



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BRUNO NICOLAU PAULINO

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS DA FAMÍLIA
USTILAGINACEAE PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES
GLICOLIPÍDICOS**

CAMPINAS

2018

BRUNO NICOLAU PAULINO

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS DA FAMÍLIA
USTILAGINACEAE PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES
GLICOLIPÍDICOS**

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Gláucia Maria Pastore

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
BRUNO NICOLAU PAULINO E ORIENTADA PELA
PROF^a DR^a GLÁUCIA MARIA PASTORE

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 140513/2016-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

P284p Paulino, Bruno Nicolau, 1989-
Potencial biotecnológico de leveduras da família *Ustilaginaceae* para a produção de biossurfactantes glicolipídicos / Bruno Nicolau Paulino. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Glaucia Maria Pastore.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biossurfactantes. 2. Leveduras. 3. Biotecnologia. 4. Otimização. I. Pastore, Glaucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biotechnological potential of yeasts from *Ustilaginaceae* family for production of glicolipid biosurfactants

Palavras-chave em inglês:

Biosurfactants

Yeasts

Biotechnology

Optimization

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Glaucia Maria Pastore [Orientador]

Ana Elizabeth Cavalcante Fai Buarque de Gusmão

Gislaine Ricci Leonardi

Juliana Velasco de Castro Oliveira

Ruann Janser Soares de Castro

Data de defesa: 01-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Profa. Dra. Ana Elizabeth Cavalcante Fai Buarque de Gusmão
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Gislaine Ricci Leonardi
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Juliana Velasco de Castro Oliveira
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais-CNPEN

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro
Universidade Estadual de Campinas

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno Bruno Nicolau Paulino.

*Dedicado à minha querida mãe, Dona Maria,
meu exemplo de garra e persistência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força para seguir em firme no propósito, por me proteger e me guiar nas adversidades.

Aos meus pais, especialmente minha mãe Dona Maria por sempre acreditar e me motivar a buscar o melhor para minha vida. Agradeço também aos meus irmãos, especialmente a minha irmã Rosi por ser um grande exemplo de pessoa.

À professora Gláucia, pela oportunidade, orientação e pelo cuidado ao longo dos quase seis anos de laboratório. Agradeço por me ajudar em uma das piores fases por que passei, sempre zelando pela minha completa recuperação e bem-estar. Não há palavras para descrever a enorme gratidão que tenho por tudo que a senhora fez.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de doutorado (Processo CNPq 140513/2016-7).

Aos membros da banca, titulares e suplentes, pelas correções e contribuições que ajudaram a melhorar meu trabalho. Aos membros titulares Profa. Gislaine Ricci, Prof. Ruann de Castro, Profa. Ana Fai e Dra. Juliana Velasco pela paciência, disponibilidade e compreensão.

A todos do Laboratório de Bioaromas, principalmente Angélica (Koala), Ana Paula (Medusa), Marina (Mochila), Mário (Manola), Líbia, Renata, Simiqueli, Débora e Dora por todo o auxílio, companheirismo e amizade. Especial agradecimento a Medusa que sempre compreendeu meu espírito rabugento e que levou marmitas de alpiste quando eu estava impossibilitado de andar. Agradeço ao meu brother Iramaia pelas risadas e bons momentos juntos. Poderia aproveitar aqui para me desculpar pelas eventuais brigas e/ou discussões, mas não irei fazer porque eu sempre estive certo.

Ao meu grande amigo Célio pela imensa ajuda na execução do trabalho. Foram dias e noites, um natal e um ano novo e várias cervejas. Obrigado pela paciência, conselhos, orientação e amizade, mas agradeço também pelas broncas, entre elas “Para de drama” e “escreva e não reclama” e claro pela frase mais falada nos últimos meses: “bora tomar umas no posto”. Não digo que a tese é sua também pois você já tem uma, contente-se com ela.

Ao professor Fernando Coelho pela oportunidade de vir para Unicamp no ano de 2010. Sem dúvidas não estaria aqui se não fosse esse pontapé inicial e as experiências

adquiridas durante a realização do meu estágio e TCC. Aproveito para agradecer aos seus ex-alunos Manoel Trindade e Marília Simão por terem me ajudado nessas fases. Agradeço ainda ao meu amigo Lucas Zeoly pela paciência e disponibilidade e por ter colaborado de forma tão profissional com a parte de caracterização do trabalho e claro pelas cervejas que você e o Célio me coagiram a tomar.

Aos Professores Gustavo Goldman da USP e Carlos Augusto Rosa da UFMG pela colaboração e disponibilidade quando os procurei para buscar as linhagens de leveduras utilizadas na tese. Agradeço ainda a Profa Bel pela disponibilidade em esclarecer as minhas dúvidas e auxiliar no tratamento dos dados estatísticos. Aos Professores Mário Maróstica, Juliano Bicas e Adriana Pavesi pela oportunidade como bolsista do Programa de Estágio Docente (PED). Ao Prof. Juliano Bicas em especial, pelas conversas, conselhos e brigas. Descobri que existe alguém mais teimoso do que eu.

Ao meu amigo Gustavo Molina que sempre me auxiliou durante o mestrado e doutorado, seja com ideias ou com oportunidades de trabalharmos juntos. Obrigado pela paciência com os prazos que sempre não cumpri e pelas boas risadas nos últimos anos. Agradecer também a amizade e companheirismo da Marina Gabriel Pessôa, que me ajudou inúmeras vezes e que sem dúvidas colaborou muito na elaboração dos trabalhos que publicamos nesses últimos anos. Não irei me desculpar pelas vezes que não salvei os dados estatísticos ou pela volta na lagoa, nem muito menos pelas surtadas no laboratório.

Agradeço a Fernanda Martins da 3M do Brasil pela oportunidade e confiança ao me selecionar para a vaga do programa Inova Talentos no ano de 2014. Sem dúvidas o ano de 2015 que passei na empresa me ajudaram a amadurecer profissionalmente. Parabéns pela sua competência e por compartilhar seus conhecimentos e me proporcionar boas risadas. Aproveito para agradecer também a Renata pela amizade e bons momentos na 3M do Brasil.

Agradeço aos meus amigos da FEA, Paula Menezes, Leonardo, Vivian, Fernanda, Verônica, Juliana Carusi pelos bons momentos nesses últimos anos. Aos funcionários da FEA, Ana Maria, Nadeje, Rosi do Café, Camila, Elemar e Andreia Ferrari da Secretaria de Pós-graduação, a Marcia e Bianca da Biblioteca, Silvia e Karla do Laboratório de Graduação. Especial agradecimento a dois grandes profissionais da FEA que são exemplos de humildade e caráter: Obrigado Nadir e Seu Dirceu!

Aos amigos de Unicamp, Núbia, Guilherme, Bruno, Adriana, entre outros que proporcionaram boas conversas e risadas. Aos amigos de Minas Gerais Victor e Gizelle pela amizade de longa data.

Por fim, agradeço ao Prof. João Miranda da FCM e ao médico Arthur Diniz pela grande ajuda e por me permitirem voltar a andar novamente. Aos funcionários do Cecom Cíntia e Tati por compreenderem meus pequenos atrasos de 15 a 45 minutos, e aos fisioterapeutas Ricardo e Fábio Martins por me auxiliarem na recuperação dos movimentos e saúde do meu joelho, sem dúvidas foram determinantes para minha recuperação.

Agradeço a Universidade Estadual de Campinas e Faculdade de Engenharia de Alimentos pela qualidade de ensino e oportunidades oferecidas.

RESUMO

O presente trabalho de doutorado teve por objetivo principal explorar o potencial biotecnológico de leveduras da família *Ustilaginaceae* para a produção de biossurfactantes glicolipídicos. Inicialmente, o trabalho prático foi direcionado para um estudo de *screening* com 34 linhagens de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* sp. e *Moesziomyces* sp. cultivadas em meio mineral com glicose como fonte de carbono e caldo YEPD. Dentre o total de linhagens testadas, quatro linhagens de *Pseudozyma aphidis* (UFMG-Y1387, UFMG-Y3468, UFMG-Y3533 e UFMG-Y5768) foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio de cultivo para valores menores que 32 mN/m, com eficiência de redução de tensão superficial superior a 53% para o meio mineral com glicose e 37% para o meio YEPD, indicando o potencial dessas leveduras para a produção de compostos tensoativos. Na sequência, foram avaliados o perfil de crescimento e o perfil de redução da tensão superficial das quatro linhagens de *P. aphidis* selecionadas na etapa de *screening* em meio mineral contendo diferentes fontes de carbono, incluindo manipueira, glicose, óleo de soja e ácido oleico. De forma geral, foi observado que utilizando fontes de carbono hidrofóbicas foram alcançados os melhores perfis de crescimento, com produção de biomassa seca em maior que 15 g/L, e de redução de tensão superficial (valores menores que 31 mN/m) após 192 horas de cultivo. Com base nos resultados dessa etapa do trabalho, a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 foi considerada a mais promissora uma vez que apresentou os melhores perfis de redução de tensão superficial e de concentração micelar crítica (CMC) nos diferentes meios de cultivo avaliados. A partir das análises de espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear foi possível identificar a produção de manosileritritol lipídeos (MELs) do tipo A, B e C pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 quando cultivada em meio mineral com glicose, óleo de soja e ácido oleico como fontes de carbono. Além disso, pela primeira vez foi observada a produção de manosilmanitol lipídeos (MML) por uma linhagem de *P. aphidis* em meio de cultivo contendo ácido oleico. Os biossurfactantes purificados exibiram baixos valores de concentração micelar crítica (CMC) variando de 0,96 mg/L a 3,65 mg/L, indicando sua eficiência superior em relação aos valores reportados para os tensoativos sintéticos. O balanço hidrofílico-hidrofóbico (HLB) dos compostos tensoativos purificados determinado pelo método de Griffin variou entre 8,25 a 9,12, sendo esses valores condizentes aos reportados na literatura para MELs e comparáveis aos de tensoativos sintéticos utilizados em formulações cosméticas. Na última etapa do trabalho foram realizados três planejamentos experimentais para o estudo da influência e otimização das fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultivo para a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468

seguida da análise quimiométrica dos dados utilizando a Análise Componentes Principais (PCA) para identificação das correlações entre as fontes de carbono e nitrogênio e as isoformas de MEL produzidas. Como resultado dessa etapa foi possível a obtenção de cinco modelos matemáticos preditivos válidos estatisticamente com coeficientes de determinação (R^2) entre 80% a 96% e altos valores de F calculado no teste de Fisher, além da comprovação do papel determinante da fonte carbono hidrofóbica na discriminação de ensaios com melhor perfil de produção de biossurfactantes. Assim, o trabalho apresentado nessa tese abre caminho para novos estudos para a produção biotecnológica de biossurfactantes glicolipídicos, especificamente manosileritritol lipídeos e manosilmanitol lipídeo utilizando a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 bem como a potencial aplicação desses compostos nas áreas de cosméticos e de alimentos.

ABSTRACT

The main objective of this work was to explore the biotechnological potential of yeasts from *Ustilaginaceae* family for production of glycolipid biosurfactants. Initially, the practical work was directed to a screening study with 34 strains of yeasts belonging the genus *Pseudozyma* sp. and *Moesziomyces* sp. cultivated in mineral medium with glucose as carbon source and YEPD broth. Among all tested microorganisms, four strains of *Pseudozyma aphidis* (UFMG-Y1387, UFMG-Y3468, UFMG-Y3533 and UFMG-Y5768) were able to reduce the surface tension of the culture medium to values lower than 32 mN/m, with efficiency for surface tension reduction more than 53% for the mineral medium supplemented with glucose and 37% for the YEPD broth, indicating the potential of these yeasts for the production biosurfactants. In sequence, the growth and the surface tension reduction profiles for selected *P. aphidis* strains selected were determineted in mineral medium containing different carbon sources, including cassava wastewater, glucose, soybean oil and oleic acid. In general, it was observed that the best growth profiles were obtained using hydrophobic carbon sources, with dry biomass values more than 15 g/L and of surface tension reduction less than 31 mN/m after 192 hours of cultivation. Based on the results of this step, the *P. aphidis* UFMG-Y3468 strain was considered the most promising because of their best ability for surface tension reduction and lower values of critical micelle concentration (CMC) on the different media tested. Considering the results mass spectrometry and nuclear magnetic resonance analysis, it was possible to identify a production of mannosylerythritol lipids (A, B and C) by *P. aphidis* UFMG-Y3468 strain when grown in mineral medium with glucose, soybean oil and oleic acid as carbon sources. In addition, for the first time was described the production of mannosylmannitol lipids (MML) by a of *P. aphidis* strain in culture medium containing oleic acid. The purified biosurfactants exhibited low values of critical micellar concentration (CMC) ranging from 0.96 mg/L to 3.65 mg/L, indicating their superior efficiency in relation to the reported values for synthetic surfactants. The hydrophilic and lipophilic balance (HLB) of purified biosurfactants determined by the Griffin's method rangend from 8,25 to 9,12, consistent with those reported in the literature for MELs and comparable to synthetic surfactants used in cosmetic formulations. In the last step of this work, three experimental designs were carried to study of influence and optimization of the carbon and nitrogen sources present in the culture medium for biosurfactant production by *P. aphidis* strain UFMG-Y3468, followed by the chemometric analysis of the data using the Principal Component Analysis (PCA) to identify the correlations between carbon and nitrogen sources and the produced MEL isoforms. In the final step of this thesis was possible to obtain five

statistically valid mathematical predictive models with coefficients of determination (R^2) between 80% and 96% and high values of F calculated in the Fisher test, besides proving the important role of the hydrophobic carbon source in the discrimination of assays with better biosurfactant production profile. Therefore, this work opens the way to further studies for biotechnological production of glycolipid biosurfactants, specifically lipid mannosylmitritol and mannosyl mannitol lipid using the *P. aphidis* UFMG-Y3468 strain as well as the potential applications of these compounds in cosmetics and food fields.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Biotecnologia para produção de metabólitos microbianos de interesse na indústria de alimentos.....	15
1.2 Biossurfactantes.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivos gerais	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Leveduras em biotecnologia.....	19
3.2 Leveduras da família <i>Ustilaginaceae</i> na produção de compostos de interesse industrial..	22
3.3 Compostos tensoativos: Surfactantes e biossurfactantes.....	25
3.3.1 Conceitos e aspectos gerais	25
3.3.2 Produção biotecnológica e potenciais aplicações dos biossurfactantes glicolipídicos	32
3.3.3 Leveduras da família <i>Ustilaginaceae</i> na produção biotecnológica de Manosileritritol lipídeos (MELs).....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Micro-organismos.....	41
4.2 <i>Screening</i> de leveduras produtoras de biossurfactantes	42
4.2.1 Meio de cultivo rico em nutrientes	43
4.2.2 Meio mineral com glicose	43
4.3 Estudo da aplicação de diferentes fontes de carbono para a produção de biossurfactantes	43
4.4 Extração e purificação dos biossurfactantes	44
4.4.1 Extração	44
4.4.2 Purificação	44
4.5 Análise estrutural dos biossurfactantes.....	45
4.5.1 Identificação dos biossurfactantes através de Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Electrospray</i> (ESI-MS)	45
4.5.2 Análise dos biossurfactantes através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	46
4.6 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)	46
4.7 Determinação do balanço hidrofílico-hidrofóbico (<i>Hydrophilic and lipophilic balance</i> , HLB) dos biossurfactantes purificados.....	46
4.8 Estudo da influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de MEL através de delineamento experimental e análise quimiométrica.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	50

5.1 <i>Screening</i> de leveduras produtoras de biossurfactantes	50
5.2 Estudo da aplicação de diferentes fontes de carbono para a produção de biossurfactantes por linhagens de <i>Pseudozyma aphidis</i>	54
5.3 Identificação dos biossurfactantes produzidos por <i>Pseudozyma aphidis</i> UFMG-Y3468 utilizando diferentes fontes de carbono	57
5.4 Purificação e caracterização dos biossurfactantes produzidos por <i>Pseudozyma aphidis</i> UFMG-Y3468 utilizando diferentes fontes de carbono	66
5.5 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) e Balanço Hidrofílico-lipofílico (<i>Hydrophilic and lipophilic balance</i> , HLB) dos biossurfactantes purificados.....	75
5.6 Estudo da influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de MEL através de delineamento experimental e análise quimiométrica.....	82
5.6.1 Influência da composição do meio de cultivo na produção de MELs por <i>P. aphidis</i> UFMG- Y3468 através de delineamento experimental	82
5.6.2 Influência do meio de cultivo na composição de isoformas de MELs por <i>P. aphidis</i> UFMG- Y3468 através de análise quimiométrica	103
6. CONCLUSÃO GERAL	111
7. REFERÊNCIAS	114
8. ANEXOS.....	141
8.1 Termo de Transferência de Material para aquisição das linhagens de leveduras.....	141
8.2 Artigos publicados.....	142
8.2.1 Artigo 1.....	142
8.2.2 Licença para uso do conteúdo do Artigo 1 na tese de doutorado	143
8.2.3 Artigo 2.....	145
8.2.2 Licença para uso do conteúdo do Artigo 2 na tese de doutorado	146

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Biotecnologia para produção de metabólitos microbianos de interesse na indústria de alimentos

O termo biotecnologia pode ser definido, segundo o artigo 2 do Decreto Legislativo nº2 de 1994, como sendo qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica (BRASIL, 1994). Como área científica, a biotecnologia se caracteriza pela inter- e multidisciplinaridade e pode ser subdividida em várias subáreas de acordo com a finalidade a que se dispõe, como por exemplo, a biotecnologia de alimentos. Historicamente, a biotecnologia de alimentos desenvolveu-se empiricamente desde a antiguidade, quando o homem estabeleceu o domínio sobre técnicas para a produção de alimentos fermentados, como cervejas, vinhos, queijos e pães (MOLINA et al., 2016). Para além desses produtos, atualmente a biotecnologia de alimentos pode englobar o estudo da produção e aplicação de diversos metabólitos microbianos que tenham algum propósito específico na indústria de alimentos.

O emprego dos processos biotecnológicos para a produção de compostos microbianos para a indústria de alimentos pode ser considerado uma alternativa sustentável uma vez que utilizam condições brandas, geram menor quantidade de resíduos quando comparados aos processos químicos tradicionais. Apesar das potencialidades e vantagens, essa vertente da biotecnologia ainda precisa de esforços em pesquisa e desenvolvimento para que a produção e inserção dos produtos no mercado seja considerada viável (NERI-NUMA et al., 2016; MOLINA & FANARO, 2016).

Diversos metabólitos microbianos podem ser utilizados na indústria de alimentos como ingredientes, por exemplo, enzimas, ácidos orgânicos, corantes e aromas. Em contrapartida, alguns metabólitos podem ser utilizados para fins específicos, podendo atuar como antimicrobianos (nisina), emulsificantes (exopolissacarídeos), edulcorantes (xilitol), prebióticos (oligossacarídeos) e tensoativos (biossurfactantes) (KHAN & OH, 2016; ZANNINI et al., 2016; NEHIR EL & SIMSEK, 2011; KIRAN et al., 2017).

Para que um composto venha a ser utilizado industrialmente, alguns fatores atinentes à sua produção biotecnológica devem ser considerados, como por exemplo, o micro-organismo capaz de produzir esse composto em condições controladas e viabilidade econômica em relação aos custos de produção e purificação. Assim, estudos que visem explorar o potencial

biotecnológico de novos micro-organismos para a produção de compostos de valor-agregado e com potencial aplicação industrial são promissores e importantes sob o ponto de vista biotecnológico.

1.2 Biossurfactantes

Surfactantes são compostos químicos anfifílicos com uma região hidrofílica, porção polar, e uma região hidrofóbica, porção apolar, em sua estrutura (FAN et al., 2017). Esses compostos são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial de sistemas bifásicos e multifásicos, compreendendo uma importante classe de produtos químicos com diferentes usos em vários setores industriais (GUDIÑA et al., 2015; BANAT, MAKKAR & CAMEOTRA, 2000).

A maioria dos surfactantes comercialmente disponíveis são sintéticos e produzidos a partir de derivados de petróleo (SILVA et al., 2014). Além disso, muitos estudos têm alertado sobre os problemas ambientais e toxicológicos relacionados a esses compostos, convergindo com a tendência de valorização dos compostos tensoativos naturais e demandas do mercado consumidor por produtos considerados ambientalmente seguros (LECHUGA et al., 2016; LIU et al., 2013; SANTOS et al., 2017).

Assim, nos últimos anos, houve o aumento do interesse em compostos com propriedades tensoativas que possuam características de baixa toxicidade, alta estabilidade e biodegradáveis, como os surfactantes naturais (PAULINO et al., 2016). Os surfactantes naturais são agentes tensoativos que podem ser produzidos por plantas (saponinas), animais (surfactante pulmonar e sais biliares) e micro-organismos (glicolipídeos e lipopeptídeos) (LANG et al., 1989; LUNA et al., 2011; CAMPOS et al., 2013).

Os biossurfactantes por sua vez compreendem um diversificado grupo de compostos anfifílicos produzidos por linhagens de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, que possuem propriedades tensoativas, podendo exibir ainda propriedades emulsionantes e biológicas (BANAT et al., 2014). Quando comparado com os tensoativos sintéticos, esses compostos apresentam algumas vantagens, como baixa toxicidade, alta estabilidade em diferentes faixas de pH, temperatura e salinidade, baixos valores de concentração micelar crítica (CMC), indicando que pequenas concentrações são requeridas para que o valor de tensão superficial mínimo seja obtido (VARVARESOU & IAKOVOU, 2015; SOBERÓN-CHAVEZ & MAIER, 2011). Dessa forma, esses compostos podem ser considerados potenciais aditivos

para a indústria de alimentos uma vez que podem atuar como agentes tensoativos, estabilizantes, emulsificantes ou até mesmo antimicrobianos e conservantes (CAMPOS et al., 2013).

Em termos práticos, alguns estudos sugeriram o uso dos biossurfactantes como promotores de formação ou de estabilização de emulsões alimentícias (maioneses), no controle da aglomeração de glóbulos de gordura, estabilização de sistemas aerados, e na melhoria das propriedades de textura e de cor de produtos assados, como produtos de confeitaria (GANDHI & SKEBBA, 2007; VAN HAESSENDONCK, & VANZEVEREN, 2004; MNIF & GHRIBI, 2016; CAMPOS et al., 2015; KIRAN et al., 2017).

Nesse contexto e considerando que muitos produtos requerem a adição de agentes conservantes, como antimicrobianos, alguns biossurfactantes, incluindo ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* sp. e surfactina produzida por *Bacillus* sp., podem surgir como uma atraente alternativa para esse fim. Esses compostos exibem propriedades antibacterianas, antiadesivas e antibiofilme contra variados micro-organismos patogênicos de interesse na indústria de alimentos, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* (RIVARDO et al., 2009; DO VALLE GOMES & NITSCHKE, 2012; ARAUJO et al., 2016).

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o potencial de leveduras da família *Ustilaginaceae* para a produção de biossurfactantes. Selecionar as linhagens com potencial de produção de biossurfactantes glicolipídicos, bem como definir a influência de diferentes fontes de carbono no perfil dos produtos obtidos.

2.2 Objetivos específicos

Estudo de *screening* de 34 linhagens de leveduras pertencentes à família *Ustilaginaceae*, incluindo gêneros *Pseudozyma* sp. e *Moesziomyces* sp., visando verificar o potencial de produção de biossurfactantes;

Estudar o perfil de crescimento e produção de biossurfactantes das linhagens promissoras em meio mínimo contendo diferentes fontes de carbono: glicose, manipueira, óleo de soja e ácido oleico;

Caracterizar através de Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) os biossurfactantes produzidos e correlacionar a influência da fonte de carbono na estrutura química dos compostos;

Determinar a concentração micelar crítica (CMC) e o balanço hidrofílico-hidrofóbico (HLB) dos biossurfactantes purificados;

Estudar os efeitos das fontes de carbono e de nitrogênio na produção de manosileritritol lipídeos utilizando ferramentas de planejamento experimental (Delineamento Composto Central Rotacional-DCCR) e de quimiometria (Análise de Componentes Principais-PCA analysis).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leveduras em biotecnologia

Leveduras compreendem um vasto e heterogêneo grupo de micro-organismos eucariotos pertencentes aos filos dos ascomicetos e basidiomicetos, amplamente utilizados em biotecnologia para diferentes propósitos (GIL-RODRÍGUEZ et al., 2015; KIELISZEK et al., 2017). Além disso, são consideradas a maior fonte de produtos biotecnológicos no mundo, exercendo grande importância econômica em vários setores industriais como alimentos, medicina e agricultura (JOHNSON, 2013a). Os primeiros relatos do uso desses micro-organismos na produção de alimentos fermentados datam de 7000 a.C, tendo reconhecido seu papel fundamental na produção de vinhos, cervejas e outros produtos fermentados em meados de 1845 por Louis Pasteur (PÉREZ-TORRADO et al., 2015).

A biotecnologia de leveduras pode englobar diferentes disciplinas e áreas, além daquelas relacionadas aos processos fermentativos tradicionais, como por exemplo, na expressão heteróloga de proteínas, biocontrole, biorremediação, produção de ingredientes como enzimas, aromas, aminoácidos e ácidos orgânicos, assim como biocatalisadores para a produção de fármacos (Figura 1) (JOHNSON, 2013b).

Entre as espécies e gêneros dos ascomicetos com importância biotecnológica destacam-se *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Yarrowia lipolytica*, *Candida* spp., *Hansenula* spp., *Lipomyces* spp. e *Pichia* spp., respectivamente (JOHNSON, 2013b). Enquanto que os principais gêneros e espécies do grupo dos basidiomicetos com importância em processos biotecnológicos são *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Rhodosporidium* spp., *Trichosporon* spp., *Pseudozyma* spp. e leveduras relacionadas, bem como *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Phaffia rhodozyma*, (JOHNSON, 2013a).

Em termos práticos, observa-se um diversificado conjunto de produtos obtidos por via biotecnológica utilizando ascomicetos. Além da grande variedade de aplicações para a clássica representante desse grupo, *S. cerevisiae*, outras espécies merecem destaque. Leveduras do gênero *Candida* sp. são reconhecidas pelo seu grande potencial na produção de açúcares, lipases, etanol, biossurfactantes, entre outros (KIELISZEK et al., 2017).

