STELLER, S.; VATER, J. Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, [S. l.], v. 737, n. 1–2, p. 267–275, 2000. DOI: 10.1016/S0378-4347(99)00481-8.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 686–691, 2007. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02256.x.

THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. Biosurfactants from Potato Process Effluents. In: **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Totowa, NJ:

- Humana Press, 2000. v. 84–86p. 917–930. DOI: 10.1007/978-1-4612-1392-5_71.
- TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, [S. l.], v. 14, n. 04, p. 1010–1020, 2010. DOI: 10.4257/oeco.2010.1404.11.
- VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 232, p. 389–397, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.047.
- VASILEVA-TONKOVA, E.; GESHEVA, V. Glycolipids produced by Antarctic *Nocardioides* sp. during growth on n-paraffin. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 2387–2391, 2005. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.09.018.
- VAZ, D. A.; GUDIÑA, E. J.; ALAMEDA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 89, n. 1, p. 167–174, 2012. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.009.
- WANDERLEY NETO, A. O.; DA SILVA, V. L.; RODRIGUES, D. V.; RIBEIRO, L. S.; DA SILVA, D. N. N.; FREITAS, J. C. O. A novel oil-in-water microemulsion as a cementation flushing fluid for removing non-aqueous filter cake. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, [S. l.], v. 184, p. 106536, 2020. DOI: 10.1016/j.petrol.2019.106536.
- WIRTH, F.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, [S. l.], v. 2012, p. 1–7, 2012. DOI: 10.1155/2012/465717.
- YERGEAU, E.; KOWALCHUK, G. A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 2223–2235, 2008. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01644.x.
- YIN, H.; QIANG, J.; JIA, Y.; YE, J.; PENG, H.; QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 302–308, 2009. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.11.003.
- ZUCCONI, L.; CANINI, F.; TEMPORITI, M. E.; TOSI, S. Extracellular enzymes and bioactive compounds from antarctic terrestrial fungi for bioprospecting. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 17, n. 18, p. 1–31, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17186459.