Diversos estudos têm reportado a produção de elevadas concentrações de xilitol, um poliol de baixa caloria e com propriedades cariostáticas, por espécies de *Candida* sp., utilizando substratos de baixo custo. Recentemente, Hernández-Pérez e colaboradores (2016) demonstraram a capacidade de uma linhagem de *C. guilliermondii* FTI 20037 em produzir em torno de 32 a 36 g/L de xilitol utilizando hidrolisado de cana de açúcar como substrato. Maiores valores de concentração foram reportados por Eryasar e Karasu-Yalcin (2016) para uma linhagem de *C. tropicalis* utilizando xilose como substrato, onde, aproximadamente 83 g/L de xilitol foram obtidos. Esses valores são extremamente atraentes sob o ponto de vista industrial considerando as altas produtividades alcançadas utilizando substratos de baixo custo. Além disso, estudos prévios também utilizando xilose como substrato reportaram concentrações ainda mais elevadas, em torno de 189 e 256,5 g/L de xilitol utilizando espécies de *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. athensensis* SB18, respectivamente (CHOI et al., 2000; ZHANG et al., 2012).

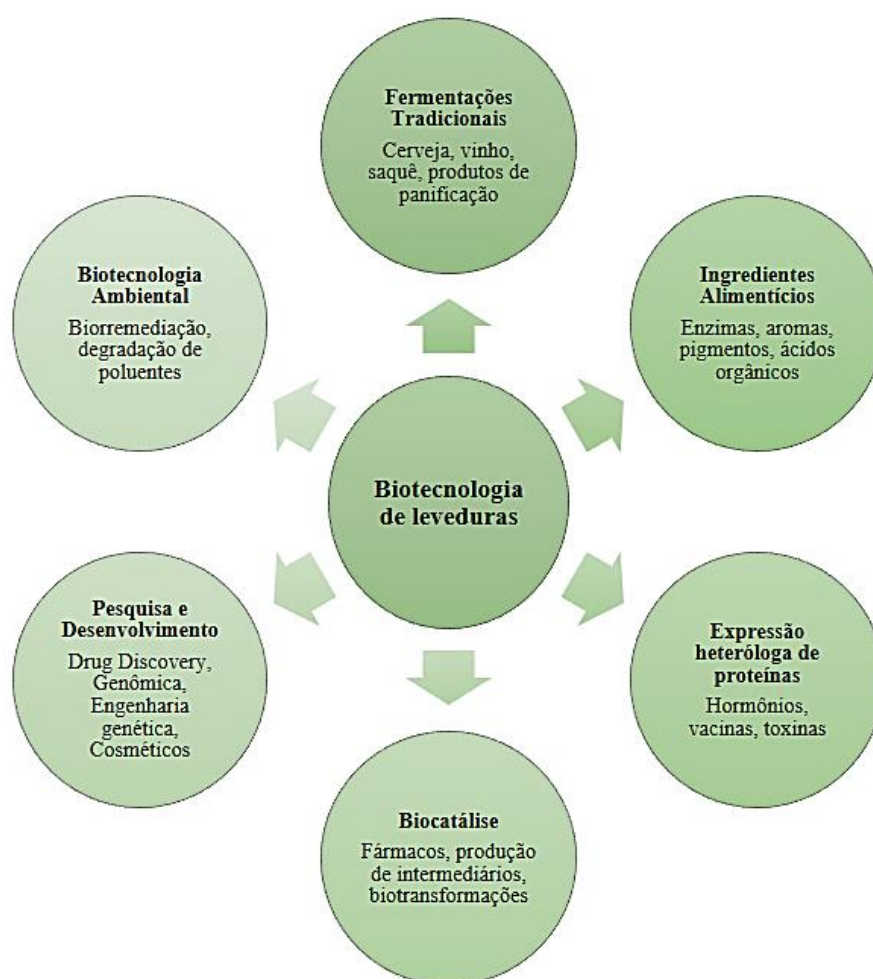


Figura 1. Diferentes áreas de aplicação da biotecnologia de leveduras. Adaptado de Johnson, (2013b).

Outros produtos de interesse industrial produzidos por ascomicetos incluem etanol, aromas e enzimas, sendo que recentemente tem sido reportada a eficiência de espécies de *Kluyveromyces* sp. para esse propósito. Nesse contexto, Wu e colaboradores (2016) descreveram uma alta produção de etanol por *K. marxianus* K21, atingindo uma concentração máxima de aproximadamente 49 g/L de etanol após 22 horas de cultivo utilizando glicose obtida após liquefação e sacarificação de resíduo de inhame-branco (*Colocasia esculenta*) como substrato. Já no estudo desenvolvido por Martínez e colaboradores (2017), foi observada a produção de compostos de aroma (álcoois e ésteres) por uma linhagem de *K. marxianus* utilizando melaço de cana de açúcar e beterraba como substratos via fermentação em estado sólido. Em termos quantitativos, nesse estudo foram produzidos 161 mg de compostos voláteis totais por grama de sólidos totais inicial. Entre as enzimas que podem ser obtidas em processos fermentativos por linhagens de *Kluyveromyces* sp., vale destacar a produção de inulinase, lactase e β -galactosidase por linhagens de *K. marxianus* e *K. lactis*, especialmente importantes em etapas de processamento na indústria de alimentos e produção de açúcares funcionais (GAO et al., 2017; YOU et al., 2017; SPOHNER et al., 2016).

Diferentes gêneros de leveduras pertencentes ao grupo dos basidiomicetos são reconhecidos pela sua capacidade de produzir de uma variedade de enzimas de interesse industrial, incluindo lipases, fenilalanina amônia liase, lactamase, aldeído redutase, flavoproteína mono-oxigenases, beta-glicosidase, xilanase, epóxido hidrolase e cutinase, que podem ser utilizadas na indústria de aromas, alimentos e farmacêutica (JOHNSON, 2013a).

Outra característica marcante de alguns gêneros desse grupo de micro-organismos é a capacidade de acúmulo de grandes quantidades de lipídeos, sendo muitas espécies denominadas como leveduras oleaginosas, por exemplo, linhagens do gênero *Rhodotorula* sp., *Sporobolomyces* sp. e *Cryptococcus* sp. A produção de lipídeos microbianos por linhagens de *Cryptococcus* sp. utilizando variados substratos é ainda hoje alvo de diversos estudos (LIU et al., 2017; PARK et al., 2017). Foi reportada recentemente a produção de altas quantidades de biomassa celular e concentração de lipídeos por uma linhagem de *C. curvatus* ATCC 20509, em torno de 8,7 e 4,9 g/L, respectivamente, utilizando 30 g/L de ácido acético como única fonte de carbono (LIU et al., 2017). Esses valores foram inferiores aos obtidos no estudo de otimização desenvolvido por Enshaeieh e colaboradores (2017), em que foi observada uma produção de 6,75 g/L de lipídeos e 12,7 g/L de biomassa celular para uma linhagem de *C. heimaeyensis* utilizando glicose como fonte de carbono. Resultados similares, 6,34 g/L de

lipídeos e 13,68 g/L de biomassa, foram reportados por Deeba e colaboradores (2017) quando hidrolisado de casca de amendoim foi utilizado como substrato em um processo conduzido com uma linhagem de *C. psychrotolerans*.

Entre os basidiomicetos, aqueles pertencentes ao gênero *Pseudozyma* sp. e espécies relacionadas, têm recebido grande atenção nos últimos anos devido à sua capacidade de produzir vários compostos de valor agregado. Esses micro-organismos, pertencentes à família *Ustilaginaceae*, são utilizados em processos biotecnológicos para produção de biossurfactantes glicolipídicos, enzimas, ácidos orgânicos e oligossacarídeos, principalmente (PAULINO et al., 2017). Além disso, é notável a viabilidade da aplicação de substratos de baixo custo, como resíduos lignocelulósicos e sub-produtos da cadeia de processamento de alimentos, em bioprocessos com essas leveduras, tornando necessária assim, uma abordagem pormenorizada desse grupo em um novo tópico.

3.2 Leveduras da família *Ustilaginaceae* na produção de compostos de interesse industrial

Ustilaginaceae é uma família de leveduras pertencentes ao subfiló *Ustilaginomycotina*, o qual está inserido no grupo *Basidiomycota* do reino *Fungi*. Esses micro-organismos exibem uma grande diversidade morfológica e englobam inúmeros gêneros de importância biotecnológica (BEGEROW et al., 2014; PAULINO et al., 2107). Além disso, esses basidiomicetos têm sofrido inúmeras reclassificações taxonômicas nos últimos anos o que tem tornado frequente a descrição de novos gêneros e classes (WANG et al., 2014; WANG et al., 2015). Pode-se citar, por exemplo, a linhagem descrita como *Pseudozyma brasiliensis*, reconhecida produtora de endoxilânase, que foi recentemente reclassificada como *Kalmonozyma brasiliensis* (OLIVEIRA et al., 2014; WANG et al., 2015). Similarmente, o mesmo processo de reclassificação ocorreu para a linhagem produtora de biossurfactantes, *Pseudozyma churashimaensis* que foi renomeada para *Dirkmeia churashimaensis* (MORITA et al., 2011a; WANG et al., 2015). Apesar dessas mudanças em termos taxonômicos, o potencial biotecnológico dessas leveduras tem atraído o interesse de inúmeros grupos de pesquisa nos últimos anos.

Dentre os compostos de valor agregado que podem ser produzidos por espécies do gênero *Pseudozyma* sp. e outras leveduras da família *Ustilaginaceae*, merecem destaque os ácidos orgânicos (málico, succínico, itatartárico e ácido itacônico), polióis (eritritol e manitol), oligossacarídeos, enzimas (CAZymes, lipases, xilanases, aminopeptidases), esqualeno, lipídeos

(ácidos graxos, triacilglicerol-TAG) e biossurfactantes (manosileritritol lipídeos e celobiose lipídeos) (Figura 2) (FELDBRÜGGE, et al., 2013; ZAMBANINI et al., 2017; JEYA et al., 2009; FAI et al., 2015; CHANG et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014; KAUPERT NETO et al., 2016; MORITA et al. 2011).

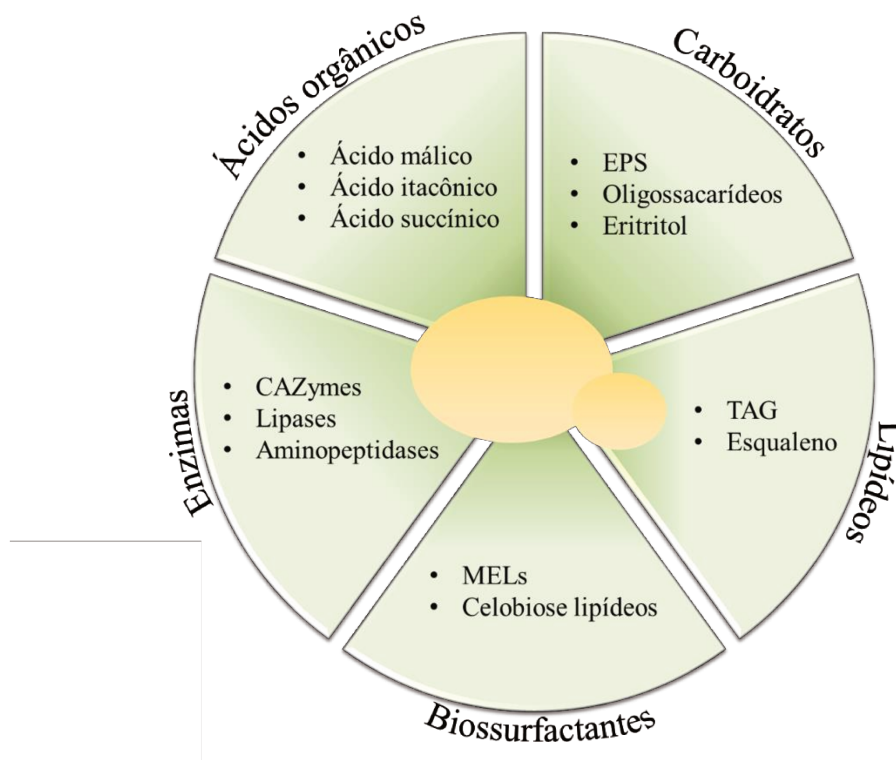


Figura 2. Compostos de valor agregado que podem ser produzidos por leveduras da família *Ustilaginaceae* (adaptado de PAULINO et al., 2017).

Recentes estudos descreveram a obtenção de diferentes enzimas utilizando leveduras da família *Ustilaginaceae*, como xilanases produzidas por linhagens de *K. brasiliensis* e *Moezyomices antarcticus*, hialuronidase por linhagens de *M. aphidis*, aminopeptidase por *P. hubeiensis*, cutinases e lipases por *M. antarcticus* (KAUPERT NETO et al., 2016; WATANABE et al., 2015; SMIRNOU et al., 2015; ISSHIKI et al., 2017; SHINOZAKI et al., 2013; JAN et al., 2016). Essas enzimas podem ser aplicadas em diversos processos, como na degradação de biomassa lignocelulósica, na indústria de cosméticos, produção de biodiesel ou na indústria de alimentos.

Do ponto de vista industrial, destacam-se trabalhos recentes sobre processos biotecnológicos para a produção de eritritol e oligossacarídeos por leveduras do gênero *Pseudozyma* sp., alcançando elevadas concentrações e utilizando substratos de baixo custo. Em

estudo desenvolvido por Fai e colaboradores (2015) com uma linhagem de *P. tsukubaensis*, cerca de 73,7 g/L de galacto-oligossacarídeos (GOS) foram produzidos após 24 horas de processo utilizando um meio de cultivo com lactose como fonte de carbono. Utilizando uma linhagem da mesma espécie e um meio de cultivo com 400 g/L de glicose como substrato, Jeya e colaboradores (2009) alcançaram uma produção de 240 g/L de eritritol quando realizados experimentos em escala piloto.

Outra tendência no estudo de leveduras da família *Ustilaginaceae* está baseada na existência de algumas espécies com potencial para o acúmulo de lipídeos, sendo descritos processos com interessantes resultados em termos quantitativos. Takakuwa e colaboradores (2013) verificaram a capacidade da linhagem de *Pseudozyma* sp. TYC-2187 em produzir 15,7 g/L de triacilgliceróis (TAG) após 48 horas de processo utilizando glicerol e extrato de levedura como substratos. Posteriormente, foi descrita a produção de 5,72 g/L de lipídeos totais pela linhagem de *P. parantarctica* CHC28 após 5 dias de fermentação (AREESIRISUK et al., 2015).

A produção de ácidos orgânicos também constitui uma abordagem biotecnológica importante para as leveduras do gênero *Pseudozyma* sp. e *Ustilago* sp. (ZAMBANINI et al., 2016a). Entre os ácidos orgânicos de interesse industrial produzidos por esses micro-organismos, há estudos relatando a produção de ácido málico por espécies de *U. maydis*, *U. trichophora* e *U. cynodontis* (GUEVARRA & TABUCHI, 1990; GEISER et al., 2014; ZAMBANINI et al., 2016a). Recentemente, uma elevada produção de ácido málico foi reportada por Zambanini e colaboradores (2016b) em que 200 g/L desse ácido foram obtidos quando a linhagem de *U. trichophora* TZ1 foi cultivada com glicerol como fonte de carbono. A produção de outros ácidos, como succínico e itatartárico, também foi reportada utilizando leveduras da família *Ustilaginaceae* mas, nos últimos anos, especial destaque foi dado ao estudo de processos para a produção de ácido itacônico (ZAMBANINI et al., 2017).

O ácido itacônico, também chamado de ácido metilsuccínico, é considerado um importante *building block* para a indústria química devido às suas características estruturais, como a presença de dois grupos carboxílicos e uma dupla ligação α,β -insaturada, que constituem centros reativos para um grande número de transformações químicas (ROBERT & FRIEBEL, 2016; SAHA, 2017). Essas características têm feito com que esse ácido seja considerado uma alternativa para *building blocks* derivados de petróleo, como o ácido metacrílico e ácido acrílico, para a produção de polimetil acrilatos, bio-based metil ésteres, elastômeros e poli-ésteres (ROBERT & FRIEBEL, 2016; RAMOS et al., 2016). Assim, o

desenvolvimento de bioprocessos para a produção de ácido itacônico tem sido considerado uma importante vertente na área de biotecnologia e abordagens utilizando leveduras da família *Ustilaginaceae* são consideradas promissoras.

Nesse contexto, foi reportada a produção de 44,5 g/L de ácido itacônico utilizando 200 g/L de glicose como fonte de carbono por uma linhagem de *U. maydis* em processo fermentativo com controle de pH (MAASEN et al., 2014). Anteriormente, a produção desse ácido foi descrita utilizando linhagens de *U. maydis* (53 g/L) e *P. antartica* (30 g/L) (GUEVARRA & TABUCGI et al., 1990; LEVINSON et al., 2006).

Apesar da variedade de compostos produzidos por leveduras da família *Ustilaginaceae*, os biossurfactantes são aqueles com maior relevância e que tem atraído a atenção da comunidade científica ao longo dos anos (PAULINO et al., 2017). Assim, esses compostos serão discutidos de forma mais detalha no próximo tópico.

3.3 Compostos tensoativos: Surfactantes e biossurfactantes

3.3.1 Conceitos e aspectos gerais

O termo surfactante vem da contração entre “surface-active agent” e se refere a moléculas que possuem uma estrutura anfifílica baseada em dois domínios com diferentes polaridades, também denominados de tensoativos, que conferem a esses compostos propriedades típicas como capacidade de diminuição da tensão superficial de sistemas aquosos e capacidade de auto-organização em estruturas supramoleculares (BENEITO-CAMBRA et al., 2013; MANAARGADOO-CATIN et al., 2016).

Quando os tensoativos se concentram na superfície livre de líquidos e nas interfaces entre líquidos imiscíveis ou em outros sistemas bifásicos (ar-líquido, sólido-líquido), a tensão superficial do líquido pode ser reduzida (GUAN et al., 2017). Quando atingem uma concentração superior a necessária para saturar a superfície de um líquido esses compostos tendem a formar sistemas organizados denominados micelas, atingindo o que se conhece como concentração micelar crítica (CMC) (VISHNYAKOV et al., 2013). Após atingir esse ponto, o comportamento do composto tensoativo, especialmente em relação a capacidade de reduzir a tensão superficial, estabiliza e se mantém constante mesmo com o aumento da concentração do surfactante em solução (HIEMENZ & RAJAGOPALAN, 1997). Além disso, as propriedades de molhabilidade, poder de dispersão, detergência e solubilização são influenciadas pelas

mudanças na tensão superficial, sendo essas mais acentuadas para compostos tensoativos capazes de reduzir a tensão superficial de forma mais efetiva (OLKOWSKA et al., 2011).

Os surfactantes são categorizados tradicionalmente em quatro classes dependendo da carga global presente em sua estrutura ou na polaridade do domínio polar hidrofílico (YEH et al., 2005). Essas classes incluem (i) não-iônicos, (ii) aniônicos, (iii) catiônicos, e (iv) zwitteriônicos, cada uma compreendendo compostos com diferentes estruturas químicas (MISHRA et al., 2009) (Figura 3). Esses compostos possuem diversas aplicações em setores de importância econômica, como na indústria de petróleo, alimentos, farmacêutica, cosméticos, bem como na área ambiental onde são utilizados na remediação de solos contaminados com poluentes hidrofóbicos e no tratamento de águas residuais em que a matéria orgânica apresenta diversos contaminantes tóxicos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pigmentos, metais pesados, antibióticos e pesticidas (MANAARGADOO-CATIN et al., 2016; MAO et al., 2015; GUAN et al., 2017; NEGIN et al., 2017).

Os surfactantes podem ser utilizados como emulsificantes, estabilizantes ou detergentes em formulações tópicas de produtos farmacêuticos e cosméticos, sendo considerados essenciais nesses produtos. Entretanto, alguns podem estar associados com reações cutâneas, como dermatite de contato, e na ocorrência de reações inflamatórias e alérgicas (LÉMERY et al., 2015).

As características de toxicidade dos surfactantes em relação à pele são variáveis, sendo alguns com forte potencial irritante, por exemplo os catiônicos, enquanto outros, denominados como suaves ou “mild surfactants”, considerados compatíveis e menos danosos para as células epiteliais (IMOKAWA, 1997). Além disso, alguns autores sugerem que as moléculas de tensoativo envolvidas nos fenômenos de irritação da pele são as livres e não aquelas moléculas envolvidas na estrutura micelar, uma vez que as primeiras são capazes de interagir mais fortemente com as proteínas do extrato córneo, fortalecendo a hipótese de que a toxicidade de surfactantes esteja relacionada tanto com as suas características de auto-montagem quanto com a sua CMC, sendo os surfactantes com maiores valores de CMC, por exemplo os lauril sulfatos, considerados mais irritantes para a pele (CORAZZA et al., 2009). Adicionalmente, alguns surfactantes apresentam propriedades hidratantes devido a sua capacidade de complementar a falta de lipídeos endógenos do estrato córneo e de retenção de moléculas de água nessa camada (FRIBERG, 1990).

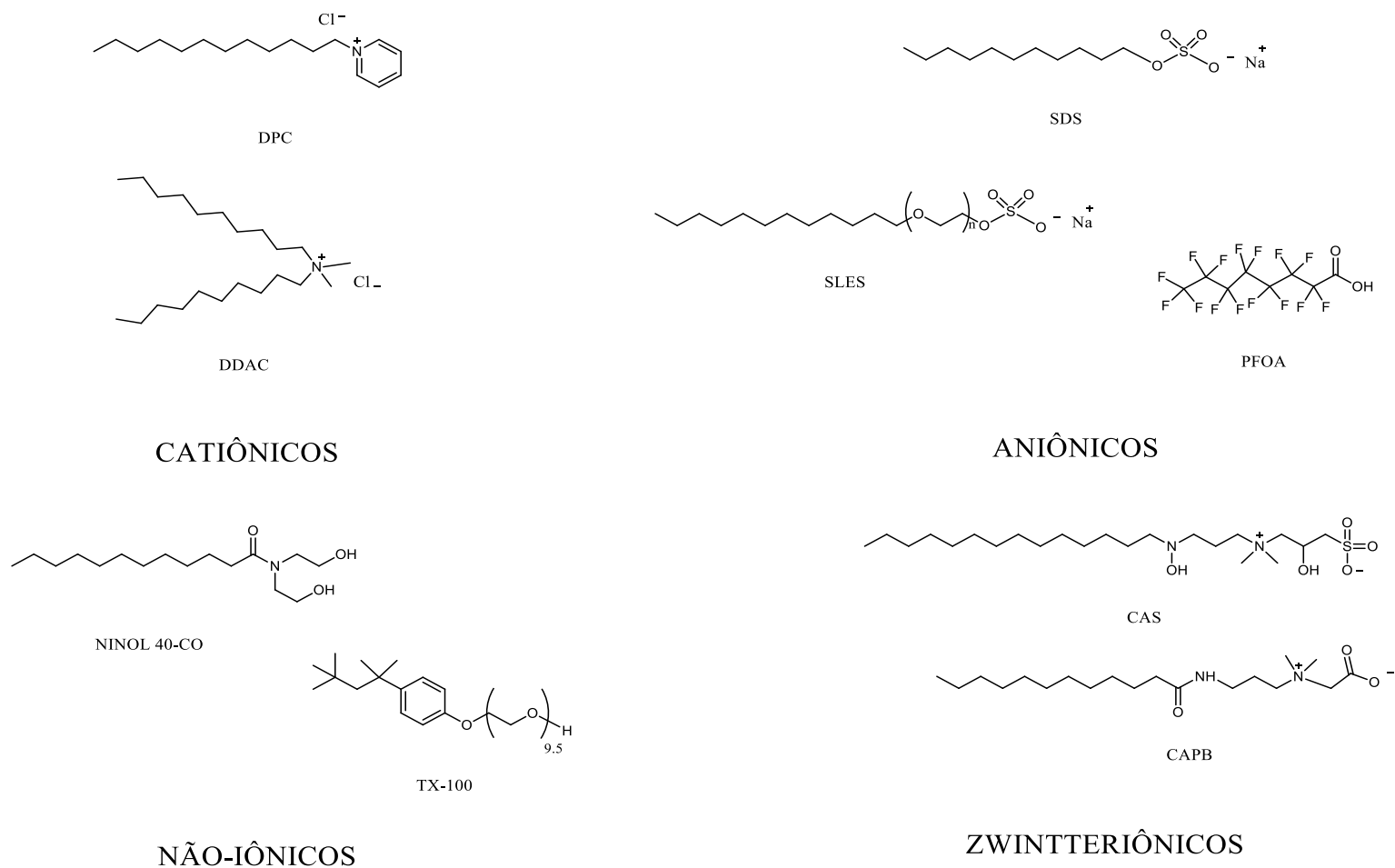


Figura 3. Estruturas químicas de tensoativos sintéticos de diferentes grupos (catiônico, aniônico, não-iônico e zwitteriônico) comercialmente disponíveis. DPC: 1-dodecylpyridinium chloride; DDAC: didecyl dimethyl ammonium chloride; TX-100: *p*-tertiary-octylphenoxy polyethyl alcohol; PFOA: perfluorooctanoic acid; CAPB: Coconaut amide propyl betaine; SLES: sodium laureth sulfate; SDS: sodium dodecyl sulfate; CAS: cocamidopropyl hydroxysultaine; NINOL-40: cocamide DEA;

Além disso, a maioria dos tensoativos comercialmente disponíveis são de origem sintética e alguns desses, como derivados de azul de metileno e nonifenol polietoxilato, estão associados com problemas ecológicos, sendo considerados como nocivos ao meio ambiente devido a sua baixa biodegradabilidade que pode favorecer sua persistência e toxicidade (JIANG et al., 2012). Assim, existe atualmente a demanda por estudos para o desenvolvimento de tensoativos eficientes em termos de propriedades superficiais e com características mais vantajosas em termos de segurança e sustentabilidade.

Os biossurfactantes compreendem um diversificado grupo de compostos anfifílicos produzidos por linhagens de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, que possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos ou de sistemas bifásicos (CAMEOTRA & MAKKAR, 2010; BANAT et al., 2014). Além disso, esses compostos podem exibir pronunciada capacidade emulsificante e até mesmo interessantes propriedades biológicas, tornando crescente o estudo desses compostos em diferentes campos, incluindo alimentos, cosméticos, fármacos, biorremediação, química ambiental, entre outros (PAULINO et al., 2016). Quando comparado com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam importantes vantagens, como baixos valores de CMC, sendo necessárias pequenas concentrações para que o efeito redutor de tensão superficial se manifeste, além da baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e estabilidade em diferentes condições de temperatura, pH e força iônica (VARVARESOU & IAKOVOU, 2015; SOBERÓN-CHÁVEZ & MAIER, 2011).

Tradicionalmente, os biossurfactantes de origem microbiana têm sido classificados em dois grupos: os biossurfactantes de baixo peso molecular (1-2 KDa) e biossurfactantes de alto peso molecular (> 1 MDa) (DAS et al., 2010; GUDIÑA et al., 2013). Os biossurfactantes de alto peso molecular são considerados eficientes agentes emulsificantes e muitos estudos tem explorado o potencial biotecnológico de vários micro-organismos para a produção desse grupo de compostos (LUNA et al., 2011; MARKANDE et al., 2013). Entretanto, os biossurfactantes de baixo peso molecular são os de maior importância em termos de aplicações, sendo subdivididos em dois subgrupos principais que incluem os glicolipídeos e os lipopeptídeos (PAULINO et al., 2016) (Figura 4).

Entre os biossurfactantes glicolipídicos quatro famílias principais podem ser citadas: ramnolipídeos, soforolipídeos, manosileritritol lipídeos e trealose lipídeos, sendo estas as que possuem maior número de estudos. Estruturalmente esses biossurfactantes são

compostos por uma porção hidrofílica baseada em um resíduo de açúcar (ramnose, sofrorose, celobiose, trealose ou manosilerritritol) ligada a uma ou mais cadeias de ácidos graxos que consistem na porção hidrofóbica da molécula (PAULINO et al., 2016). Em contrapartida, os lipopeptídeos possuem como porção hidrofílica uma região composta por peptídeos com diferentes combinações de aminoácidos, covalentemente ligada a região hidrofóbica que também se baseia em uma cadeia alquílica. Já as famílias mais importantes do grupo de biossurfactantes lipopeptídicos são as surfactinas, fengicinas e iturinas (JACQUES, 2011).

Os ramnolipídeos são glicolipídeos que possuem uma ou duas moléculas de L-ramnose ligadas a uma cadeia hidrofóbica de um ácido graxo saturado ou insaturado (DESAI & BANAT 1997; REZANKA et al., 2011; GUDIÑA et al., 2015). Esses compostos são geralmente produzidos por espécies do gênero *Pseudomonas* mas alguns estudos têm mostrado a produção desses biossurfactantes por outros micro-organismos como *Burkholderia* sp., *Myxococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudoxanthomonas* sp., *Acinetobacter* sp., e recentemente linhagens de *Streptomyces* sp. (ANDRÄ et al., 2006; OHLENDORF et al., 2009; ROONEY et al., 2009; NAYAK et al. 2009; ČEJKOVÁ et al., 2014; CHEN et al., 2012; YAN et al., 2014).

A principal desvantagem associada a esse grupo de glicolipídeos está relacionada à patogenicidade das espécies produtoras. Entretanto, a produção de ramnolipídeos por linhagens não patogênicas tem surgido como uma atraente possibilidade e alguns estudos nessa perspectiva descreveram a capacidade de produção desses biossurfactantes utilizando espécies de *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* e *Burkholderia thailandensis* (WITTGENS et al., 2011; HOŠKOVÁ et al., 2013; DÍAZ DE RIENZO, KAMALANATHAN & MARTIN, 2016; FUNSTON et al., 2016).

Em relação às suas características tensoativas, os ramnolipídeos são considerados potentes biossurfactantes, principalmente devido a sua capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores menores que 31 mN/m e com valores de CMC variando entre 20 a 225 mg/L (SYLDATK et al., 1985; NITSCHKE et al., 2005; DUBEAU et al., 2009). A variabilidade nos valores de CMC e de redução de tensão superficial dos ramnolipídeos podem estar associadas ao tipo de processo de fermentação ou de purificação adotados, que interferem na composição global das isoformas presentes no biossurfactante bruto ou semi-purificado obtido, e por consequência, nas suas atividades tensoativas (PAULINO et al., 2016).

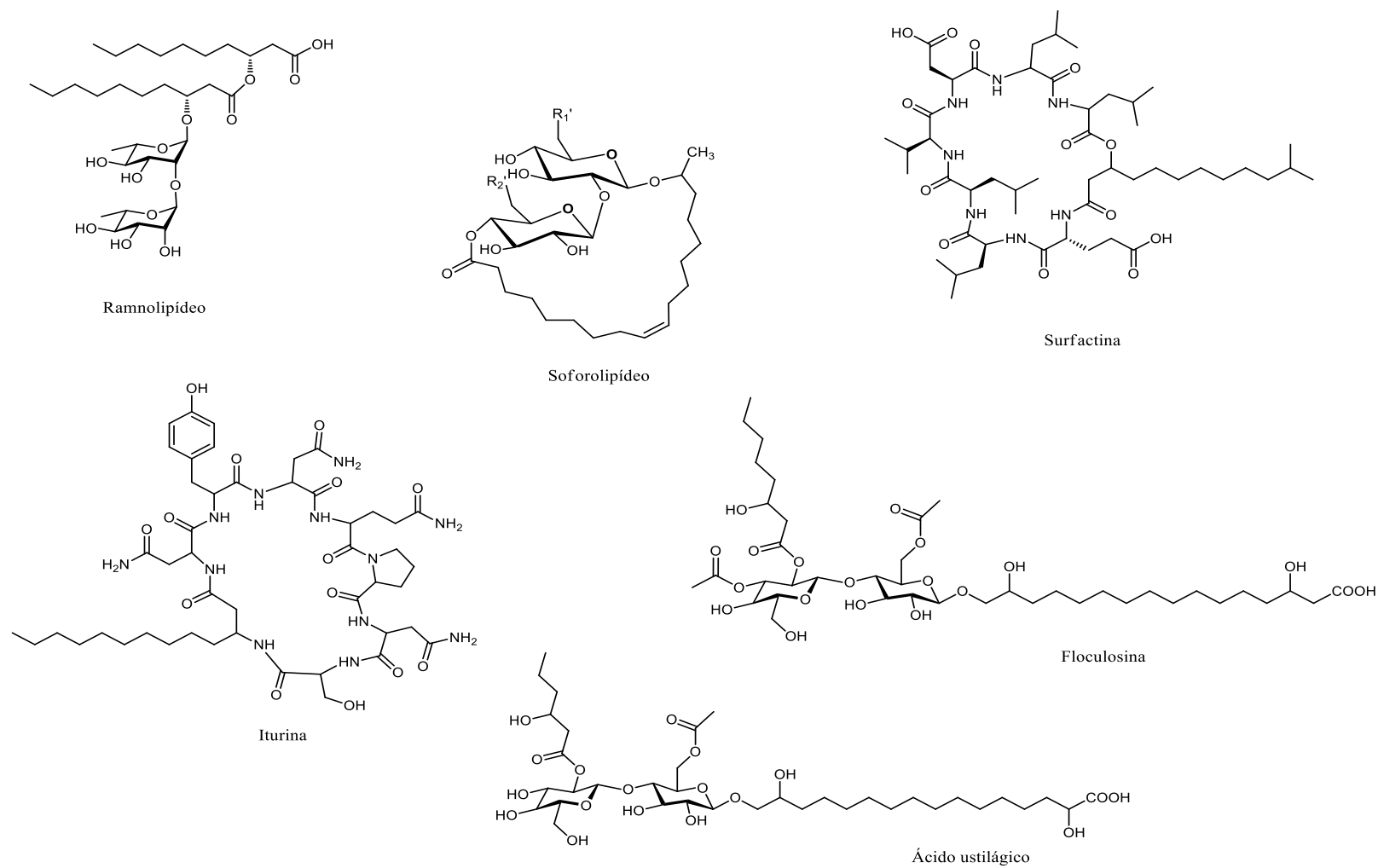


Figura 4. Estruturas químicas de alguns biossurfactantes de baixo peso molecular de interesse biotecnológico produzidos por micro-organismos.

Soforolipídeos são biossurfactantes geralmente produzidos por leveduras, incluindo *Candida bombicola*, *Candida albicans*, *Candida floricola*, *Cryptococcus* sp., *Wickerhamiella domercqiae*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula bogoriensis*, entre outras. Estruturalmente, consistem em uma soforose, dois resíduos de glicose ligados por uma ligação glicosídica β -1,2, como porção hidrofílica e uma cadeia carbônica oriunda de um ácido graxo (HIRATA et al., 2009; YANG et al., 2012; HU & JU 2001; MA et al., 2012; KONISHI et al., 2015; IMURA et al., 2010; BASAK et al., 2014). Esses glicolipídeos são capazes de reduzir a tensão superficial da água para valores em torno de 40 a 24 mN/m, com valores de CMC variando de 0,68 até 100 mg/L (VAN BOGAERT et al., 2011; DENGLE-PULATE et al., 2013).

Em contraste com os ramnolipídeos, os soforolipídeos são normalmente produzidos por linhagens não patogênicas de micro-organismos e em altas concentrações, tornando o desenvolvimento de processos em larga escala desse biossurfactante mais vantajoso quando se considera os aspectos de produtividade e segurança, desejáveis para todo processo biotecnológico de produção de metabólitos microbianos (PAULINO et al., 2016).

Assim como outros biossurfactantes de baixo peso molecular, os soforolipídeos são sintetizados como uma mistura de diferentes isoformas, sendo subdivididos em dois grupos principais, incluindo soforolipídeos ácidos e soforolipídeos lactônicos. Além disso, esses compostos podem conter grupos acetilas no resíduo de soforose, aumentando ainda mais as possibilidades em termos de diversidade estrutural e tornando variável suas propriedades físico-químicas e biológicas (ASMER et al., 1988; DESPANDE & DANIELS, 1995; VAN BOGAERT et al., 2011). Além disso, as características estruturais (número de carbonos, presença ou ausência de insaturações e hidroxilação) da cadeia carbônica de ácido graxo da porção hidrofóbica dos soforolipídeos e de outros glicolipídeos podem variar dependendo do substrato utilizado como fonte de carbono no processo biotecnológico (SHIN et al., 2010; DÍAZ DE RIENZO et al., 2015).

Os trealose lipídeos são os glicolipídeos produzidos por diversas linhagens bacterianas, membros da ordem dos Actinomycetales, como *Mycobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Nocardia* sp., *Gordonia* sp., *Dietzia* sp., *Tsukamurella* sp., *Skermania* sp., *Williamsia* sp., *Corynebacterium* sp., *Brevibacteria* sp., *Arthrobacter* sp., *Rhodococcus* sp., sendo também reportada a produção por algumas linhagens de leveduras e fungos (SHAO, 2011; LANG & PHILP, 1998).

Em termos estruturais, os trealose lipídeos possuem como resíduo hidrofílico uma molécula de trealose, formada por duas unidades de glicose ligadas através de uma ligação α , α -1, 1-glicosídica, e uma porção hidrofóbica representada por cadeias de ácidos graxos como ácido succínico, octanóico, decanóico e ácidos micólicos (ASSELINEAU & ASSELINEAU, 1978; PETRIKOV et al., 2013; FRANZETTI et al., 2010).

Assim como outros biossurfactantes de baixo peso molecular, os trealose lipídeos possuem uma grande variedade de tipos e isoformas, sendo os mais conhecidos os trealose lipídeos monomicolatos, trealose lipídeos dimicolatos, trealose lipídeos trimicolatos, derivados acilados não iônicos, trealose lipídeos tetra-ésteres aniônicos e succinil trealose lipídeos (KUYUKINA & IVSHINA, 2010; KÜGLER et al., 2014). Entre esses, o trealose lipídeo mais conhecido é o 6,6'-trealose lipídeo dimicolato, também denominado “fator-corda”, formado por dois ácidos micólicos de número variável de carbonos esterificado com o grupo 6-hidroxil de cada glicose, sendo reconhecido como o glicolipídeo micobacteriano marcador de patogenicidade de várias linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* (ISHIKAWA et al., 2009; SHAO, 2011; SUTCLIFFE, 1998; RYLL et al., 2001; WELSH et al., 2013). Devido à diversidade estrutural, os trealose lipídeos possuem diferentes propriedades tensoativas, sendo reportado a capacidade de redução da tensão superficial da água para valores entre 43 e 24,1 mN/m e exibindo valores de CMC de 0,7 até 37 mg/L (YAKIMOV et al., 1999; TULEVA et al., 2009; MARQUÉS et al., 2009).

Outra família de glicolipídeos que tem atraído a atenção nos últimos anos devido às suas potenciais aplicações é a de manosileritritol lipídeos. Assim, as informações sobre esses biossurfactantes serão discutidos posteriormente em um tópico específico.

3.3.2 Produção biotecnológica e potenciais aplicações dos biossurfactantes glicolipídicos

O maior desafio para a inserção dos biossurfactantes no mercado está relacionado aos custos envolvidos com sua produção e purificação. Em muitos bioprocessos, o custo da etapa de *downstream*, que inclui a recuperação e purificação dos produtos, compreende 60-70% do custo total, tornando alguns processos impraticáveis economicamente (ZEIKUS et al., 1999). No contexto dos biossurfactantes, estima-se que o custo das matérias-primas aplicadas aos processos de produção gire em torno de 30% do custo total (MULLIGAN & GIBBS, 1993). Para contornar esses obstáculos, muitos autores sugerem o uso de substratos de baixo custo, como resíduos e sub-produtos agroindustriais, além da identificação e otimização das melhores

condições de cultivo e de nutrientes do processo biotecnológico de produção de biossurfactantes (PAULINO et al., 2016; MUKHERJEE et al., 2006; SANTOS et al., 2014; FAI et al., 2015; MOUAFI et al., 2016; DEEPIKA et al., 2016).

Vários tipos de planejamento experimental podem ser aplicados para o *screening* das variáveis estatisticamente significativas e/ou otimização dos parâmetros do processo fermentativo de produção de biossurfactantes, entre eles destacam-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), planejamento Fatorial Fracionado, Taguchi design, Box–Behnken design e Plackett-Burman (NALINI & PARTHASARATHI, 2017; OHADI et al., 2017; WEI et al., 2007; ALI RAZA et al., 2014; RANE et al., 2017). Essas estratégias são vantajosas pois possibilitam avaliar a influência de diversas variáveis associadas ao meio de cultivo e ao processo fermentativo de forma simultânea, além de permitir conhecer o impacto desses parâmetros sobre a concentração de biossurfactante produzido.

Portanto, o uso de ferramentas estatísticas de planejamento experimental pode ser considerado uma importante estratégia para otimizar e avaliar o desempenho de processos de produção de biossurfactantes, visando minimizar os custos de produção e aumento da eficiência em termos de rendimento e produtividade (PAULINO et al., 2016). Nesse contexto, nos últimos anos observou-se o aumento na utilização dessas abordagens nos processos biotecnológicos de produção de biossurfactantes glicolipídicos, principalmente ramnolipídeos.

Em estudo realizado por Pereira e colaboradores (2013), um DCCR de 2 variáveis foi utilizado para avaliar os efeitos da concentração de glicerol como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio na produção de ramnolipídeos. As melhores concentrações de biossurfactante obtidas foram de 2,75-3,88 g/L utilizando a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 após 120 horas de processo. Recentemente, após utilizar um delineamento do tipo Box–Behnken, Deepika e colaboradores (2016) alcançaram uma concentração de 5,9 g/L de ramnolipídeos após 48 horas de processo utilizando a linhagem de *P. aeruginosa* KVD-HR42 e óleo de sementes de *Pongamia glabra* vent. (karanja oil) e nitrato de sódio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Anteriormente, De Sousa e colaboradores (2011) reportaram a produção de 1,2 g/L de ramnolipídeos usando a linhagem de *P. aeruginosa* MSIC02 e glicerina hidrolisada como fonte de carbono. Nesse estudo foi utilizando um delineamento do tipo Fatorial Completo (2^4) para investigar os efeitos das concentrações de nitrogênio e fosfato, assim como o pH e a

temperatura do processo biotecnológico. Observou-se que o pH, temperatura e fosfato foram as variáveis mais significativas estatisticamente para o processo em questão. Recentemente, Hassan e colaboradores (2016) verificaram que o uso de um planejamento do tipo Plackett-Burman mostrou-se vantajoso para investigar os efeitos de diversas variáveis, entre elas fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sais, pH e temperatura, sobre a produção de ramnolipídeos por uma linhagem de *Pseudomonas* sp..

A aplicação de estratégias de delineamento experimental para a produção de sorofolipídeos, trealose lipídeos ou manosileritritol lipídeos são escassas na literatura, sendo a abordagem mais comumente encontrada a avaliação de aplicabilidade de diferentes substratos hidrofílicos e hidrofóbicos de baixo-custo como substratos no processo biotecnológico. No que tange a produção de soforolipídeos, muitos estudos têm evidenciado o potencial de uma variedade de substratos de baixo-custo, preferencialmente os hidrofóbicos, como óleos vegetais, para a produção desses biossurfactantes (DAVEREY & PAKSHIRAJAN, 2009; MORYA et al., 2013; MADDIKERI et al., 2015).

Os estudos pioneiros sobre o uso de substratos alternativos para a produção de soforolipídeos reportaram bons rendimentos utilizando gordura animal, resíduo de óleo de cozinha, melaço de soja e whey desproteinizado como fontes de carbono (DESPANDE & DANIELS, 1995; SHAH et al., 2007; SOLAIMAN et al., 2007; DANIEL et al., 1999). Utilizando gordura animal como fonte de carbono hidrofóbica, por exemplo, foi reportado a obtenção de 97-120 g/L de soforolipídeos em aproximadamente 70 horas de processo (DESPANDE & DANIELS, 1995). Estudos mais recentes mostraram a possibilidade de aplicação de substratos como óleos vegetais, álcoois e ácidos graxos isolados, alcançando diferentes concentrações de biossurfactantes, com pronunciada variação da estrutura química e nas propriedades físico-químicas dos soforolipídeos produzidos (DENGLE-PULATE et al., 2013; JIMÉNEZ-PEÑALVER et al., 2016; SHIN et al., 2010).

Outro ponto importante a se considerar sobre a produção de soforolipídeos é o fato de que praticamente 90% dos estudos utilizam a linhagem de *Candida bombicola* ATCC 22214 nos processos de produção (DAVEREY & PAKSHIRAJAN, 2009; DAVEREY & PAKSHIRAJAN, 2010). Esse fato possibilita comparar os processos biotecnológicos reportados por diferentes autores em termos de eficiência uma vez que não haveria as variações inter- e intra-espécies como ocorrem na produção de ramnolipídeos e manosileritritol lipídeos,

que utilizam diferentes linhagens de micro-organismos, muitas vezes isolados selvagens provenientes de estudos de triagem.

Além das altas concentrações alcançadas nos processos fermentativos, possibilidade de utilização de fontes de carbono de baixo-custo e padronização da linhagem produtora, os sofrorolipídeos são hoje os biossurfactantes com aplicação real na indústria, sendo encontrados em diferentes produtos como detergentes, produtos de limpeza e de higiene pessoal com apelo ecológico e cosméticos, comercializados por companhias estrangeiras como a Soliance (França), Saraya (Japão), Ecover (Bélgica) e MG Intobio Co. Ltd (Coreia do Sul) (VAN BOGAERT & SOETAERT, 2011).

Considerando a influência das fontes de carbono sobre a estrutura química dos sofrorolipídeos, bem como de ramnolipídeos, vários estudos têm demonstrado a possibilidade de obtenção de uma variedade de análogos ou isoformas desses compostos com propriedades tensoativas e antimicrobianas diferenciais (WADEKAR et al., 2012; ROELANTS et al., 2016; MA et al., 2012; MA et al., 2014; MA et al., 2016; DENGLE-PULATE et al., 2014). Os sofrorolipídeos obtidos utilizando dodecanol como fonte de carbono, por exemplo, mostraram excelentes características de desempenho, com redução de tensão superficial para valores menores que 25 mN/m e um valor de CMC próximo de 0,7 mg/L (DENGLE-PULATE et al., 2013). Em termos comparativos, as características tensoativas desses sofrorolipídeos foram superiores as encontradas para surfactantes químicos SDS (dodecil sulfado de sódio; CMC: 6,73 mg/L) e dodecil tetraetilenoglicol éter (Laureth 4; CMC: 3,03 mg/L), que possuem valores de redução de tensão superficial de 32 mN/m e 35 mN/m, respectivamente. Além disso, a capacidade de redução de tensão superficial foi mais efetiva que a descrita para sofrorolipídeos produzidos utilizando ácido oleico (34 mN/m) como fonte de carbono.

Nesse contexto, foi reportada a produção de uma mistura de ramnolipídeos composta por seis isoformas diferentes, obtida utilizando a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* DN1 (MA et al., 2016). Esse biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão superficial da água para 25,88 mN/m, o valor de CMC encontrada foi de 50 mg/L e uma excelente atividade emulsificante também foi verificada, chegando aproximadamente 100% para uma variedade de hidrocarbonetos.

Apesar dos resultados promissores obtidos com sofrorolipídeos e ramnolipídeos, observa-se que poucos estudos têm explorado o efeito de diferentes fontes de carbono na

produção de manosileritritol lipídeos (MELs), grupo esse que é considerado um dos mais promissores entre todos os tensoativos de origem microbiana. A maioria dos estudos está limitada à aplicação de óleo de soja como única fonte de carbono, sendo que a variação estrutural desse grupo de compostos está condicionada às diferentes espécies de leveduras do gênero *Pseudozyma* sp. utilizadas nos processos biotecnológicos. Portanto, fica claro a necessidade e importância de estudos que visem explorar diferentes fontes de carbono para a produção de biossurfactantes glicolipídicos, entre eles MELs, buscando novas possibilidades para a compreensão dos efeitos dos substratos sobre as características estruturais desses compostos e consequentemente sobre a sua eficiência tensoativa.

3.3.3 Leveduras da família *Ustilaginaceae* na produção biotecnológica de Manosileritritol lipídeos (MELs)

MELs consistem em uma família de biossurfactantes glicolipídicos produzidos principalmente por leveduras do gênero *Pseudozyma* sp. e *Ustilago* sp., que contêm um grupamento 4-O- β -D-manopiranosil-meso-eritritol ou 1-O- β -D-manopiranosil eritritol como porção hidrofílica, dois grupamentos acila nas posições C-2' e C-3' da manose como porção hidrofóbica e podem conter grupos acetila em C-4' e C-6' (ARUTCHELVI et al., 2008; FARIA et al., 2014) (Figura 5). Estruturalmente, esses glicolipídeos podem ser agrupados em quatro tipos principais, dependendo do grau e tipo de acetilação presente na sua estrutura, compreendendo MEL-A (di-acetilado), MEL-B (mono-acetilado em R1), MEL-C (mono-acetilado em R2) e MEL-D (sem grupos acetila na sua estrutura).

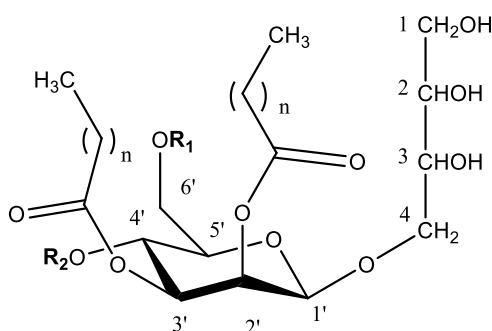


Figura 5. Estruturas químicas dos MELs e análogos produzidos por leveduras da família *Ustilaginaceae*. MEL-A: R₁= Ac, R₂= Ac; MEL-B: R₁=Ac, R₂=H; MEL-C: R₁=H, R₂= Ac; MEL-D: R₁=R₂=H; n=6-16.

As espécies do gênero *Pseudozyma* que são reconhecidas como as melhores produtoras de MELs são *P. antarctica*, *P. aphidis*, *P. rugulosa*, *P. parantarctica* que produzem principalmente MEL-A e pequenas quantidades de MEL-B e MEL-C (YU et al., 2015). Outras espécies como *P. crassa*, *P. hubeiensis*, *P. siamensis* e *P. tsukubaensis* também foram reportadas como produtoras eficientes de MELs, principalmente MEL-B e C (FUKUOKA et al., 2008a; KONISHI et al., 2011; MORITA et al., 2008c; FUKUOKA et al., 2008b). Além disso, outros análogos estruturais desses biossurfactantes também foram descritos, incluindo manosilmanitol lipídeos (MML), manosilarabitol lipídeos (MAL) e manosilribitol lipídeos (MRL), correspondendo aos análogos em que o resíduo de eritritol é substituído por manitol, arabitol e ribitol, respectivamente (MORITA et al., 2009a; MORITA et al., 2012b; MORITA et al., 2015).

A produção de MRL e MAL foi reportada em estudo realizado por Morita e colaboradores (2012) utilizando uma linhagem de *P. parantarctica* JCM 11752 cultivada em meio contendo 4% (m/v) de óleo de oliva e 4% de D-arabitol ou D-ribitol. Previamente, utilizando a mesma fonte de carbono hidrofóbica e com 4% de manitol foi observado a formação de MML utilizando o mesmo micro-organismo (MORITA et al., 2009a).

Em geral, os MELs são capazes de reduzir a tensão superficial da água de valores próximos a 72 mN/m para valores abaixo de 30 mN/m. Além disso, são moléculas que possuem boa estabilidade quando submetidas a elevadas temperaturas, concentrações de sais e em ampla faixa de valores de pH (SAJNA et al, 2013). Outra característica peculiar dos MELs é denominada de propriedade de auto-montagem (*Self-assemble property*) (KITAMOTO et al., 2009). Essa característica tem sido explorada para a aplicação desses biossurfactantes como carreadores na transfecção de genes, modelos para o estudo da estrutura e dinâmica de membranas bem como fenômenos celulares, incluindo exocitose, fusão celular e os fenômenos de transporte que ocorrem em nível de membrana (INOH et al., 2004; KITAMOTO et al., 2009).

Além das propriedades já citadas, alguns estudos demonstraram que os MELs podem exibir efeitos regenerativos e de hidratação sobre células epiteliais de humanos, atuar como inibidor da secreção de mediadores inflamatórios, e até mesmo apresentar atividades antioxidante e antitumoral (YAMAMOTO et al., 2012; MORITA et al., 2009b; TAKAHASHI et al., 2012; FAN et al., 2016). Dessa forma, esses biossurfactantes têm atraído a atenção de

muitos pesquisadores e setores industriais devido à variedade de possibilidades em termos de aplicação.

A aplicação de MELs em cosméticos está relacionada, além das suas propriedades tensoativas, com sua capacidade de aumentar o conteúdo de água no estrato córneo da pele e nos efeitos de reparo em fios de cabelos danificados (YAMAMOTO et al., 2012; MORITA et al., 2009b; MORITA et al., 2013a). Além disso, recentes patentes desenvolvidas pela Henkel Company (DE102014225184 e DE102014221889) descreveram o uso de MELs para a melhoria do poder de detergência de formulações para remoção de manchas persistentes em produtos têxteis (SCHULZ et al., 2016; HELLMUTH et al., 2016).

Os processos biotecnológicos de produção de MELs normalmente empregam fontes de carbono hidrofóbicas de origem vegetal, sendo o óleo de soja o mais utilizado (FAN et al., 2014; ONGHENA et al., 2011; NIU et al., 2017). Além disso, o rendimento e os tipos de MELs obtidos são afetados por diversos fatores entre eles o tipo de fonte de carbono e nitrogênio empregada, o tempo total de fermentação e o biocatalisador envolvido no processo (ARUTCHELVI & DOBLE, 2011; MORITA et al., 2008). As concentrações de biossurfactante bruto obtidas geralmente são maiores que 10 g/L, entretanto poucos dados estão disponíveis para as concentrações de MELs purificados.

Konischi e colaboradores (2011) descreveram a influência de extrato de levedura na produção de MELs por *P. hubeiensis* SY62. Nesse estudo, a produção biotecnológica de MEL foi realizada utilizando meio basal com diferentes concentrações de glicose, óleo de oliva e extrato de levedura. Quando 1 g/L de extrato de levedura e 50 g/L de óleo de oliva e glicose foram utilizados, 8,5 g/L de MEL foi produzido, enquanto que aumentando a concentração de extrato de levedura para 10 g/L e dobrando a concentração de óleo e glicose, a concentração de biossurfactante bruto obtido subiu para cerca de 49 g/L. Entretanto, quando fixada a concentração da fonte de nitrogênio orgânica e realizando outro aumento na concentração das fontes de carbono, a produção de MEL foi reduzida, indicando a influência do extrato de levedura na produção de MELs.

Previamente, Morita e colaboradores (2008) testaram diferentes fontes de carbono, incluindo óleos de milho, oliva, palma, óleo de colza, girassol e de soja, na produção de MELs por *P. parantarctica* JCM 11752, observando que óleo de soja e de girassol forneciam em torno de 35 g/L de biossurfactantes, seguidos de óleo de milho e de oliva onde a concentração de

produto foi em torno de 30 g/L. Avaliando qual percentual de óleo de soja seria o mais adequado para maximizar a produção de MEL, esses autores testaram quatro diferentes concentrações (4%, 8%, 16% e 20%) do substrato hidrofóbico, concluindo que a partir de 16%(v/v) de óleo de soja a produção de MEL se mantinha constante, na faixa de 40 g/L. Por fim, com o intuito de avaliar qual a melhor fonte de nitrogênio inorgânico para a produção, foram testados NaNO_3 , NH_4NO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_4$, sendo demonstrado que o nitrato de sódio era a fonte de nitrogênio mais adequada, haja visto que utilizando os demais sais, não foi possível a produção de MEL pela linhagem de levedura em questão.

Analogamente, foram avaliados os efeitos das fontes de nitrogênio orgânico (extrato de levedura, peptona e ureia) e inorgânico (nitrato de sódio e nitrato de amônio) na produção de MEL pela linhagem de *Ustilago scitaminea* NBRC 32730, observando que a maior concentração de biossurfactante, cerca de 25 g/L, era obtida utilizando-se 1 g/L de ureia como fonte de nitrogênio (MORITA et al., 2011b).

Em outro estudo, a utilização de ácido oleico e glicose como fontes de carbono em processo conduzido com uma linhagem de *P. crassa*, foram obtidos 4,6 g/L de MEL (FUKUOKA et al., 2008b). Além disso, após análise estrutural foi observado que diferentes análogos de MELs foram produzidos por essa linhagem, majoritariamente um diastereoisômero de MEL-A que exibiu diferentes propriedades tensoativas quando comparadas as até então reportadas na literatura.

Outra abordagem interessante para a produção de MEL é o uso de linhagens selvagens isoladas de amostras naturais, como tecidos vegetais e amostras de solo (MORITA et al., 2012a). Nesse contexto, foi reportada a produção de uma nova isoforma triacilada de MEL-A, denominada MEL-A2, por uma linhagem de *P. churashimaensis* isolada de folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) utilizando glicose como fonte de carbono (MORITA et al., 2011a). Esse biossurfactante exibiu baixo valor de CMC, em torno de 1,1 mg/L e foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 29,2 30 mN/m. Em um estudo prévio, os mesmos autores isolaram novas linhagens de leveduras de folhas da erva perila (*Perilla frutescens*), dentre as quais, uma linhagem de *P. tsukubaensis* foi capaz de produzir em torno de 73 g/L de MEL (MORITA et al., 2010a).

Recentemente, Sari e colaboradores (2013) reportaram a produção de 115 g/L de MEL por uma linhagem endofítica de *Pseudozyma* sp. Y10BS025 isolada de folhas de

pimenteira (*Piper betle* L.). Após a purificação e caracterização a mistura de MELs foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores próximos de 31 mN/m. Baseados nessas informações é possível notar a potencialidade de estudos de isolamento e *screening* de novas linhagens de leveduras da família *Ustilaginaceae* para a produção de MELs. Entretanto, poucos trabalhos são encontrados com esse enfoque e a maioria dos já realizados estão restritos aos desenvolvidos por Morita e colaboradores, o que limita a ampliação do conhecimento sobre esses biossurfactantes em termos de aplicação e novas possibilidades de produção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

As linhagens de leveduras da família *Ustilaginaceae* (Tabela 1) utilizadas nesse projeto foram adquiridas a partir de um Termo de Transferência de Material (TTM) (ANEXO I) referente à remessa de amostra de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial comercial oriundo de uma colaboração firmada entre o Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos (FEA-UNICAMP) e o Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do Professor Dr. Carlos Augusto Rosa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Além disso outras quatro linhagens foram cedidas pela Dra. Juliana Velasco de Castro Oliveira, pesquisadora do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), que integra o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas) (Tabela 1).

Para fins de manutenção, todas as linhagens foram cultivadas em caldo YEPD (Yeast Extract Peptone-Dextrose: 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose) por 72 horas e alíquotas de 500 µL adicionadas de 100 µL glicerol foram estocadas em ultra-freezer a -80°C.

Para o uso nos experimentos, cada linhagem de levedura foi previamente reativada em 50 mL de caldo YEPD e cultivadas em shaker climatizado a 30°C, 200 rpm por 72 horas e posteriormente plaqueadas em YEPD ágar (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose e 15 g/L de ágar) e incubadas por 72 horas em estufa bacteriológica a 30°C.

Tabela 1. Leveduras da família *Ustilaginaceae* utilizadas no desenvolvimento do projeto.

Micro-organismo	Código
<i>Moesziomyces</i> sp.	UFMG-CM-Y6131
<i>Moesziomyces</i> sp.	UFMG-CM-Y6132
<i>Moesziomyces</i> sp. F16C1	CTBE-4
<i>Moesziomyces</i> sp. F5C1	CTBE-3
<i>Pseudozyma aphidis</i>	UFMG-CM-Y1100
<i>Pseudozyma aphidis</i>	UFMG-CM-Y1226
<i>Pseudozyma aphidis</i>	UFMG-CM-Y1387
<i>Pseudozyma aphidis</i>	UFMG-CM-Y3468

<i>Pseudozyma aphidis</i>	UFMG-CM-Y3533
<i>Pseudozyma aphidis</i>	UFMG-CM-Y5768
<i>Pseudozyma brasiliensis</i>	CTBE-1
<i>Pseudozyma graminicola</i>	UFMG-CM-Y1375
<i>Pseudozyma graminicola</i>	UFMG-CM-Y3531
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y940
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y1172
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y1183
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y1443
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y3413
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y4027
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y4078
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y4211
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y4234
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y4384
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UFMG-CM-Y5442
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	UFMG-CM-Y1230
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	UFMG-CM-Y1495
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	UFMG-CM-Y3653
<i>Pseudozyma prolifica</i>	UFMG-CM-Y3543
<i>Pseudozyma rugulosa</i>	UFMG-CM-Y1213
<i>Pseudozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y770
<i>Pseudozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y849
<i>Pseudozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y1466
<i>Pseudozyma</i> sp. F8B5	CTBE-2
<i>Pseudozyma vetiver</i>	UFMG-CM-Y1193
<i>Pseudozyma vetiver</i>	UFMG-CM-Y5454

4.2 Screening de leveduras produtoras de biossurfactantes

Considerando que a limitação de nutrientes pode afetar a produção de biossurfactantes, o estudo de triagem das leveduras foi realizado utilizando dois meios de cultivo diferentes: meio de cultivo rico em nutrientes e meio mineral com glicose.

4.2.1 Meio de cultivo rico em nutrientes

Após o crescimento das leveduras em placas de ágar YEPD, uma alçada foi inoculada em 150 mL de caldo YEPD e cultivadas em shaker climatizado a 30 °C e agitação de 200 rpm. Para a seleção inicial das leveduras, foi realizado o monitoramento da tensão superficial por 120 horas. Para isso, a cada 24 horas, alíquotas de 10 mL foram retiradas em condições assépticas e centrifugadas a 9000 rpm, 5°C por 20 minutos para a remoção das células, e as medidas de tensão superficial do sobrenadante foram realizadas pelo método de placa em um tensiômetro modelo K12 (Kruss, GmbH, Alemanha). O tensiômetro foi configurado para uma série de medidas, com intervalo de 10 segundos entre elas, até que se encontrasse um desvio padrão menor que 0,2 mN/m ou até 50 repetições para cada amostra.

4.2.2 Meio mineral com glicose

Para a segunda parte do *screening* os micro-organismos foram cultivados em meio mínimo com uma única fonte de carbono. Para isso, 10 mL de inóculo cultivado por 72 horas em meio YEPD foram centrifugados a 9000 rpm, 5°C por 20 minutos. A biomassa resultante foi inoculada em erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio mineral (FAN et al., 2014), composto por 3.0 g/L NaNO₃, 0.3 g/L MgSO₄.7H₂O, 0.3 g/L KH₂PO₄ e 1.0 g/L de extrato de levedura com glicose (40 g/L) como fonte de carbono.

O monitoramento da tensão superficial foi realizado a cada 24 horas retirando-se alíquotas de 10 mL do meio de cultivo com posterior remoção das células por centrifugação e medidas pelo método de placa em um tensiômetro modelo K12 (Kruss, GmbH, Alemanha).

Foram considerados potenciais produtores de biossurfactantes os micro-organismos que apresentaram redução da tensão superficial do meio de cultivo para valores menores que 35 mN/m (PATOWARY et al., 2017; KONISHI et al., 2007).

4.3 Estudo da aplicação de diferentes fontes de carbono para a produção de biossurfactantes

Para as linhagens com melhor perfil de redução de tensão superficial na etapa de *screening*, foi realizado o estudo da aplicação de substratos hidrofílicos (manipueira e glicose) e hidrofóbicos (óleo de soja e ácido oleico) em meio mineral como fontes de carbono para o crescimento das leveduras.

As composições dos meios de cultivo foram: meio mineral (3.0 g/L NaNO₃, 0.3 g/L MgSO₄.7H₂O, 0.3 g/L KH₂PO₄ e 1.0 g/L de extrato de levedura) com 10 g/L de glicose (G), meio mineral com 50% (v/v) de manipueira (M), meio mineral com 10 g/L de óleo de soja (OS) e meio mineral com 10 g/L de ácido oleico (AO). As fontes de carbono em que as leveduras apresentaram melhores perfis de crescimento foram utilizadas para a produção de biossurfactantes.

O monitoramento do crescimento foi realizado através da determinação da biomassa seca. Alíquotas de 1 mL de cada meio foram retiradas assepticamente a cada 24 horas e centrifugadas a 9000 rpm, 5°C por 20 minutos. Os pellets resultantes foram secos em estufa de aquecimento programada à temperatura de 60°C por 24 horas, até peso constante. Em seguida a determinação da biomassa foi realizada gravimetricamente em balança analítica.

4.4 Extração e purificação dos biossurfactantes

4.4.1 Extração

Após o término do processo fermentativo o meio de cultivo foi centrifugado a 9000 rpm, 5°C por 20 minutos para remoção das células e o sobrenadante resultante foi transferido para um funil de separação e extraído com igual volume (1:1) de acetato de etila (FAN et al., 2016).

A fase orgânica foi concentrada à pressão reduzida em evaporador rotativo e o extrato obtido foi denominado de biossurfactante bruto. Posteriormente, esse extrato foi lavado com uma mistura hexano:metanol:água (1:6:3) para a remoção de lipídeos e dos ácidos graxos livres (RAU et al.; 2005). A fase aquosa resultante foi lavada novamente com 100 mL de hexano e em seguida concentrada à pressão reduzida com temperatura do banho do evaporador rotativo ajustada para 65°C. A fração resultante após esse processo foi denominado biossurfactante semi-purificado.

4.4.2 Purificação

Para amostras com massas maiores que 100 mg, a purificação foi realizada em coluna aberta utilizando sílica flash como fase estacionária. O sistema de eluição consistiu de uma solução de clorofórmio: metanol (9:1). O processo de separação foi monitorado através de placas de CCD (cromatografia em camada delgada ou do inglês, *TLC-Thin layer*

chromatography). Para as amostras com massas menores que 100 mg, o processo de purificação foi realizado utilizando-se placas de TLC preparativa de sílica gel 60 (20x20cm, Merck). No último caso, a amostra foi dissolvida em volume adequado de eluente e aplicada horizontalmente a 1,5 cm na parte inferior da placa. Em seguida, as placas foram acondicionadas em cuba de vidro saturadas com eluente para o processo de separação.

Após o término do processo de separação os *spots* foram visualizados com auxílio de câmara de ultravioleta (314 nm), marcados e posteriormente retirados com auxílio de espátula. A massa resultante para cada um dos spots foi extraída com aproximadamente 50 mL de clorofórmio: metanol (9:1), sob agitação constante por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada com auxílio de papel filtro e os compostos purificados dissolvidos foram concentrados à pressão reduzida.

4.5 Análise estrutural dos biossurfactantes

4.5.1 Identificação dos biossurfactantes através de Espectrometria de Massas com Ionização por *Electrospray* (ESI-MS)

As amostras dos extratos brutos e dos biossurfactantes purificados foram ressuspendidas em 500 µL de acetato de etila e posteriormente 10 µL foram diluídos em 900 µL de metanol e 0,5 µL foram injetados em um sistema cromatográfico hifenado 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (Agilent, Santa Clara CA, USA) constituído de uma fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI) e um analisador de massas híbrido do tipo quadrupolo-tempo de voo (*time-of-flight*) equipado com uma coluna Poroshell 120 SB-Aq 2,7 µm (2.1x100 mm, Agilent). O sistema de eluição foi composto pela fase móvel A constituída de água milli-Q acidificada com 0,1% de ácido fórmico; e a fase móvel B foi acetonitrila. O fluxo de 0,35 mL/min foi utilizado seguindo o gradiente linear: 0-4 min, 30% a 65% de B; 4-7 min, 65% a 80% de B; 7-10 min 80% a 100% B; mantendo em 100% B por 2 min e um tempo de pós-corrida a 30% de B durante 3 minutos para o reequilíbrio da coluna. As tensões e temperaturas do espectrômetro de massas foram definidas como: VCap 3000 V; fragmentor voltage a 150 V; OCT 1RF Vpp a 750 V; Temperatura do gás a 290°C; Sheat gas a 350°C; O gás de secagem a 14 L/min; As fragmentações foram realizadas com energia de colisão normalizada (NCE) de 20 e 50. Os espectros de massa foram adquiridos em perfil e modo positivo com os íons nas formas sodiada $[M + Na]^+$ e/ou amoniada $[M + NH_4]^+$ e a faixa de aquisição foi de 100 a 1500 m/z. Os dados foram tratados com o software Agilent MassHunter Qualitative Analysis B0.7.

4.5.2 Análise dos biossurfactantes através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada utilizando a aproximadamente 10 mg de amostra diluída em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os espectros de hidrogênio (^1H RMN) foram adquiridos a 25°C em um Espectrômetro de Ressonância Bruker Avance III 400, operando a 400 MHz.

4.6 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

Para determinação da CMC, os biossurfactantes purificados foram pesados e solubilizados, sendo sucessivamente diluídos e os valores de tensão superficial para cada diluição foram medidos pelo método de placa em um tensiômetro modelo K12 (Kruss, GmbH, Alemanha). A partir da plotagem dos valores de tensão superficial *versus* log da concentração, a CMC foi determinada utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA.), considerando esse como o valor do ponto de intersecção entre duas retas construídas com os valores de tensão superficial e log da concentração.

4.7 Determinação do balanço hidrofílico-hidrofóbico (*Hydrophilic and lipophilic balance, HLB*) dos biossurfactantes purificados

O valor de HLB para os MEL purificados foram determinados utilizando o método de Griffin's, assim como adotado por Fukuoka e colaboradores (2007) e Worakitkanchanakul e colaboradores (2009).

Fórmula de Griffin's:

$$\text{HLB} = 20 \times (M_w/M)$$

Em que, M_w representa o valor do peso molecular do resíduo hidrofílico do biossurfactante (manosileritritol ou equivalente) e M representa o peso molecular total do glicolípido purificado (GRIFFIN, 1954).

4.8 Estudo da influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de MEL através de delineamento experimental e análise quimiométrica

Foram realizados três planejamentos experimentais do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com o intuito de avaliar os efeitos das fontes de nitrogênio

orgânico (extrato de levedura), nitrogênio inorgânico (NaNO_3), e das fontes de carbono, hidrofílicas (glicose e manitol) e hidrofóbicas (óleo de soja e ácido oleico) na produção de MEL. Além disso, esse tipo de delineamento foi escolhido com objetivo de construir modelos preditivos e otimizar o processo de produção de biossurfactantes para as linhagens que apresentaram os melhores resultados na etapa de *screening*.

Abaixo seguem as tabelas de variáveis e níveis avaliados nos delineamentos experimentais, bem como a matriz do DCCR, construída para 4 (k) variáveis independentes, composta por $2^k + k \times 2 + 4$ repetições no ponto central, totalizando 28 experimentos. A escolha dos níveis baseou-se na composição dos meios de cultivo tradicionalmente utilizados na produção de MEL e MML.

Tabela 2. Variáveis e níveis da matriz dos três DCCR 2^4 realizados.

Tabela 2.1. Variáveis e níveis avaliados no DCCR I.

	Variáveis	Unidade	Nível				
			-2	-1	0	+1	+2
X ₁	Óleo de soja	g/L	10	25	40	55	70
X ₂	Glicose	g/L	0	20	40	60	80
X ₃	Extrato de levedura	g/L	1	2	3	4	5
X ₄	NaNO_3	g/L	0,2	0,6	1,0	1,4	1,8

Tabela 2.2 Variáveis e níveis avaliados no DCCR II.

	Variáveis	Unidade	Nível				
			-2	-1	0	+1	+2
X ₁	Óleo de soja	g/L	10	25	40	55	70
X ₂	Manitol	g/L	10	25	40	55	70
X ₃	Extrato de levedura	g/L	1	2	3	4	5
X ₄	NaNO_3	g/L	0,2	0,6	1,0	1,4	1,8

Tabela 2.3 Variáveis e níveis avaliados no DCCR III.

	Variáveis	Unidade	Nível				
			-2	-1	0	+1	+2
X ₁	Ácido Oleico	g/L	10	25	40	55	70
X ₂	Manitol	g/L	10	25	40	55	70
X ₃	Extrato de levedura	g/L	1	2	3	4	5
X ₄	NaNO_3	g/L	0,2	0,6	1,0	1,4	1,8

Tabela 2.4 Matriz codificada utilizada nos delineamentos do tipo DCCR para quatro variáveis independentes.

Ensaio	Fonte de carbono hidrofóbica (X ₁)	Fonte de carbono hidrofílica (X ₂)	Extrato de levedura (X ₃)	NaNO ₃ (X ₄)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

Equações de segunda ordem foram utilizadas para definição dos modelos, como mostrado abaixo:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_i^2 X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \text{ (Equação 1)}$$

em que Y representa a resposta estimada pelo modelo, i e j correspondem à variação de 1 ao número de variáveis (n), β_0 é a média, β_i , β_i^2 e β_{ij} representam os coeficientes linear, quadrático e de interação, respectivamente; X_i e X_j são as variáveis independentes codificadas. O coeficiente de correlação múltipla (R^2) e o teste de Fisher (análise de variância - ANOVA)

foram utilizados para verificar a adequação estatística dos modelos propostos codificados aos pontos reais. As análises foram realizadas utilizando o software Statistica™ 10.0 (Statsoft Inc, Oklahoma, USA).

Como variáveis dependentes foram utilizadas a concentração de MEL bruto e a área total de isoformas presentes no extrato bruto de cada ensaio, obtido por extração a cada 24 horas e analisados por LC-ESI-MS. Além disso, para cada delineamento, foi monitorado o perfil de crescimento da levedura durante todo o processo biotecnológico, através da determinação de biomassa seca como descrito no item 3.3.

Adicionalmente, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA) como análise exploratória de dados com o objetivo de verificar se haveria ou não tendências de agrupamento dos ensaios, quais variáveis estariam associadas com esse fenômeno e quais as correlações entre os ensaios, as variáveis estudadas e o tipo de isoforma de manosileritritol lipídeo produzida. Para isso, com base nos dados de LC-ESI-MS, os íons referentes aos biossurfactantes foram extraídos usando a função “extract compounds by molecular feature” do programa MassHunter Qualitative Analysis B0.7. Foi construída uma tabela alinhada dos dados utilizando o programa Excel do pacote Office 2016 e as análises quimiométricas foram realizadas na plataforma online do Metaboanalyst 3.0 (XIA & WISHART, 2016). Para a análise do PCA os dados foram auto-escalados e não foi usada normalização.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 *Screening* de leveduras produtoras de biossurfactantes

A limitação de nutrientes como fontes de carbono, nitrogênio, sais e íons metálicos tem sido reportada como fator interferente na produção de diversos metabólitos microbianos de interesse biotecnológico, incluindo aromas, pigmentos e biossurfactantes (EQLI & ZINN, 2003; VAN RIJSWIJCK et al., 2015; SURAIYA et al., 2017; NICOLÒ et al., 2017). Nesse contexto, o uso de meios de cultivo mínimos para a triagem de micro-organismos produtores de biossurfactantes tem sido reportado para bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ELAZZAZY et al., 2015; ZHANG et al., 2016; ACCORSINI et al., 2012; QASI et al., 2014). Essa estratégia aliada ao monitoramento do perfil de redução de tensão superficial traz informações quantitativas e qualitativas sobre o efeito tensoativo dos metabólitos microbianos no meio de cultivo e pode ser considerado um dos métodos mais eficientes e confiáveis para a detecção de uma linhagem produtora de biossurfactantes (WALTER et al., 2010; MNIF & GHRIBI, 2015).

Dessa forma, as Figuras 1 e 2 apresentam o perfil de redução de tensão superficial para as 34 linhagens de leveduras pertencentes a família *Ustilaginaceae* ao longo de 120 horas em meio de cultivo rico em nutrientes (caldo YEPD) e em meio mínimo contendo apenas glicose como fonte de carbono, respectivamente.

Observou-se que quando as linhagens de leveduras foram inoculadas em condições de oferta de nutrientes houve a redução da tensão superficial do meio de cultivo rico em nutrientes para valores menores que 40 mN/m, e para nove desses micro-organismos, foi verificado que ao final de 120 horas de crescimento a tensão superficial era menor que 32 mN/m. Cooper & Goldenberg (1987), sugerem produção de biossurfactante se a tensão superficial do meio de cultivo for reduzida para valores em torno de 40 mN/m ou menos. Entretanto, deve-se considerar que o meio YEPD utilizado possui uma tensão superficial inicial de aproximadamente 50 mN/m, sendo, portanto, mais adequado observar a redução percentual da tensão superficial obtida pela diferença entre os valores de tensão do ponto inicial e final do processo de cultivo (Tabela 3).

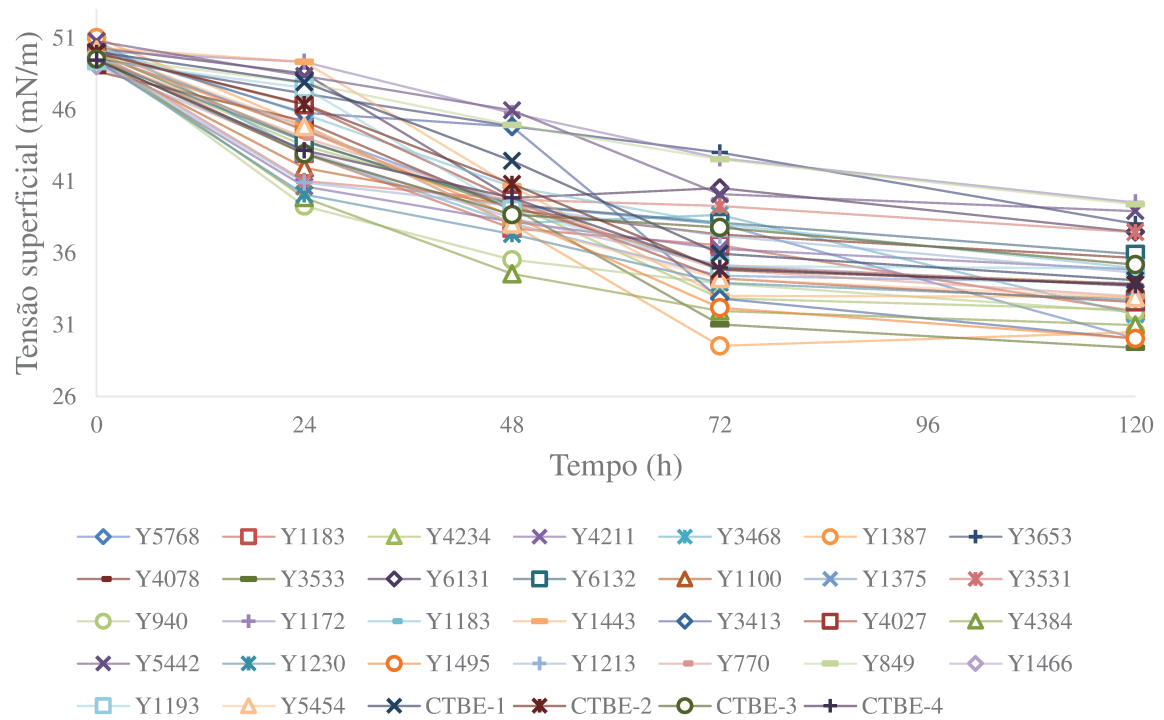


Figura 6. Perfil de redução de tensão superficial das linhagens de leveduras durante 120 horas em meio de cultivo rico em nutrientes (YEPA).

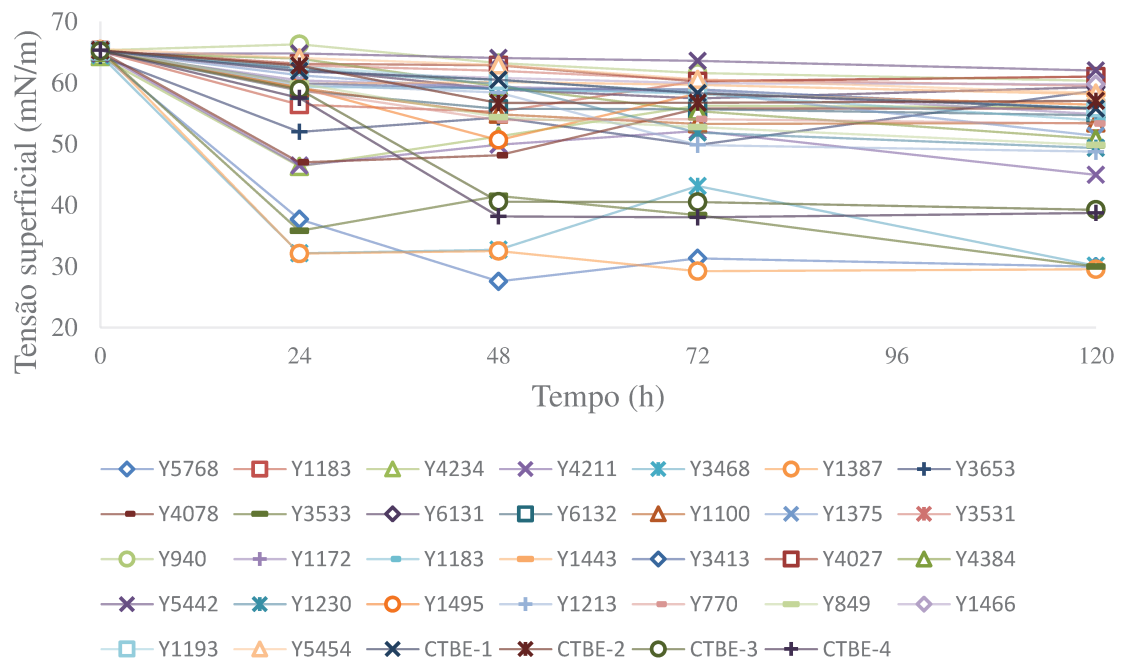


Figura 7. Perfil de redução de tensão superficial das linhagens de leveduras durante 120 horas em meio mineral e glicose (40 g/L).

Quando as mesmas linhagens de micro-organismos foram cultivadas em meio mínimo composto de 3g/L de NaNO_3 , 0,3 g/L de KH_2PO_4 , 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1g/L de extrato de levedura, com 40 g/L de glicose como única fonte de carbono, apenas quatro das 34 linhagens apresentaram redução significativa (< 32 mN/m) da tensão superficial ao final de 120 horas, reduzindo pela metade as linhagens potencialmente promissoras com base no *screening* com meio de cultivo complexo. As linhagens com melhores perfis de redução percentual da tensão superficial ao fim de 120 horas, para ambos os meios, foram: *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3533, *P. aphidis* UFMG-Y1387, *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5778 (Tabela 1). Essa espécie de levedura é reconhecida como um importante produtor de manosileritritol lipídeos, principalmente MEL-A (FAN et al., 2014).

Os resultados obtidos para as linhagens de *P.aphidis* nesse estudo são condizentes aos reportados na literatura, em que os valores de tensão superficial variaram de 26,2-34,7 mN/m (RAU et al., 2005a; FAN et al., 2016). Em contrapartida, as linhagens de *P.rugulosa* e *P.hubeiensis* utilizadas nesse estudo não alcançaram, para nenhum dos dois meios de cultivo, redução significativa da tensão superficial, apesar de serem encontrados estudos na literatura sobre o potencial de produção de MELs (MORITA et al., 2006; KONISHI et al., 2011). Além disso, com base nos dados apresentados na Tabela 3, pode-se concluir que a utilização de meio mínimo foi vantajosa na discriminação das espécies com potencial de produção de biossurfactantes uma vez que permitiu observar de forma mais precisa o percentual de redução de tensão superficial exibido pelos micro-organismos. Levando-se em conta que alguns estudos consideram valores de tensão superficial final no meio de cultivo em torno de 40 mN/m como critério de seleção, nota-se, por exemplo, que se fosse tomado apenas os dados obtidos em meio de cultivo complexo, a linhagem de *P. jejuensis* UFMG-Y1230, que exibiu um valor final de tensão superficial em meio YEPD de 32,74 mN/m, seria elencada como uma potencial produtora de biossurfactantes, o que não se confirmou quando essa linhagem foi estudada em meio mínimo, onde observou-se uma tensão final de 49,43 mN/m.

Com base nos resultados dessa etapa do trabalho, as linhagens de *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3533, *P. aphidis* UFMG-Y1387, *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5778 foram selecionadas para a etapa de estudo da influência de diferentes fontes de carbono no crescimento e na produção de MELs.

Tabela 3. Comparação entre a eficiência de redução de tensão superficial em meio de cultivo rico em nutrientes (YEPD) e em meio mínimo com glicose (MMG).

Micro-organismo	Tensão Superficial (mN/m)				Eficiência na redução de tensão (%)	
	YEPD		MMG		YEPD	MMG
	0h	120h	0h	120h		
<i>P. aphidis</i> UFMG-Y1387	51,03 ± 0,02	30,48 ± 0,01	65,43 ± 0,08	29,51 ± 0,14	40,27	54,90
<i>P. aphidis</i> UFMG-Y5768	50,21 ± 0,10	30,05 ± 0,08	64,72 ± 0,11	29,96 ± 0,03	40,15	53,71
<i>P. aphidis</i> UFMG-Y3533	49,98 ± 0,08	29,39 ± 0,03	65,31 ± 0,07	29,97 ± 0,19	41,20	54,11
<i>P. aphidis</i> UFMG-Y3468	50,82 ± 0,09	31,72 ± 0,08	64,48 ± 0,03	30,1 ± 0,02	37,58	53,32
<i>P. hubeiensis</i> UFMG-Y4211	49,39 ± 0,11	34,85 ± 0,04	64,82 ± 0,01	38,73 ± 0,08	29,44	40,71
<i>Moesziomyces</i> sp CTBE-4	49,44 ± 0,04	33,74 ± 0,09	65,32 ± 0,14	39,24 ± 0,02	31,75	39,81
<i>Moesziomyces</i> sp CTBE-3	49,52 ± 0,06	35,19 ± 0,12	65,19 ± 0,09	44,96 ± 0,06	28,94	30,63
<i>P. rugulosa</i> UFMG-Y1213	49,53 ± 0,11	34,63 ± 0,01	65,25 ± 0,07	48,75 ± 0,03	30,08	25,30
<i>P. jejuensis</i> UFMG-Y1230	49,43 ± 0,08	32,74 ± 0,03	65,11 ± 0,02	49,34 ± 0,05	33,77	24,22
<i>Pseudozyma</i> sp. UFMG-Y849	49,53 ± 0,12	39,39 ± 0,06	65,27 ± 0,05	49,82 ± 0,10	20,67	23,67

5.2 Estudo da aplicação de diferentes fontes de carbono para a produção de biossurfactantes por linhagens de *Pseudozyma aphidis*

Dependendo da natureza do biossurfactante e do micro-organismo produtor os seguintes padrões de produção desses tensoativos por processos fermentativos são possíveis: (i) produção associada ao crescimento, (ii) produção em condições limitantes de crescimento, (iii) produção por células em fase estacionária de crescimento e (iv) produção associada com o aumento de um precursor (DESAI & DESAI, 1993). Portanto, o estudo do perfil de crescimento dos micro-organismos produtores de biossurfactantes em diferentes fontes de carbono compreende uma estratégia útil para a compreensão do processo biotecnológico a fim de melhorar as condições e a composição do meio de cultivo.

O perfil de crescimento das quatro linhagens de *P. aphidis* selecionadas na etapa de *screening* foi realizado pela medida de biomassa seca utilizando quatro fontes de carbono diferentes: glicose (10 g/L), manipueira (50%, v/v), óleo de soja (10 g/L) e ácido oleico (10 g/L) durante 192 horas (Figura 8).

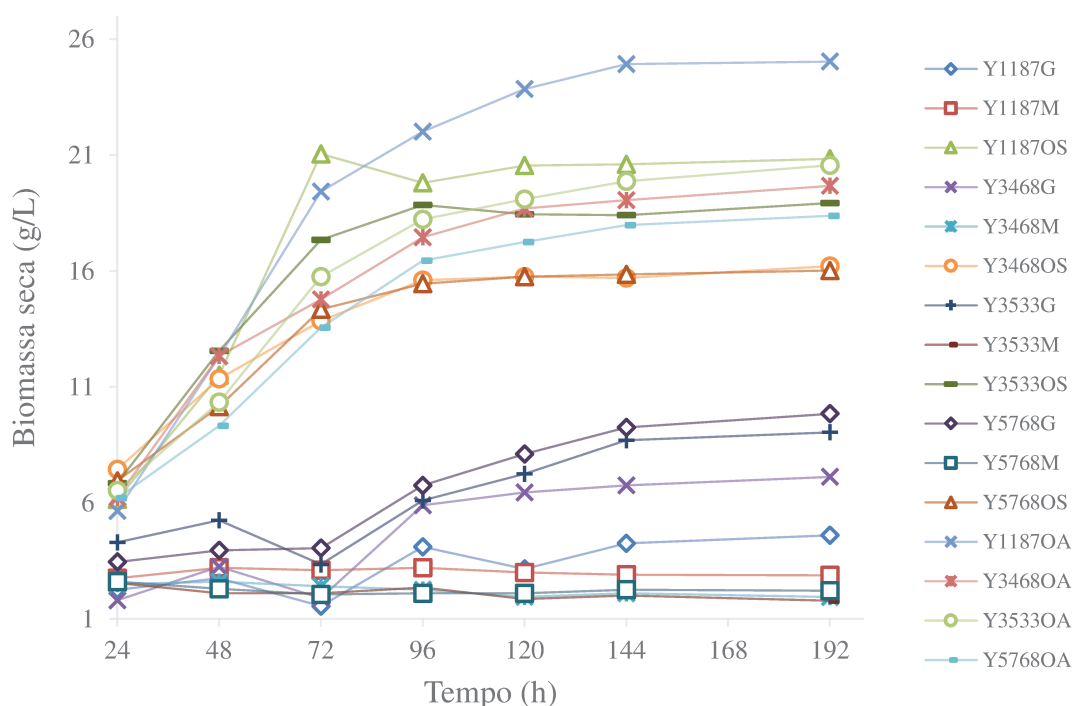


Figura 8. Perfil de crescimento das linhagens de leveduras produtoras de biossurfactantes durante 192 horas de cultivo em meio mínimo contendo (G) glicose, (M) manipueira, (OS) óleo de soja e (OA) ácido oleico como fonte de carbono.

Entre as fontes de carbono testadas, não foi observado o crescimento das linhagens de leveduras apenas quando o meio mínimo contendo manípueira foi utilizado. A utilização desse substrato foi reportada em processos de produção de surfactina por linhagens de *Bacillus subtilis* e manosileritritol lipídeos por *P. tsukubaensis* (BARROS et al., 2008; FAI et al., 2014). Entretanto, esse resultado pode ser justificado considerando as diferenças fisiológicas inter-espécies, pela complexidade do substrato ou ainda pela concentração testada não ser a mais conveniente para as espécies alvo desse trabalho.

Quando glicose foi utilizada como fonte de carbono, foi possível evidenciar o crescimento das quatro linhagens de *P. aphidis*, com valores de biomassa seca ao final do processo de cultivo variando entre 4,6 a 9,84 g/L. Além disso, em relação à capacidade de produção de substâncias tensoativas, foram alcançados valores consideráveis de redução de tensão superficial, variando de 26,93 mN/m até 27,51 mN/m (Tabela 4). Esses valores indicam fortemente a produção de biossurfactantes uma vez que a tensão inicial do meio de cultivo contendo glicose era ao início do processo em torno de 65 mN/m. Esses resultados são condizentes aos reportados anteriormente por alguns autores, em que a produção de manosileritritol lipídeos por espécies de *Pseudozyma* sp. utilizando fontes de carbono hidrofílicas, como glicose, foi verificada (MORITA et al., 2007; FARIA et al., 2014).

Morita e colaboradores (2007) demonstraram a viabilidade de produção de MELs por *P. antarctica* T-34 crescidas em meio mínimo contendo glicose, o que não foi verificado para a linhagem de *P. aphidis* ATCC 32657. Até então, as fontes de carbono hidrofílicas como glicose, glicerol, sacarose e manose eram utilizadas para o suporte no crescimento das linhagens de leveduras na produção de MEL, sendo esse estudo o primeiro na produção de MEL utilizando apenas glicose. Posteriormente, Faria e colaboradores também reportaram a produção de MELs utilizando 40 g/L de glicose, assim como xilose (40/L) e a mistura desses dois açúcares (20g/L+20g/L) como fontes de carbono por uma linhagem de *P. antarctica*. Adicionalmente, esses autores demonstraram ainda o potencial dessas fontes de carbono para a produção de MELs para linhagens de *P. aphidis* e *P. rugulosa*, sendo glicose a melhor estratégia em termos de concentração de produto obtido para as espécies testadas.

Tabela 4. Perfil de redução da tensão superficial e diluição micelar crítica das linhagens selecionadas na etapa de *screening* em meio mínimo com diferentes fontes de carbono após 192 horas de cultivo.

	<i>P. aphidis</i> UFMG-Y1387	<i>P. aphidis</i> UFMG-Y3468	<i>P. aphidis</i> UFMG-Y3533	<i>P. aphidis</i> UFMG-Y5768
Glicose				
TS	27,51 ± 0,10	26,93 ± 0,02	29,48 ± 0,07	27,15 ± 0,11
CMD ⁻¹	31,07 ± 0,04	30,82 ± 0,08	32,68 ± 0,02	31,09 ± 0,17
CMD ⁻²	58,42 ± 0,01	48,98 ± 0,09	59,55 ± 0,03	57,73 ± 0,08
Manipueira				
TS	43,86 ± 0,19	45,03 ± 0,07	52,84 ± 0,12	49,43 ± 0,20
CMD ⁻¹	57,23 ± 0,20	59,93 ± 0,11	61,34 ± 0,16	61,02 ± 0,13
CMD ⁻²	69,78 ± 0,09	70,02 ± 0,03	70,85 ± 0,20	70,20 ± 0,09
Óleo de soja				
TS	28,93 ± 0,15	29,31 ± 0,13	29,02 ± 0,18	30,12 ± 0,12
CMD ⁻¹	32,71 ± 0,14	31,28 ± 0,18	32,83 ± 0,20	31,39 ± 0,15
CMD ⁻²	59,26 ± 0,11	42,63 ± 0,14	54,81 ± 0,19	51,84 ± 0,16
Ácido oleico				
TS	28,94 ± 0,19	28,11 ± 0,16	29,76 ± 0,20	28,95 ± 0,13
CMD ⁻¹	35,87 ± 0,20	30,93 ± 0,15	34,66 ± 0,17	33,95 ± 0,18
CMD ⁻²	54,26 ± 0,17	46,52 ± 0,20	58,81 ± 0,14	50,96 ± 0,16

TS: Tensão superficial (mN/m); CMD⁻¹: Diluição micelar crítica (mN/m), fator de diluição =10; CMD⁻²: Diluição micelar crítica (mN/m), fator de diluição =100.

Os resultados obtidos utilizando glicose (10 g/L) para as linhagens de *P. aphidis* UFMG-Y3533, *P. aphidis* UFMG-Y1387, *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y576 podem ser considerados promissores uma vez que demonstraram que essa espécie pode ser um potencial produtor de MELs utilizando uma fonte hidrofílica. As vantagens do uso de fontes de carbono hidrofílicas, como glicose, em comparação com as fontes hidrofóbicas, principalmente o óleo de soja, para a produção de MELs estão relacionadas à redução dos custos relacionados ao meio de cultivo e às etapas de purificação. Entretanto, a maior desvantagem está relacionada à concentração de biossurfactante obtido, sendo bem menor quando glicose é utilizada como fonte de carbono (MORITA et al., 2007).

Considerando os resultados apresentados na Figura 8, pode-se verificar que quando as linhagens de leveduras selecionadas foram cultivadas em meio mínimo contendo fontes hidrofóbicas, os melhores perfis de crescimento em termos de produção de biomassa foram alcançados utilizando ácido oleico e óleo de soja, variando de 18,38 g/L a 25g/L e 16,02 g/L a 20,83 g/L, respectivamente.

Em relação à produção de biossurfactantes (Tabela 4), foram observados baixos valores de tensão superficial, menores que 31 mN/m, após 192 horas de cultivo para as quatro linhagens de *P. aphidis* com o uso de óleo de soja e ácido oleico, comprovando a viabilidade desses compostos como substratos tanto para o crescimento quanto para a produção de biossurfactantes pelas linhagens de leveduras estudadas. Os óleos vegetais são os substratos convencionalmente utilizados na produção de MELs, mas resultam em processos de produção e recuperação muito complicados, havendo necessidade de várias etapas de extração líquido-líquido com solventes orgânicos para a remoção do óleo residual e para alcançar níveis de pureza elevados, além de diminuir o rendimento de recuperação para próximo de 8% (MORITA et al., 2007; RAU et al., 2005b).

As diluições micelares críticas, CMD^{-1} e CMD^{-2} , são resultado da diluição de 10 e 100 vezes do caldo livre de células em água, e confere um resultado semi-quantitativo sobre a concentração de biossurfactante produzido pelos micro-organismos. Esses valores estão diretamente correlacionados com a concentração de tensoativo na solução, sendo menores os valores de tensão superficial para concentrações crescentes de biossurfactante até o limite da CMC. Dessa forma, observa-se que a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 foi a mais promissora em termos de concentração de biossurfactante produzido, pois apresentou os menores valores de CMD^{-1} (30,82 mN/m a 31,28 mN/m) e CMD^{-2} (42,63 mN/m a 48,98 mN/m) para os diferentes substratos após 192 horas de cultivo. Portanto, essa linhagem foi selecionada para as demais etapas do trabalho.

5.3 Identificação dos biossurfactantes produzidos por *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3468 utilizando diferentes fontes de carbono

Utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com ionização por *electrospray* acoplada a um analisador de massas do tipo tempo de voo (LC-ESI-QTOF) para a caracterização preliminar dos extratos brutos, obtidos após a extração com acetato de etila, da linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 cultivada em glicose, óleo de soja e ácido oleico, foi

possível observar diferenças significativas na composição de MELs dependendo da fonte de carbono utilizada.

Quando glicose foi utilizada como fonte de carbono, foram identificados quatro diferentes isoformas de MEL-A (tempos de retenção 6,25 min, 6,70 min, 7,22 min e 7,6 min) como compostos majoritários presentes no extrato bruto e dois picos minoritários que coeluíram com as duas isoformas predominantes de MEL-A, correspondentes aos tipos MEL-B e MEL-C (Figura 9 A). Uma vez que MEL-B e C são homólogos estruturais, diferenciando-se apenas pela posição do grupo acetila, não foi possível separá-los uma vez que apresentaram tempos de retenção muito similares e podem também possuir mesma razão massa/carga (ONGHENA et al., 2011). Entretanto, levou-se em consideração o perfil de fragmentação para identificá-los e diferenciá-los dos MELs-A. A produção de MELs por *P. aphidis* utilizando glicose como fonte de carbono foi reportada por Faria e colaboradores (2014), entretanto, nesse estudo não foi determinada a composição em termos de homólogos de MELs presente no extrato bruto do biossurfactante.

Com base nos resultados obtidos, pronunciada seletividade para a produção de isoformas de MEL-A pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 foi observada quando óleo de soja foi usado como fonte de carbono (Figura 9-B). A isoforma com tempo de retenção 6,25 min foi o composto majoritário e com base no seu perfil de fragmentação, foi verificado que esse biossurfactante possuía um total de 18 carbonos na porção hidrofóbica, sendo então denominado MEL-A-18. Assim, as combinações que podem ser deduzidas para as cadeias de ácido graxo nos átomos C-2' e C-3' do resíduo de manose para que esse valor seja alcançado, podem ser C9 + C9 e C10 + C8. Analogamente, a isoforma minoritária foi identificada como MEL-A-20, denotando que a porção hidrofóbica possui um total de 20 carbonos, podendo ter combinações de C10 + C10, C12 + C8, ou C14 + C6.

O papel do óleo de soja como indutor da produção de MEL em uma linhagem de *P. aphidis* DSM70725 foi reportado por Günther e colaboradores (2015), onde foi verificada a produção de traços de apenas MEL-A sem a presença de fontes hidrofóbicas, enquanto que na presença de óleo de soja foi observado aumento da produção de MEL-A bem como a formação dos tipos MEL-B, MEL-C e MEL-D. Utilizando a mesma linhagem, Fan e colaboradores (2016)

demonstraram que utilizando óleo de soja, o MEL-A produzido continha predominantemente cadeias de C8 e C14 como porção hidrofóbica.

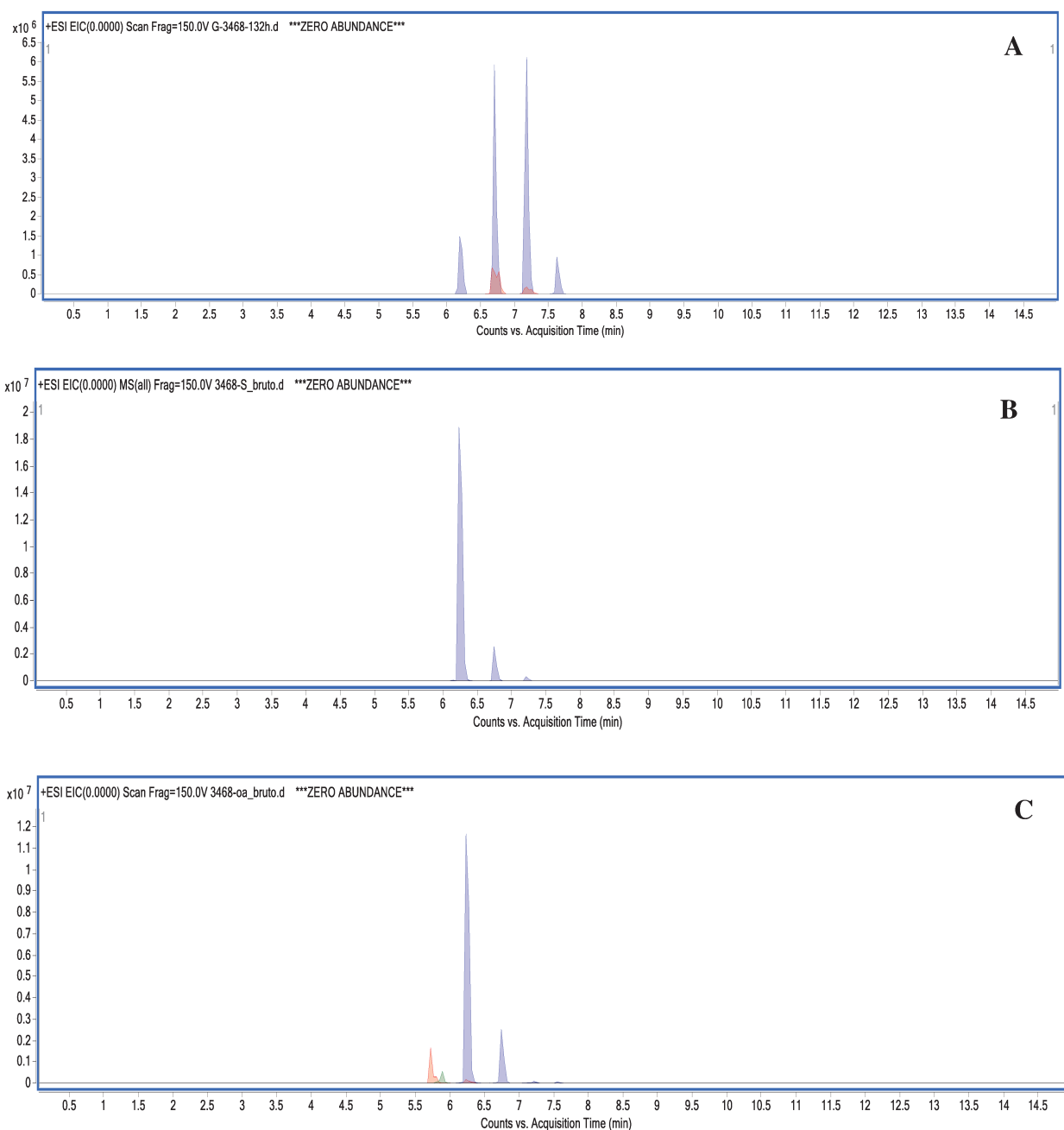


Figura 9. Perfil cromatográfico dos MELs produzidos por *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3468 cultivada em meio mínimo contendo glicose (A), óleo de soja (B) e ácido oleico (C) como fontes de carbono. Picos cromatográficos de MEL-A: azul; MEL-B e MEL-C: vermelho; MML: verde.

A viabilidade do uso de ácido oleico como fonte de carbono para a produção de MELs só foi até então reportada para linhagens de *P. antarctica* e *P. crassa* (KIM et al., 2002; FUKUOKA et al., 2008). Utilizar um ácido graxo isolado como fonte hidrofóbica pode fornecer informações mais precisas sobre a seletividade de produção de diferentes tipos de homólogos de MELs uma vez que conseguiria uma padronização do substrato em termos de composição, o que não poderia ser observado com o óleo de soja, já que esse substrato é composto por vários ácidos graxos, incluindo ácido linolênico (18:3), ácido linoleico (18:2) e ácido oleico (18:1). Nesse contexto, foi utilizado ácido oleico como fonte de carbono no cultivo de *P. aphidis* UFMG-Y3468 e os resultados sugeriram a mesma seletividade para produção de MEL-A-18 e MEL-A-20 como compostos majoritários, assim como quando utilizando óleo de soja, mas também foi observada a produção de MEL-B/MEL-C (Figura 9C e Figura 10A). Dessa forma, quando comparado com o cultivo utilizando óleo de soja pode-se admitir que a seletividade global utilizando ácido oleico foi menor, haja visto que outros tipos de MELs foram produzidos.

Analisando o perfil cromatográfico de forma individualizada para cada tipo de MEL produzido utilizando ácido oleico como fonte de carbono, é possível notar que seis homólogos diferentes de MEL-B /MEL-C foram produzidos (Figura 10 B) e pela primeira vez, foi verificada a produção de manosilmanitol lipídeo (MML) por uma linhagem de *P. aphidis* (Figura 10C).

O MML é um glicolipídeo análogo aos MELs, possuindo um resíduo de manitol ligado ao carbono C-1' da manose em substituição ao resíduo de eritritol convencionalmente encontrado nos MELs. O primeiro estudo sobre a produção biotecnológica de MML foi publicado por Morita e colaboradores (2009) utilizando uma linhagem de *P. parantarctica* JCM 11752, que foi capaz de alcançar uma concentração em torno de 18 g/L desse glicolipídeo utilizando 16% de manitol e 4% de óleo de oliva como fontes de carbono. Assim como ocorreu com a *P. aphidis* UFMG-Y3468 cultivada em ácido oleico, o biossurfactante majoritário foi MEL-A, indicando que a co-produção de MML é resultado de uma competição endógena de moléculas de manitol e eritritol na reação mediada pela GDP-manose transferase na via de biossíntese de MELs.

Para que fossem determinadas as estruturas químicas dos biossurfactantes produzidos, foram realizados experimentos de MS/MS uma vez que a partir dos fragmentos obtidos para cada um dos compostos se torna possível determinar, por exemplo, o tamanho das

cadeias dos ácidos graxos que os compõem, dispensando a hidrólise, derivatização e posterior análise por cromatografia gasosa, que tradicionalmente são empregados para esse fim.

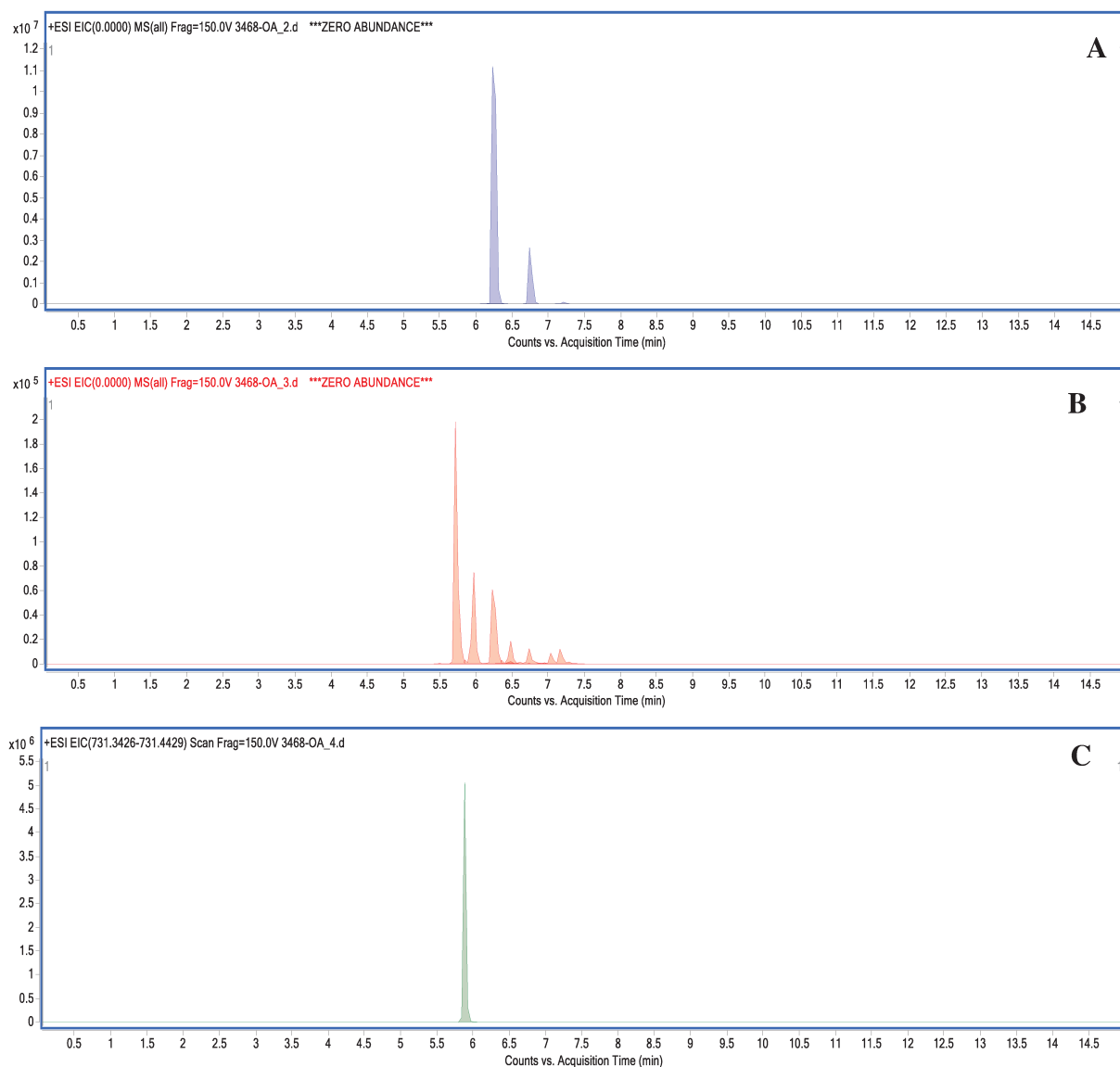


Figura 10. Perfil individual da composição de MELs produzidos por *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3468 em meio mínimo contendo ácido oleico como fonte de carbono. (A) isoformas de MEL-A; (B) isoformas de MEL-B/ MEL-C; (C) isoforma de MML.

Na Figura 11 são detalhados os perfis de fragmentação do MEL-A-18 produzidos pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468. Pode-se observar perdas características na fragmentação dos adutos sodiados $[M+Na]^+$ e amoniados $[M+NH_4]^+$, como a perda de cadeias correspondentes a ácidos graxos, razão massa/carga (m/z) de 214 para C10:0 e m/z 114 para C8:0, de duas perdas de ácido acético, m/z 60, provenientes dos grupamentos acetilas dos

carbonos C-4' e/ou C-6' (Figura 11A e 11B), bem como também a perda do resíduo de eritritol $[M-C_4H_{10}O_4]^+$ com m/z de 139 (Figura 11B). Esses resultados estão de acordo com os reportados para o derivado MEL-A com combinações C8:0 e C10:0 de um estudo de investigação de variações estruturais nos MELs produzidos por *P. aphidis* DSMZ 70725 utilizando óleo de soja como fonte de carbono (ONGHENA et al., 2011).

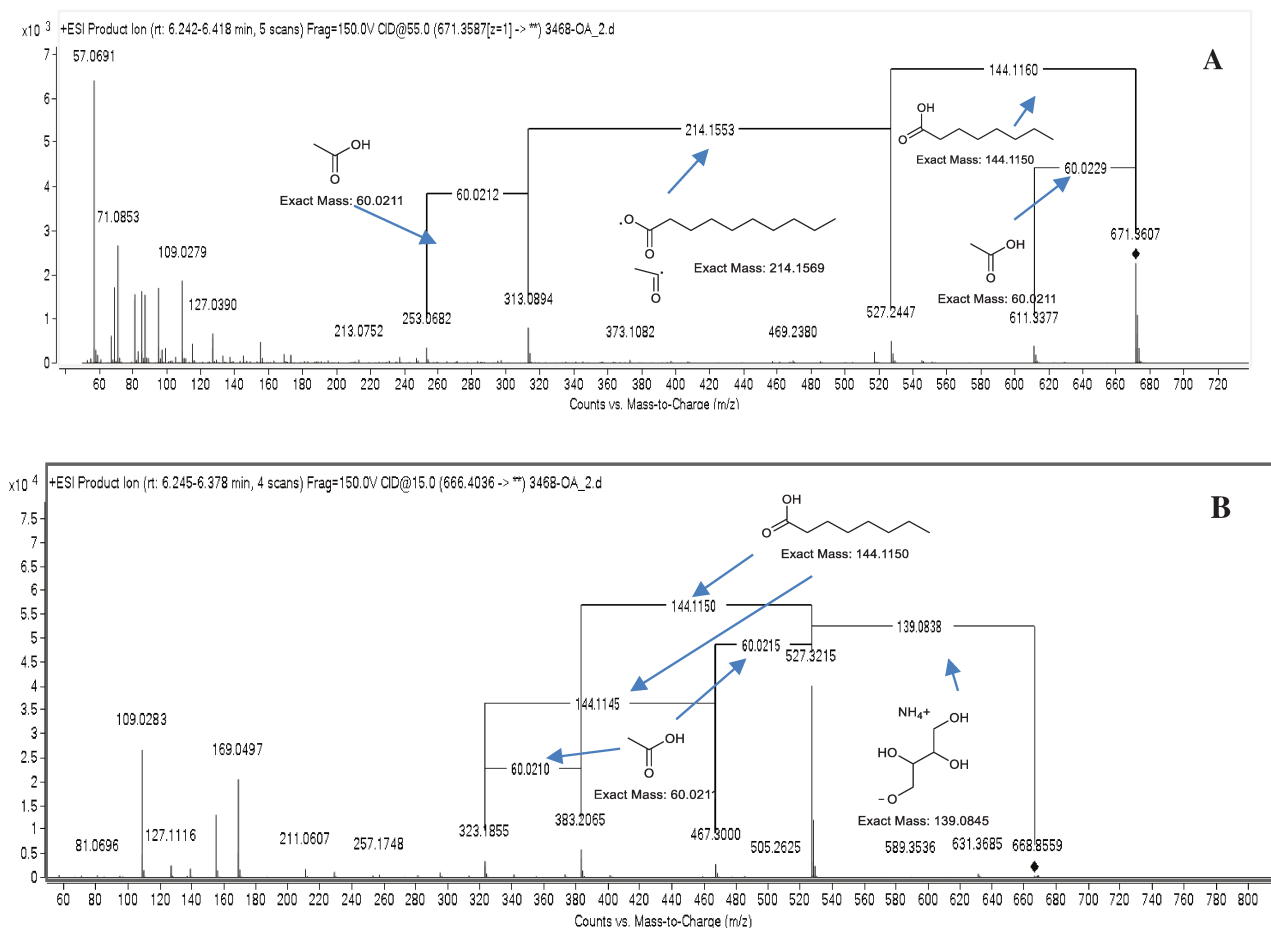


Figura 11. Perfil de fragmentação do MEL-A majoritário produzido por *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3468 em meio mínimo contendo ácido oleico como fonte de carbono. (A) isoforma $[M+Na]^+$ de MEL-A-18; (B) isoforma $[M+NH_4]^+$ de MEL-A-18.

O padrão de fragmentação da isoforma de MEL-B/MEL-C-18 na forma sodiada e amoniada é apresentado na Figura 12. Pode-se observar que assim como o MEL-A, há a perda do resíduo de eritritol da forma amoniada, m/z 139, além de perdas de apenas um resíduo de grupamento de ácido, proveniente de um grupamento acetila, denotando dessa maneira que o composto em questão seria mono-acetilado, condizente com o esperado para MEL-B e MEL-C. Além disso, os íons referentes à forma $[M+NH_4]^+$ e ao íon após a perda de eritritol $[M+NH_4-C_4H_{10}O_4]^+$, m/z 625 e 485, são os mesmos que os descritos para MEL-B produzido por *P.*

aphidis DSMZ 70725, comprovando a identificação de maneira adequada dessa isoforma (ONGHENA et al., 2011).

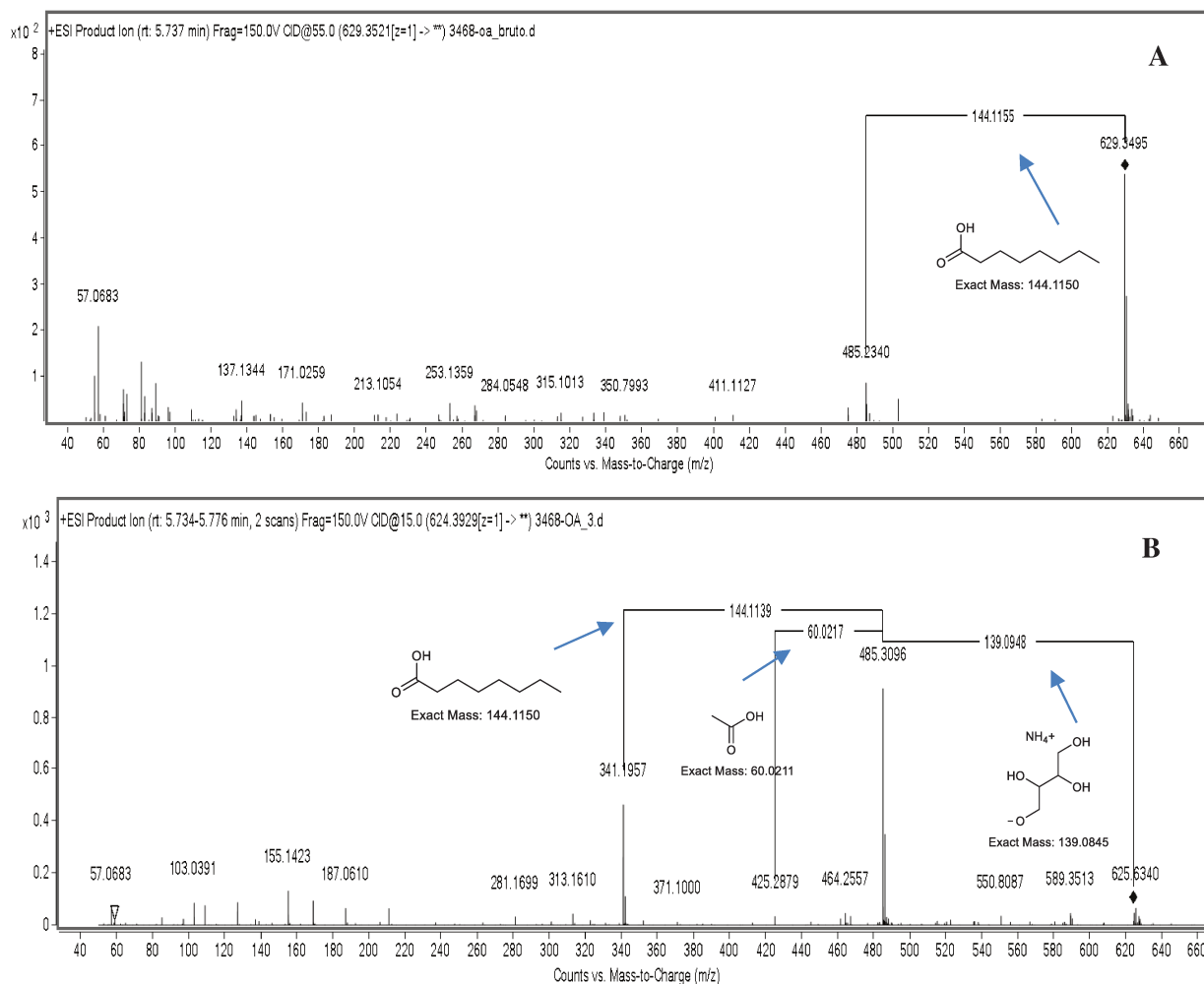


Figura 12. Perfil de fragmentação do MEL-B/MEL-C majoritário produzido por *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3468 em meio mínimo contendo ácido oleico como fonte de carbono. (A) isoforma $[M+Na]^+$ de MEL-B/MEL-C-18; (B) isoforma $[M+NH_4]^+$ de MEL-B/MEL-C-18.

Por fim, em relação ao perfil de fragmentação do MML (Figura 13), foi observada a perda do resíduo correspondente à molécula de manitol $[M-C_6H_{14}O_6]^+$ com m/z de 199, diferenciando esse biossurfactante dos demais produzidos pela linhagem de *P.aphidis* UFMG-Y3468 utilizando ácido oleico como fonte de carbono. Além disso, pode ser observado a perda de dois resíduos de ácido acético, m/z 60, pela forma $[M+Na]^+$ indicando que esse composto apresenta dois grupamentos acetila nos carbonos C4' e C6' da manose. Em relação aos grupamentos acila de ácidos graxos dos carbonos C2' e C3', foi observada a perda de dois diferentes fragmentos, m/z 144 e m/z 214, que assim como verificado para o MEL-A-18,

correspondem às cadeias C8:0 e C10:0 de ácidos graxos, podendo assim identificar o MML produzido, como MML-18-A. O peso molecular e essa composição de ácidos graxos foram as mesmas que as encontradas no MML produzido por *P. parantarctica* JCM 11752 descrito por Morita e colaboradores (2009).

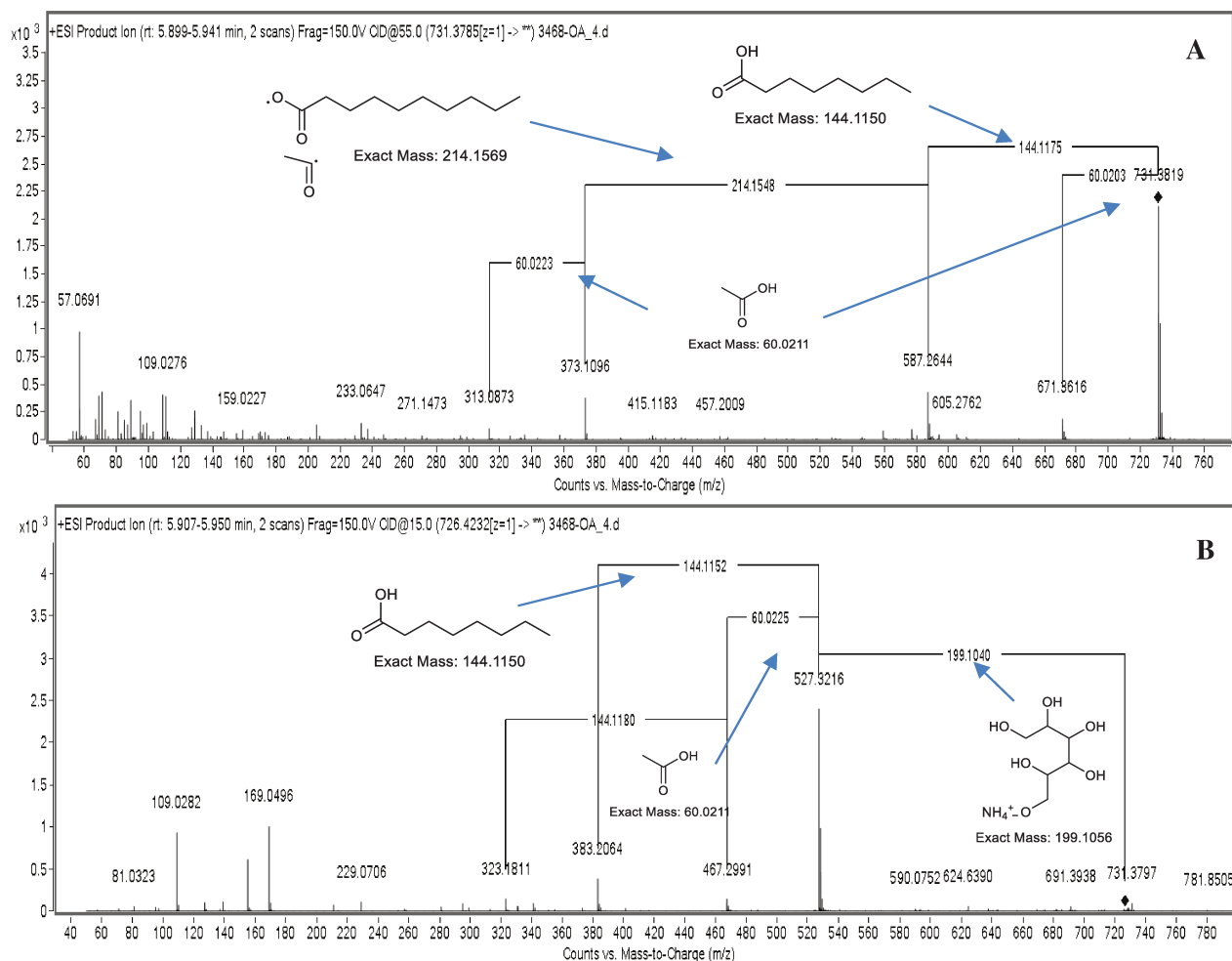
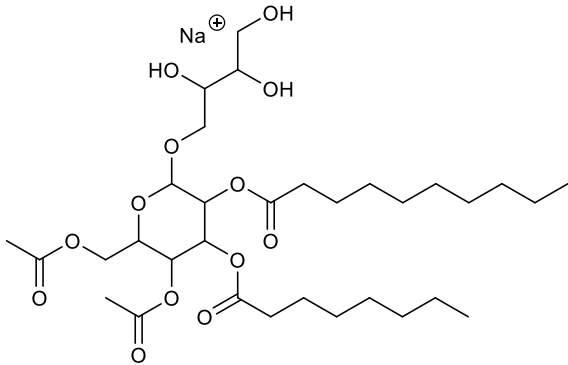
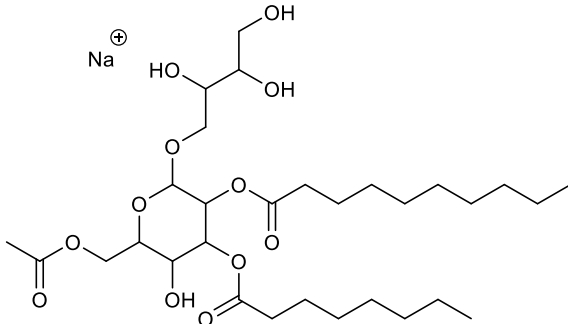
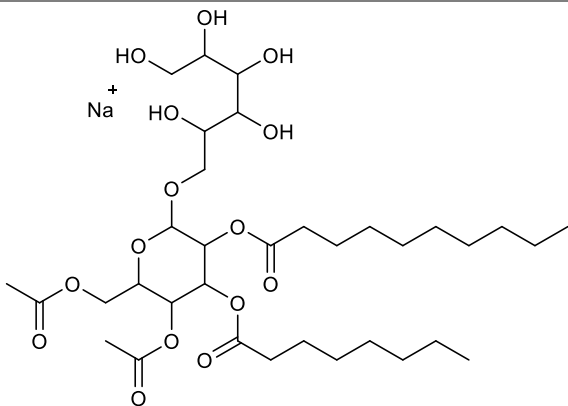


Figura 13. Perfil de fragmentação do MML-18 majoritário produzido por *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3468 em meio mínimo contendo ácido oleico como fonte de carbono. (A) isoforma [M+Na]⁺ de MML-18; (B) isoforma [M+NH₄]⁺ de MML-18.

Portanto, com base nos resultados apresentados as estruturas dos MELs produzidos foram propostas e constam na Tabela 5.

Tabela 5. Isoformas majoritárias de cada tipo de biossurfactante encontrado no cultivo de *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3468 em meio mínimo contendo ácido oleico como fonte de carbono identificadas por espectrometria de massas.

Isoforma	Estrutura química	Fórmula molecular	Massa exata (a.m.u)
MEL-A-18		$C_{32}H_{56}NaO_{13}^{+}$	671,3613
MEL-B/ MEL-C-18		$C_{30}H_{54}NaO_{12}^{+}$	629,3507
MML-A-18		$C_{34}H_{60}NaO_{15}^{+}$	731,3824

5.4 Purificação e caracterização dos biossurfactantes produzidos por *Pseudozyma aphidis* UFMG-Y3468 utilizando diferentes fontes de carbono

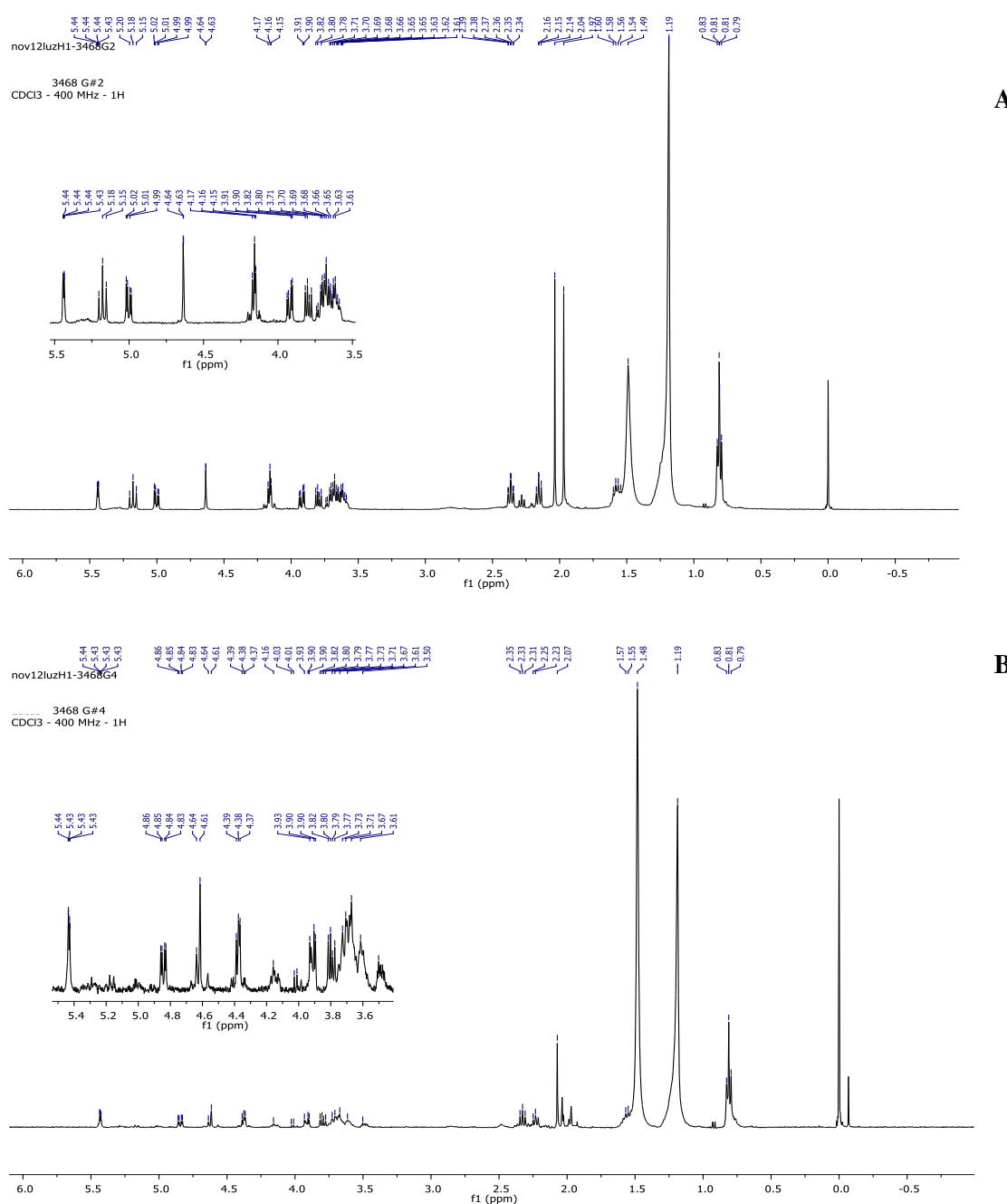
Considerando que houve variação na composição dos biossurfactantes produzidos utilizando glicose e ácido oleico, foram realizados experimentos para a purificação e caracterização desses compostos. Para isso, a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 foi cultivada em frascos de 1L contendo 400 mL de meio de cultivo mínimo suplementado com glicose ou ácido oleico. O processo foi conduzido por 10 dias e após esse período o meio de cultivo foi centrifugado e extraído com acetato de etila (1:1). A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio e concentrada em evaporador rotativo. O extrato bruto obtido foi então lavado com solução hexano:metanol:água (1:6:3) e purificado através de cromatografia em coluna aberta empacotada com sílica flash ou em cromatoplaças de TLC.

Foram obtidos 0,9 g/L de extrato bruto para o cultivo com glicose como fonte de carbono e 12,03 g/L de extrato bruto para o cultivo com ácido oleico. Essa diferença era esperada com base nos resultados de estudos que compararam o uso de substratos hidrofílicos (glicose) e hidrofóbicos (óleo de soja) como fontes de carbono para a produção de MEL por linhagens de *P. antarctica* T-34 e *P. aphidis* ATCC 32657 (MORITA et al., 2007). Além disso, apesar da quantidade de MEL produzida utilizando meio de cultivo com glicose ser menor que 1 g/L, esse valor foi similar aos reportados para linhagens de *P. parantarctica* e *P. antarctica*, onde foram produzidos 1,2 g/L e 1,3 g/L, respectivamente, utilizando esse mesmo substrato (FUKUOKA et al., 2007).

Apesar da menor concentração observada com o uso de glicose, tem-se sugerido que essa abordagem seria potencialmente vantajosa uma vez que facilitaria o processo de purificação (MORITA et al., 2007; RAU et al., 2005b). Nesse caso, foi observado que o caldo livre de células após centrifugação no cultivo com o uso de ácido oleico possuía grande quantidade de substrato, sendo esse um potencial interferente no processo de purificação uma vez que possuía grande solubilidade em acetato de etila utilizado no processo de extração, sendo requerida uma etapa de lavagem do extrato bruto. Em contrapartida, o caldo livre de células do cultivo com glicose se mostrou menos complexo e de fácil extração.

Após o processo de purificação, foram recuperados 2,59 mg de MEL-A e 1,90 mg de MEL-B do extrato bruto produzido com glicose. Esses compostos foram então caracterizados por RMN ^1H e espectrometria de massas para a confirmação de suas estruturas

químicas. Na Figura 14 estão representados os perfis dos espectros de RMN ^1H para esses compostos purificados.



tipo de manosileritritol lipídeo. Além disso, com base nos valores dos deslocamentos químicos dos outros prótons da molécula, observados na tabela 6, foi confirmada a estrutura uma vez que foram os mesmos encontrados em trabalhos anteriores em que a produção de MEL-A foi reportada (MORITA et al., 2009b; FAN et al., 2017).

Tabela 6. Deslocamentos químicos dos MELs produzidos por *P. aphidis* Y3468 em meio mineral contendo 1% de glicose como fonte de carbono.

Prótons	¹ H NMR δ (ppm)	
	MEL-A	MEL-B/ MEL-C
D-manose		
H-1' (C-1')	4,64 d	4,64 d
H-2' (C-2')	5,44-5,47 dd	5,43-5,44 dd
H-3' (C-3')	4,99-5,02 dd	4,83-4,86 dd
H-4' (C-4')	4,15-4,17 m	4,15-4,16 m
H-5' (C-5')	3,61-3,71 m	3,61-3,73 m
H-6' (C-6')	3,80-3,82 m	3,77-3,82m
meso-Eritritol		
H-1 (C-1)	3,61-3,82 m	3,61-3,82 m
H-2 (C-2)	3,61-3,82 m	3,61-3,82 m
H-3 (C-3)	3,61-3,82 m	3,61-3,82 m
H-4a (C-4a)	3,61-3,82 m	3,61-3,82 m
H-4b (C-4b)	3,90-3,91 dd	3,90-3,93 dd
Grupo acetila (s)		
-CH ₃	2,14; 1,97 s	2.07 s
Grupos acila		
-CH ₃	0,79-0,83 m	0,79-0,83 m
-(CH ₂) _n	1,19 b	1,19 b
-CO-CH ₂ - (C-3')	2,14-2,16 m	2,31 m
-CO-CH ₂ - (C-2')	2,34-3,39 m	2,35 m
-CO-CH ₂ -CH ₂ -	1,49-1,60 b	1,48-1,57 b

s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; t, triplet; m, multiplet; b, broad

Comparativamente, foram observadas similaridades para os deslocamentos químicos atribuídos aos H1-H4 do resíduo de eritritol (δ 3,61- 3,93m) e H1'-H6' do resíduo de manose (δ 4,64d, δ 5,44dd, δ 4,99dd, δ 4,86dd, δ 4,15m, δ 3,61m e δ 3,82m) tanto para o MEL-A quanto para o MEL-B, o que era esperado uma vez que esses compostos apresentaram a mesma estrutura manose-eritritol diferindo apenas na quantidade de grupamentos acetila na molécula, dois para MEL-A e um para MEL-B, respectivamente. Esse padrão de deslocamento foi observado para os MEL-A MEL-B e MEL-C reportados nos trabalhos de Morita e colaboradores (2008c), Fukuoka e colaboradores (2008b) e Yamamoto e colaboradores (2013).



Figura 15. Espectro de RMN ^1H dos biossurfactantes produzidos por *P. aphidis* UFMG-Y3468 em meio mínimo contendo ácido oleico. (A) MEL-A-18; (B) MEL-B/MEL-C; (C) MML-18.

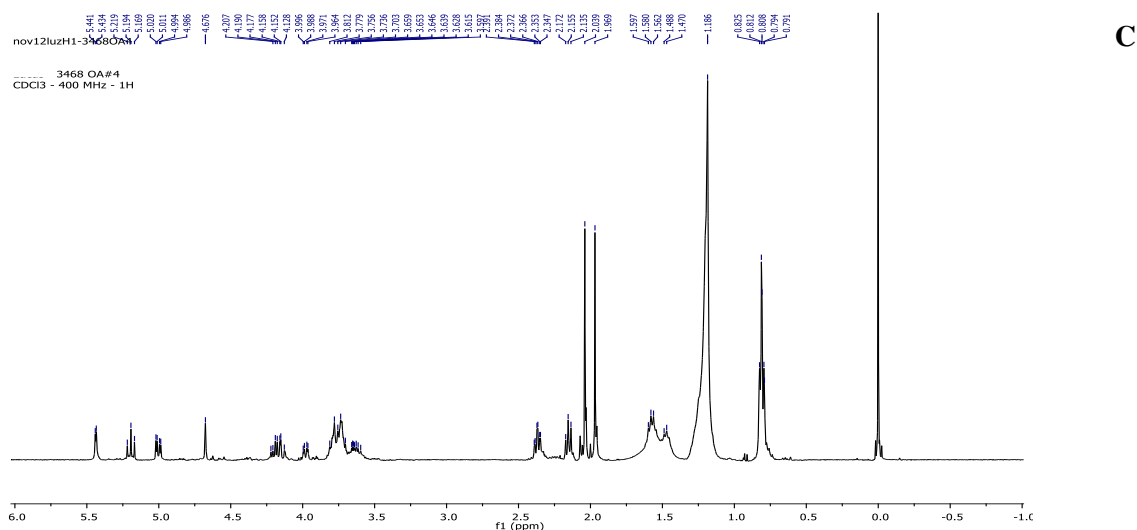


Figura 15. Espectro de RMN ^1H dos biossurfactantes produzidos por *P. aphidis* UFMG-Y3468 em meio mínimo contendo ácido oleico. (A) MEL-A-18; (B) MEL-B/MEL-C; (C) MML-18.

Com base nos perfis de RMN ^1H apresentados, observou-se que o MEL-A produzido utilizando ácido oleico possui grande similaridade estrutural com aquele encontrado utilizando glicose como fonte de carbono, tanto para os deslocamentos químicos dos prótons H1'-H6' do resíduo de manose como para os atribuídos para os prótons H1-H4 do resíduo de eritritol (Tabela 7). O mesmo se aplica para os deslocamentos químicos dos prótons dos dois grupos acetilas, sendo observados valores de δ 2,14s, δ 1,97s para o MEL-A produzido em glicose e δ 2,03s, δ 1,97s para o produzido com ácido oleico. Os perfis característicos de MEL-B/MEL-C também se mostraram muito similares independente da fonte de carbono utilizada.

Em relação ao perfil de RMN ^1H do MML produzido (Figura 15C), pode-se notar que se trata de um derivado diacetilado pois foram detectados dois deslocamentos químicos, δ 2,03s e δ 1,96s, com multiplicidade idêntica aos encontrados em MEL-A. Dessa forma, o MML produzido pela *P. aphidis* UFMG-Y3468 em meio mínimo contendo ácido oleico pode ser denominado como MML-A. A produção desse tipo de biossurfactante foi reportado pela primeira vez em um processo conduzido com a linhagem de *P. parantarctica* JCM 11752, onde os deslocamentos para os prótons H1'-H6' do resíduo de manose e de H1-H6 do resíduo de manitol foram similares ao encontrado para *P. aphidis* UFMG-Y3468.

Tabela 7. Deslocamentos químicos dos MELs produzidos por *P. aphidis* UFMG-Y3468 em meio mineral contendo 1% de ácido oleico como fonte de carbono.

Prótons	¹ H NMR δ (ppm)		
	MEL-A	MEL-B/MEL-C	MML-A
D-manose			
H-1' (C-1')	4,65 s	4,61 s	4,67 s
H-2' (C-2')	5,43-5,44 dd	5,42-5,43 dd	5,43-5,44 dd
H-3' (C-3')	4,98-5,0 dd	4,83 dd	4,98-5,02 dd
H-4' (C-4')	5,20 t	4,15-4,16 m	5,16-5,21 t
H-5' (C-5')	3,60-3,70 m	3,57-3,72 m	3,59-3,63 m
H-6' (C-6')	4,20 m	4,36-4,38 m	4,12-4,20m
meso-Eritritol			
H-1 (C-1)	3,57-3,78 m	3,57-3,90 m	-
H-2 (C-2)	3,57-3,78 m	3,57-3,90 m	-
H-3 (C-3)	3,57-3,78 m	3,57-3,90 m	-
H-4a (C-4a)	3,76 m	3,75-3,77 m	-
H-4b (C-4b)	3,91 dd	3,90 dd	-
D-manitol			
H-1a	-	-	5,59m
H-1b	-	-	3,81m
H2-5	-	-	3,59-3,81m
H-6a	-	-	3,75dd
H-6b	-	-	3,99dd
Grupo acetila (s)			
-CH ₃	2,03; 1,97 s	2,07 s	2,03; 1,96 s
Grupos acila			
-CH ₃	0,79-0,82 b	0,79-0,82 b	0,79-0,82 b
-(CH ₂) _n	1,18-1,25 b	1,18 b	1,18 b
-CO-CH ₂ - (C-3')	2,25 m	2,23 m	2,23 m
-CO-CH ₂ - (C-2')	2,38 m	2,34 m	2,34-2,39 m

s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; t, triplet; m, multiplet; b, broad

Os resultados das análises de caracterização por RMN permitiram confirmar a capacidade da linhagem de *P. aphidis* Y3468 em produzir três tipos de biossurfactantes glicolipídicos quando ácido oleico foi utilizado como fonte de carbono, sendo essa a primeira vez que a produção de MML é reportada para leveduras dessa espécie.

Com intuito de verificar se a capacidade em produzir MML era exclusiva da *P. aphidis* Y3468, uma segunda linhagem da mesma espécie que apresentou resultados satisfatórios na etapa de *screening* foi selecionada e cultivada com ácido oleico como fonte de carbono. Entre as três linhagens restantes que possuíam potencial, foi selecionada a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y5768, uma vez que o extrato livre de células desse micro-organismo

exibiu baixos valores de tensão superficial e CMD^{-1} quando cultivado em glicose, óleo de soja e ácido oleico. Assim, a produção e os processos de extração e purificação foram realizados da mesma forma como a descrita para a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468.

Os resultados obtidos mostraram que essa linhagem foi capaz de produzir apenas dois tipos de MEL, sendo identificados como MEL-A e MEL-B/MEL-C. Após a etapa de purificação foram recuperados 3,37 mg de MEL-A e 2,02 mg de MEL-B. Os respectivos espectros de RMN ^1H e perfil de descolamentos químicos para esses compostos são apresentados na Figura 16 e Tabela 8, respectivamente.

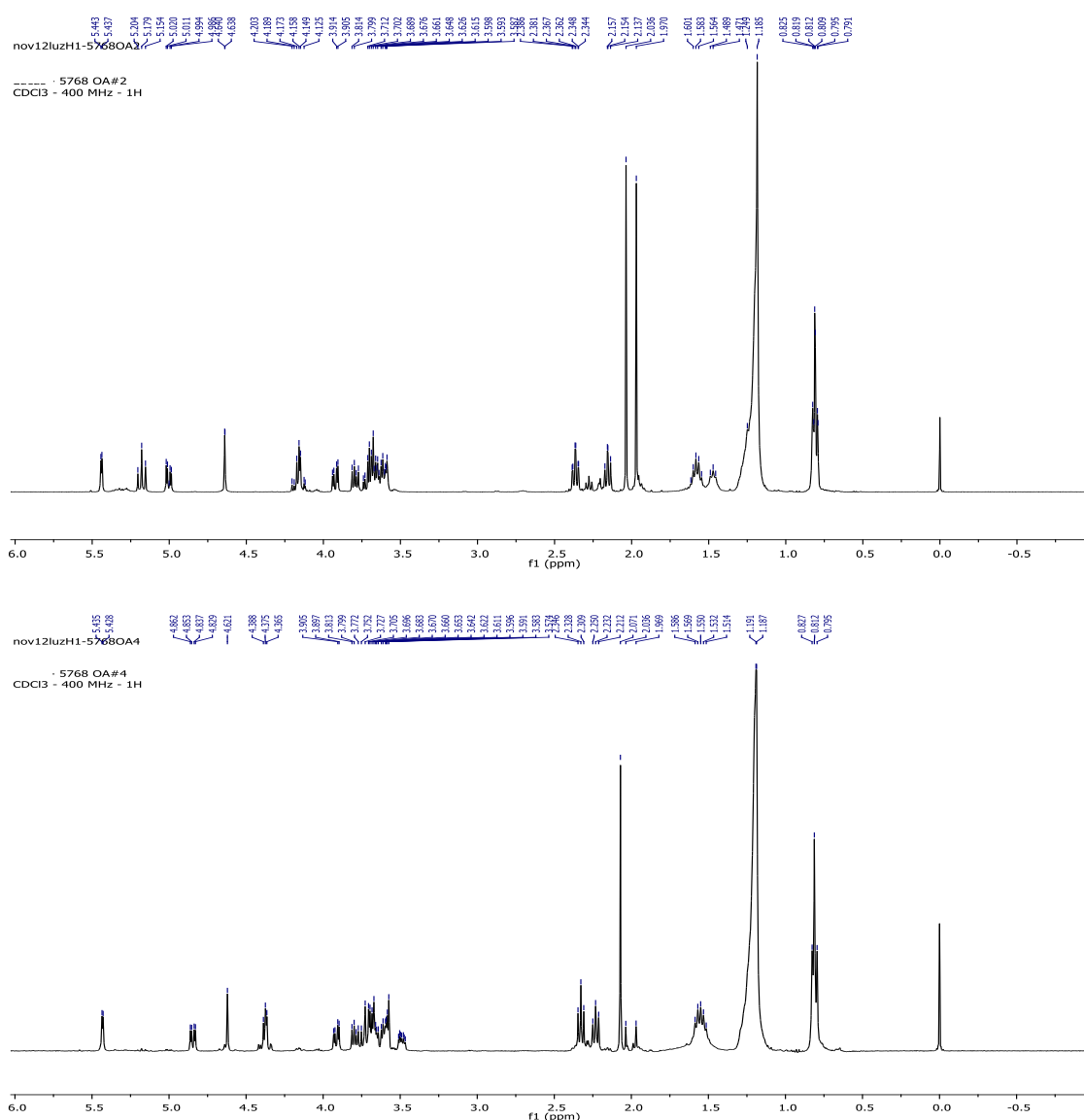


Figura 16. Espectro de RMN ^1H dos biossurfactantes produzidos por *P. aphidis* UFMG-Y5768 em meio mínimo contendo ácido oleico. (A) MEL-A (B) MEL-B/MEL-C.

Os deslocamentos químicos dos MELs produzidos pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y5768 para os prótons H1'-H6' do resíduo de manose e para os prótons H1-H4 do resíduo de eritritol foram muito similares aos descritos anteriormente para a linhagem UFMG-Y3468, demonstrando que essas espécies possuem seletividades de produção de tipos de MEL distintas. Além disso, com a identificação por espectrometria de massas foi demonstrado que as diferenças dos MEL-A produzidos se encontravam nos grupamentos acila, sendo os majoritários C20:0 e C22:0.

Tabela 8. Deslocamentos químicos dos MELs produzidos por *P. aphidis* UFMG-Y5768 em meio mineral contendo 1% de ácido oleico como fonte de carbono.

Prótons	¹ H NMR δ (ppm)	
	MEL-A	MEL-B
D-manose		
H-1' (C-1')	4,65 s	4,62 s
H-2' (C-2')	5,42-5,40 dd	5,42-5,43 dd
H-3' (C-3')	4,98-5,0 dd	4,82-4,86 dd
H-4' (C-4')	5,20 t	5,15-5,20 t
H-5' (C-5')	3,60-3,70 m	3,58-3,68 m
H-6' (C-6')	4,20 m	4,12-4,20 m
meso-Eritritol		
H-1 (C-1)	3,57-3,78 m	3,57-3,79 m
H-2 (C-2)	3,57-3,78 m	3,57-3,79 m
H-3 (C-3)	3,57-3,78 m	3,57-3,79 m
H-4a (C-4a)	3,76 m	3,75-3,79 m
H-4b (C-4b)	3,91 dd	3,81-3,86 dd
Grupo acetila (s)		
-CH ₃	2,03; 1,97 s	2,07 s
Grupos acila		
-CH ₃	0,79-0,82 b	0,79-0,82 b
-(CH ₂) _n	1,18-1,25 b	1,18-1,24 b
-CO-CH ₂ - (C-3')	2,25 m	2,21-2,25 m
-CO-CH ₂ - (C-2')	2,38 m	2,30-2,34 m

s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; t, triplet; m, multiplet; b, broad

Portanto, com base em todos os resultados de caracterização ficou comprovada a seletividade diferencial na produção de MEL em uma mesma espécie de *P. aphidis* dependendo da fonte de carbono empregada. Esse mesmo comportamento foi descrito para a linhagem de *P. churashimaensis* OK96 isolada de folhas de cana-de-açúcar, em que diferentes MELs foram produzidos quando glicose e óleo de soja foram utilizados como fontes de carbono separadamente (MORITA et al., 2011a).

Além disso, com base nos resultados apresentados foi observada também uma seletividade diferencial intra-espécie haja visto que cada linhagem de *P. aphidis* foi capaz de produzir isoformas majoritárias diferentes utilizando o mesmo substrato. Esse fato pode ser justificado considerando que as linhagens *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5768 foram isoladas de diferentes locais e assim podem possuir características metabólicas diferenciais em relação a biossíntese de biossurfactantes. A primeira linhagem foi isolada de amostra de água coletada na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) – Santuário do Caraça, no município de Catas Altas, no estado de Minas Gerais em estudo de isolamento realizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos Rosa da UFMG no ano de 2011. A linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y5768 foi isolada posteriormente em 2013 pelo mesmo grupo de pesquisa a partir de um besouro da família *Nitidulidae*, coletado no Parque Estadual da Ilha Grande, no município de Angra dos Reis, estado do Rio de Janeiro.

As diferenças metabólicas entre as linhagens de *P. aphidis* podem ser atribuídas ao conjunto de genes envolvidos na biossíntese de glicolipídeos. Nesse contexto, foi reportado a expressão de diferentes *clusters* de genes envolvidos biossíntese de biossurfactantes glicolipídicos em espécies de *P. aphidis*, sendo observado, por exemplo, na linhagem de *P. aphidis* DSM 70725 a expressão de genes que conferiam a capacidade de produção de manosileritritol lipídeos do tipo A, B, C e D, além de um cluster de genes responsável pela produção de celobiose lipídeos quando essa espécie foi cultivada em condições de limitação de nitrogênio (LORENZ et al., 2014). Analogamente, Günther e colaboradores (2015) em um estudo de transcriptômica demonstraram que essa mesma espécie de *P. aphidis* apresentava diferentes comportamentos em termos de produção de MELs quando em condições de presença e ausência de óleo de soja no meio de cultivo. Esses autores observaram que quatro dos cinco *clusters* de genes requeridos na biossíntese de MELs foram claramente induzidos pela presença do componente hidrofóbico. Previamente Morita e colaboradores (2013) descreveram a produção de celobiose lipídeos pela linhagem de *P. aphidis* JCM 10318 também em condições de limitação de nitrogênio e a partir da análise de genes expressos por essa linhagem foi verificado a presença de um gene *cyp1* envolvido na expressão de uma oxidoreductase P450 essencial para a biossíntese de celobiose lipídeos. Além disso, foi demonstrado que esse gene compartilhava 78% de similaridade com aquele ao descrito para a linhagem de *U. maydis*. Portanto, as variações na composição de MELs encontradas entre as espécies de *P. aphidis* e a variação observada para a mesma espécie em diferentes fontes de

carbono são esperadas considerando as possíveis variações no arsenal enzimático envolvido na produção de metabolitos secundários.

5.5 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) e Balanço Hidrofílico-lipofílico (*Hydrophilic and lipophilic balance*, HLB) dos biossurfactantes purificados

A CMC é um parâmetro muito útil e determina a eficiência de um composto tensoativo, incluindo os biossurfactantes (SANTOS et al., 2016). Esse parâmetro pode ser influenciado por diferentes fatores, como temperatura, força iônica, presença de impurezas e principalmente pelas características estruturais dos compostos, como tamanho das cadeias na porção hidrofóbica e presença de cargas na porção hidrofílica (CORAZZA et al., 2009; MANAARGADOO-CATIN et al., 2016; NGUYEN et al., 2008; VISHNYAKOV et al., 2013). Além disso, a CMC fornece informações que direcionam as potenciais aplicações do composto tensoativo, incluindo biorremediação, detergentes, ingrediente em formulações cosméticas e farmacêuticas, entre outros (MAO et al., 2015; LÉMERY et al., 2015). São considerados eficientes aqueles compostos tensoativos que apresentam baixos valores de CMC, denotando que uma quantidade muito baixa é necessária para que o efeito de redução de tensão superficial seja observado, enquanto que a efetividade se refere a redução no valor de tensão, sendo que quanto menor o valor de tensão obtido, maior será a efetividade do composto (DESAI & BANAT, 1997; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Portanto, considerando a importância desse parâmetro, foram determinadas as CMCs dos diferentes tipos de MELs produzidos pelas linhagens de *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5768 em ácido oleico (Tabela 9). Considerou-se como valor calculado de CMC (mg/L) o ponto de intersecção obtido quando são traçadas duas retas no gráfico de redução de tensão em função da concentração (Figura 17). O valor de CMC (molar) foi calculado considerando a contribuição de cada isoforma, dada pelo percentual de abundância relativa obtido nas análises de LC-ESI-MS. Entre os três tipos de biossurfactantes produzidos pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468, o MML pode ser considerado o mais eficiente, uma vez que seu valor de CMC foi o menor entre os calculados, reduzindo a tensão para cerca de 26,60 mN/m. Sua efetividade em termos de tensão superficial foi praticamente a mesma que a do MEL-A (26,07mN/m), que possui um valor de CMC cerca de duas vezes maior que o do MML.

Tabela 9. Valores de CMC e tensão superficial na CMC (γ_{CMC}) para os MELs produzidos por *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5768 em meio mineral contendo 1% de ácido oleico como fonte de carbono.

Biossurfactante	MM (g/mol)	AR (%)	CMC _{calc} (mg/L)	CMC _{calc} (M)	γCMC _{calc} (mN/m)	γC _{exp} (mN/m)
MEL-A <i>P. aphidis</i> UFMG-Y3468						
18:1	669,34	0,87	1,81± 0,14	2,77×10 ⁻⁶	27,22± 0,19	26,07± 0,14
18	648,38	82,41				
20:1	674,40	0,96				
20	676,40	15,23				
22	704,43	0,53				
MEL-B/MEL-C <i>P. aphidis</i> UFMG-Y3468						
18B/C	606,36	45,98	1,26± 0,57	2,03×10 ⁻⁶	36,56± 4,45	29,14± 0,20
18B/C	606,36	18,33				
20B/C	634,39	20,13				
20B/C	634,49	5,44				
22	662,42	4,30				
24	690,45	5,78				
MML-18-A <i>P. aphidis</i> UFMG-Y3468						
18	708,40	100	0,96± 0,23	1,35×10 ⁻⁶	31,81± 1,34	26,60± 0,19
MEL-A <i>P. aphidis</i> UFMG-Y5768						
18	648,37	6,84	4,96± 0,28	7,42×10 ⁻⁶	28,24± 1,85	27,24± 0,13
20:1	674,40	8,13	3,65± 0,44	5,75×10 ⁻⁶	28,48± 3,75	27,24± 0,14
20	676,40	74,28				
22:1	702,42	2,82				
22	704,43	6,62				
MEL-B/MEL-C <i>P. aphidis</i> UFMG-Y5768						
20B/C	634,39	69,57	3,65± 0,44	5,75×10 ⁻⁶	28,48± 3,75	27,24± 0,14
20B/C	634,39	30,42				

MM: massa molar; AR: abundância relativa; CMC_{calc}: ponto de intersecção calculado; γ_{CMC} : tensão superficial na CMC calculada; $\gamma_{\text{C}_{\text{exp}}}$: menor valor de TS observado experimentalmente.

Comparando-se o MEL-A produzido pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 com o produzido pela *P. aphidis* UFMG-Y5768, pode-se notar que o glicolípídeo produzido pela primeira linhagem é mais eficiente, com um valor de CMC de $2,77 \times 10^{-6}$ M, enquanto que o MEL-A produzido pela segunda linhagem possui um o valor cerca de $2,7 \times$ maior para esse parâmetro, $7,42 \times 10^{-6}$ M. A mesma tendência é encontrada para o MEL do tipo B, sendo que o produzido pela *P. aphidis* UFMG-Y3468 exibiu uma CMC de $2,03 \times 10^{-6}$ M e o produzido pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y5768 foi de $5,75 \times 10^{-6}$ M, sendo esse valor $2,8 \times$ maior em termos numéricos.

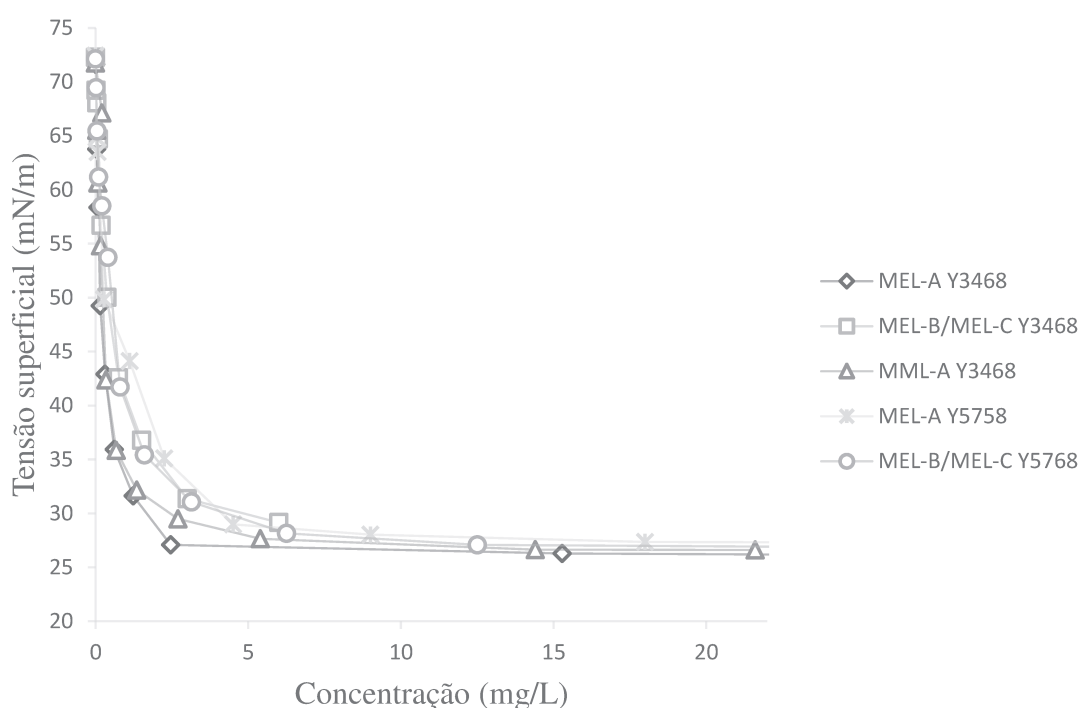


Figura 17. Perfil de redução superficial de acordo com a concentração dos biossurfactantes purificados produzidos por *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5768 em meio mínimo contendo ácido oleico.

A contribuição das isoformas majoritárias nos valores de CMCs dos MELs produzidos pelas leveduras estudadas nesse trabalho pode explicar a eficiência diferencial desses glicolípídeos. O MEL-A mais eficiente foi aquele com isoformas com menor número de carbonos na porção hidrofóbica, onde o MEL-A produzido pela *P. aphidis* UFMG-Y3468 apresentou 82% de C18 e o produzido pela *P. aphidis* UFMG-Y5768 era composto basicamente por 93% de isoformas com mais de 20 carbonos na porção hidrofóbica. A mesma correlação foi observada para o MEL do tipo B, uma vez que o MEL-B produzido pela *P. aphidis* UFMG-

Y3468 possui 64% de isoformas C18 e o produzido pela *P. aphidis* UFMG-Y5768 possui apenas isoformas C22.

A influência das características estruturais das cadeias de ácidos graxos da porção hidrofóbica nas propriedades tensoativas de MELs tem sido proposta por alguns autores. Yamamoto e colaboradores (2013) observaram esse tipo de influência em MELs do tipo B produzidos por *P. tsukubaensis* NBRC1940 utilizando diferentes fontes de carbono. O MEL-B convencional produzido com óleo de oliva possuía uma CMC de $4,5 \times 10^{-6}$ M com uma tensão de 28,2 mN/m, enquanto que o novo MEL-B produzido com óleo de rícino mostrou um valor de $2,2 \times 10^{-5}$ M, com tensão de 28,5 mN/m. Essa grande diferença foi atribuída principalmente ao fato de que esse segundo MEL-B possuía uma cadeia hidrofóbica hidroxilada, oriunda da incorporação do ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-cis-9-octadecenóico), ácido graxo majoritário do óleo de rícino.

Em estudo desenvolvido por Fukuoka e colaboradores (2007) diferenças significativas em termos de CMC foram verificadas para o MEL-A e MEL deacetilado e mono-acilado produzido por *P. antarctica* T-34 utilizando glicose como fonte de carbono. O MEL-A convencionalmente produzido por essa linhagem apresentou uma CMC de $2,7 \times 10^{-6}$ M e uma tensão de 28,4 mN/m, enquanto que o MEL deacetilado e mono-acilado apresentou uma CMC de $3,6 \times 10^{-4}$ M com valor de tensão superficial de 33,8 mN/m. Portanto, foi demonstrado o papel das cadeias de ácidos graxos e do grau de acetilação na eficiência e efetividade de MELs, sendo que a ausência de uma cadeia de ácido graxo foi determinante para que o valor de CMC do MEL mono-acilado fosse bem superior ao do MEL-A.

Além disso, foi demonstrado recentemente que o MEL do tipo D (deacetilado) produzido por uma linhagem mutante de *P. hubeiensis*, SY62-MM36 utilizando glicose e óleo de oliva como fontes de carbono apresentava uma CMC de $2,0 \times 10^{-5}$ M com uma tensão de 29,7 mN/m e seu análogo triacilado (com uma cadeia de ácido graxo esterificada no resíduo de eritritol) uma CMC de $3,0 \times 10^{-5}$ M (KONISHI & MAKINO, 2018). Dessa forma, modificações na composição das cadeias hidrofóbicas e no grau de acetilação são fatores que influenciam a CMC dos MELs, sendo importante salientar que quando C4' e C6' do resíduo manopiranosil são substituídos por grupos hidroxilas, os MELs exibem alto caráter hidrofílico que leva ao aumento dos valores de CMC (YU et al., 2015).

Portanto, os resultados em termos de CMC e γ CMC dos MELs produzidos pelas linhagens de *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5768 podem ser considerados promissores, sendo o MML-A-18 o mais eficiente entre os glicolípídeos produzidos. Esses compostos possuem grande potencial para aplicações em formulações cosméticas para uso tópico, haja visto que valores de CMC baixos são desejáveis para tensoativos incorporados a esse tipo de formulação pois estão relacionados a um menor potencial irritante, diferente dos tensoativos sintéticos aplicados, como os lauril sulfatos, considerados irritantes primários para a pele (CORAZZA et al., 2009; LÉMERY et al., 2015). Além disso, a substituição do resíduo de eritritol pelo de manitol no MML pode contribuir para outras atividades e aplicações a serem exploradas, uma vez que o manitol possui reconhecida atividade hidratante e antioxidante (ANDRÉ & VILLAIN, 2017; LIU et al., 2010; CONROZIER et al., 2014).

Analogamente ao CMC, o HLB também representa um importante parâmetro que é utilizado para direcionar as aplicações dos compostos tensoativos. É um índice relativo calculado com base na proporção entre o resíduo hidrofílico e a massa total do composto, relacionando um determinado valor, de 0 a 20, de acordo com sua estrutura química, e foi descrito por Griffin em 1949 para categorizar os surfactantes não-iônicos (PASQUALI et al., 2009; ZHENG et al., 2015).

Sendo assim, de acordo com o conceito proposto, se um surfactante possui valores de HLB de 3-6 seria categorizado como um tensoativo lipofílico (emulsificante água/óleo), de 7-9 como agente molhante, de 13-15 como detergente, e altos valores de HLB, entre 8-18, o composto seria categorizado como um tensoativo hidrofílico (emulsificante óleo/água) (GRIFFIN, 1949; PASQUALI et al., 2008; ZAFEIRI et al., 2017; HASSAS et al., 2014).

Além disso, o HLB tem sido utilizado na área de cosméticos como critério de seleção de surfactantes e emulsificantes para aplicações em formulações específicas (WILLIAMS, 2007; GENOT et al., 2013). Entretanto, poucos estudos têm reportado a determinação desse parâmetro para os biossurfactantes, limitando as informações aos seus índices de emulsificação e tensão superficial. A Tabela 10 apresenta os valores de HLB para todas as isoformas contidas em cada tipo de MEL produzido pelas duas linhagens de *P. aphidis* estudadas nesse trabalho.

Tabela 10. Valores de HLB dos MELs produzidos por *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5768 em meio mineral contendo 1% de ácido oleico como fonte de carbono.

Biossurfactante	MM	HLB _G
MEL-A <i>P. aphidis</i> UFMG-Y3468		
18:1	669,34	8,45
18	648,38	8,73
20:1	674,40	8,40
20	676,40	8,37
22	704,43	8,03
TOTAL		8,66*
MEL-B/MEL-C <i>P. aphidis</i> UFMG-Y3468		
18B/C	606,36	9,33
18B/C	606,36	
20B/C	634,39	8,92
20B/C	634,49	
22	662,42	8,54
24	690,45	8,20
TOTAL		9,12*
MML <i>P. aphidis</i> UFMG-Y3468		
18	708,40	9,63
MEL-A <i>P. aphidis</i> UFMG-Y5768		
18	648,37	8,73
20:1	674,40	8,39
20	676,40	8,37
22:1	702,42	8,06
22	704,43	8,03
TOTAL		8,25*
MEL-B/MEL-C <i>P. aphidis</i> UFMG-Y5768		
22B/C	634,39	8,92
22B/C	634,39	

* HLB da mistura de biossurfactantes calculada considerando a porcentagem de ocorrência de cada isoforma na fração purificada.

Pode-se observar que em relação ao HLB das isoformas de MEL-A, os valores variaram de 8,03 a 8,73, sendo que ao considerar a contribuição de cada isoforma com base em sua abundância relativa, o valor de HLB para o MEL-A produzido pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 foi de 8,66 e o produzido pela *P. aphidis* UFMG-Y5768 foi de 8,25. Esses valores são similares aos reportados para MEL-A na literatura, variando de 8,29 a 8,64 os MEL-A produzidos por linhagens de *P. antarctica* e *P. aphidis* (FUKUOKA et al., 2008; GOOSSENS et al., 2016). Esses valores são próximos aos encontrados para os surfactantes não-iônicos Arlacel 20 e Span 20 (HLB 8,6), tipicamente utilizados como emulsificantes água/óleo, agentes molhantes e lubrificantes (PASQUALI et al., 2008; ASH & ASH, 2010).

Os valores de HLB para os MEL-B, valor total considerando o percentual de isoformas encontradas, produzidos pelas linhagens de *P. aphidis* UFMG-Y5768 e UFMG-Y3468 foram de 8,92 e 9,12, respectivamente. O valor de HLB encontrado para a *P. aphidis* UFMG-Y5768, composto majoritariamente por isoformas C20, é muito similar aos reportados em estudos anteriores. Enquanto que o valor encontrado para o MEL-B da *P. aphidis* UFMG-Y3468 é levemente superior ao reportado para o MEL-B e MEL-C 20:0 produzido por *P. aphidis* MUCL 27852 (HLB 8,83) e MEL-B produzido por *P. tsukubaensis* NBRC 1940 (HLB 8,9), sendo essa diferença explicada pela composição de isoformas presentes no MEL-B purificado, composto majoritariamente, por cerca de 64%, por isoformas C18 (WORAKITKANCHANAKUL et al., 2009; GOOSSENS et al., 2016). Além disso, os valores de MEL-B descritos por outros autores e nesse trabalho são próximos ao do surfactante sintético Brij® L4/Laurteh 4 (HLB 9,0), utilizado como solubilizante e dispersante em produtos de higiene pessoal e cosméticos.

O valor de HLB calculado para o MML foi de 9,62, sendo o maior entre todos os MELs produzidos, e em relação a esse parâmetro, nenhum dado foi encontrado na literatura. Esse alto valor pode ser explicado com base nas características estruturais do MML, pois a massa molar do resíduo hidrofílico e a massa molecular total desse glicolípídeo são maiores que as dos outros MELs, possuindo, portanto, características diferenciadas. O valor de HLB do MML é próximo aos encontrados para os tensoativos químicos IGEPAL® CO-520 e polietileno sorbitol hexaoleato, utilizados no preparo de nanocompositos e nanopartículas, e como agente emulsificante, respectivamente (CHANG et al., 1994; CHANDRADASS & BAE, 2008).

Portanto, os valores de HBL e os de CMC encontrados para os biossurfactantes produzidos pelas linhagens de *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5768 podem ser

indicativo do potencial desses compostos para diversas aplicações, constituindo informações importantes para que seu uso seja realizado de forma direcionada.

5.6 Estudo da influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de MEL através de delineamento experimental e análise quimiométrica

5.6.1 Influência da composição do meio de cultivo na produção de MELs por *P. aphidis* UFMG- Y3468 através de delineamento experimental

O primeiro relato da produção de MELs ocorreu por volta de 1955, em um estudo realizado com uma cultura de *Ustilago maydis* PRL-627 produtora de celobiose lipídeos, sendo sua caracterização e categorização como glicolipídeos realizada mais tarde, em 1970, por Bhattacharjee e colaboradores em um processo conduzido com a mesma linhagem de micro-organismo (HASKINS et al., 1955; BHATTACHARJEE et al., 1970). Ao longo dos anos, com a realização de mais estudos, percebeu-se que os MELs eram produzidos como compostos majoritários em culturas de leveduras do gênero *Pseudozyma* sp. (KONISHI et al., 2007). Desde então, a maioria dos processos de produção biotecnológica de MELs por linhagens do gênero *Pseudozyma* sp., inclusive o de maior rendimento até hoje reportado (165 g/L), foi realizada utilizando basicamente um meio de cultivo simples, composto por KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 e extrato de levedura, adicionado de uma ou mais fontes de carbono, sendo o óleo de soja a mais utilizado (RAU et al., 2005; KITAMOTO et al., 1990; FUKUOKA et al., 2007; MORITA et al., 2008a).

Alguns estudos sugeriram a influência das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico na produção de MELs, indicando que extrato de levedura e NaNO_3 seriam as fontes de nitrogênio mais adequadas, levando a melhores rendimentos durante o processo biotecnológico (KONISHI et al., 2011; MORITA et al., 2008a; MORITA et al., 2011a). Entretanto, poucos estudos avaliaram a influência das fontes de carbono e nitrogênio simultaneamente na produção, bem como na composição estrutural de MELs obtidos. A maioria dos estudos se baseia na avaliação da viabilidade de fontes de carbono hidrofóbicas individuais, sendo encontrados poucos estudos em que foi reportado, em termos de rendimento, a diferença na produção de MELs utilizando fontes hidrofílicas e hidrofóbicas (FUKUOKA et al. 2007; MORITA et al., 2009c; FARIA et al., 2014).

Portanto, baseado no que foi encontrado em estudos anteriores com linhagens de *Pseudozyma* sp., foi proposto inicialmente o estudo da influência e a otimização das fontes de nitrogênio orgânico (extrato de levedura) e inorgânico (NaNO_3), bem como de fontes de carbono hidrofílica e hidrofóbica adicionadas simultaneamente no meio de cultivo, no crescimento e na produção de MELs pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 através de planejamento experimental.

A primeira opção seria utilizar um planejamento fracionado para as quatro variáveis (2^{4-1}) constituído de 12 ensaios ou ainda um planejamento do tipo Plackett & Burman, PB12 com cerca de 15 ensaios, entretanto essas estratégias, que são utilizadas para seleção de variáveis, só permitiriam o cálculo dos efeitos principais e indicações de quais variáveis deveriam ser incluídas em outros delineamentos, haja visto que esses tipos de planejamentos experimentais não permitem construir modelos preditivos e muito menos gerar superfícies de respostas (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Em contrapartida, o uso de planejamento do tipo DCCR mostrou-se mais adequado, uma vez que seria possível o cálculo dos efeitos principais, construção de modelos preditivos e de superfícies de resposta, possibilitando a otimização do processo biotecnológico.

Com base nos resultados apresentados na seção 4.2, que trata da aplicação de diferentes fontes de carbono na produção de MELs pelas linhagens de *P. aphidis* selecionadas na etapa de *screening*, foram utilizados planejamentos do tipo DCCR para avaliar os efeitos das variáveis (i) fonte de carbono hidrofílica (glicose ou manitol), (ii) fonte de carbono hidrofóbica (óleo de soja ou ácido oleico), (iii) fonte de nitrogênio orgânico (extrato de levedura) (iv) fonte de nitrogênio inorgânico (NaNO_3), e consequentemente prosseguir para a otimização da produção de MEL. O uso de manitol foi adotado visando avaliar se a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 apresentaria seletividade ou aumento na produção de MML, como foi observado por Morita e colaboradores (2009a). A utilização de ácido oleico como fonte de carbono hidrofóbica foi avaliada com o intuito de comparar se a produção de MEL e MML era afetada pela complexidade do substrato uma vez que o óleo de soja, tradicionalmente aplicado na produção de MELs, possui diversos outros ácidos graxos, o que a priori poderia influenciar a produção de diversas isorformas de MEL ao invés de favorecer a produção de uma única isoforma, tornando mais homogêneo o biossurfactante produzido em termos de composição (FUKUOKA et al., 2008b).

A seguir são apresentados o perfil de crescimento da linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 durante 10 dias de processo para cada delineamento experimental (Figura 18).

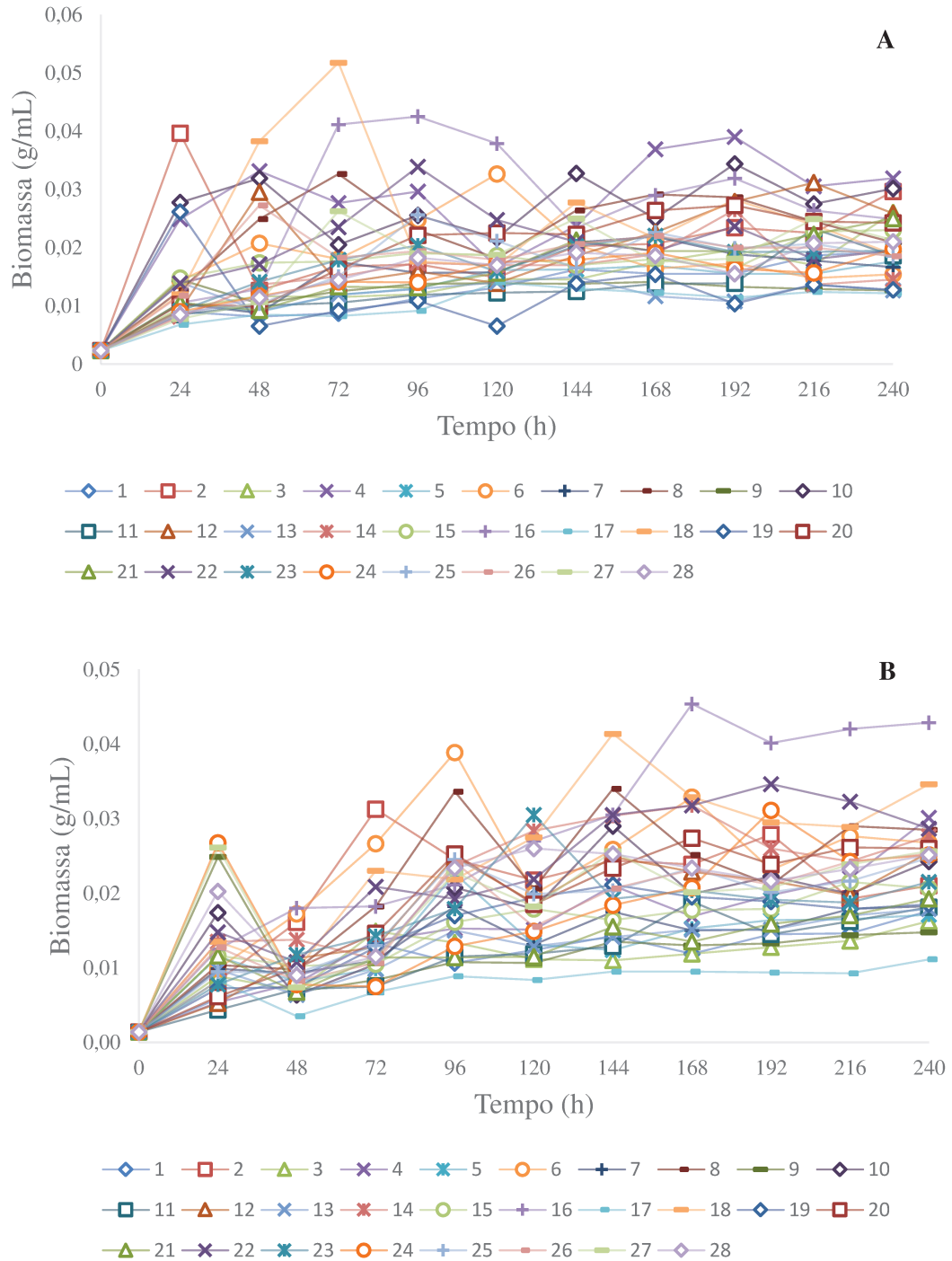


Figura 18. Perfil de crescimento da linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 durante os ensaios de três delineamentos do tipo DCCR. (A) DCCR-I, (B) DCCR-II, (C) DCCR-III.

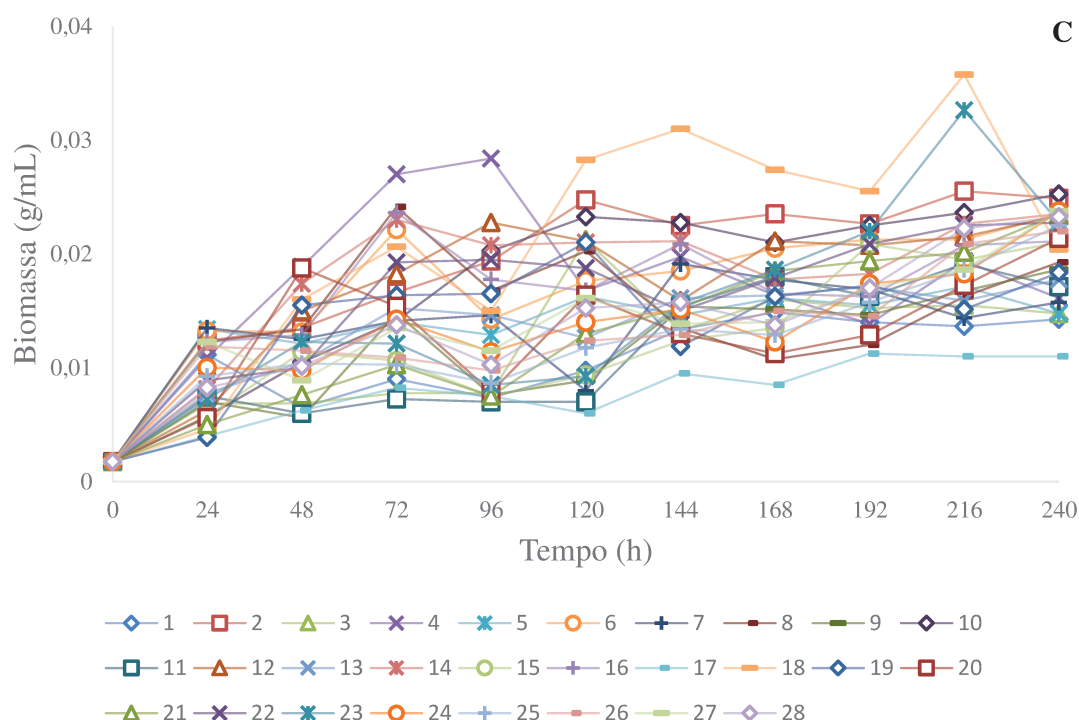


Figura 18. Perfil de crescimento da linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 durante os ensaios de três delineamentos do tipo DCCR. (A) DCCR-I, (B) DCCR-II, (C) DCCR-III.

Para os três delineamentos experimentais adotados, a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 apresentou perfil de crescimento similar. Quando óleo de soja e glicose foram utilizados como fonte de carbono (DCCR-I, figura 18-A), foi possível observar que nos dois últimos dias de processos a variação de biomassa obtido para o total de ensaios realizados variou de aproximadamente 12,1 g/L a 31 g/L. Quando substituída a fonte de carbono hidrofílica para manitol essa variação, em termos de biomassa, passou para 11,2 g/L a 42 g/L. Comparativamente, observou-se que quando manitol foi adotado como fonte de carbono hidrofílica a produção de biomassa foi maior que 20 g/L para 18 dos ensaios realizados (máximo de 42,87 g/L), enquanto que com o uso de glicose essa tendência foi verificada para 12 dos ensaios, com um máximo de 31,9 g/L. Mantendo-se o manitol como fonte hidrofílica e substituindo a fonte de carbono hidrofóbica por ácido oleico, a variação de biomassa observada foi de 11,0 g/L a 43 g/L, onde 17 ensaios apresentaram biomassa superior a 20 g/L.

Em relação a produção de extrato bruto, foi verificado que após 216 horas a concentração não sofria variações consideráveis após a extração, sendo adotado esse ponto para o tratamento estatístico. A tabela 11 mostra a produção de extrato bruto de MELs para os três delineamentos executados.

Tabela 11. Concentração de extrato bruto de MEL obtido após 216 horas de cultivo nos diferentes planejamentos.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Extrato bruto (g/L)		
					DCCR-I	DCCR-II	DCCR-III
1	-1	-1	-1	-1	6,37	4,75	7,875
2	+1	-1	-1	-1	19,25	20,00	22,5
3	-1	+1	-1	-1	5,375	6,25	6,00
4	+1	+1	-1	-1	6,25	17,12	23,25
5	-1	-1	+1	-1	5,87	4,87	5,625
6	+1	-1	+1	-1	27,25	20,25	21,25
7	-1	+1	+1	-1	10,87	4,62	6,00
8	+1	+1	+1	-1	19,75	13,12	23,75
9	-1	-1	-1	+1	7,75	7,25	5,00
10	+1	-1	-1	+1	7,75	20,25	20,62
11	-1	+1	-1	+1	10,12	7,87	7,875
12	+1	+1	-1	+1	17,5	19,62	19,37
13	-1	-1	+1	+1	7,375	5,25	4,375
14	+1	-1	+1	+1	19,25	17,75	21,12
15	-1	+1	+1	+1	8,25	6,25	5,875
16	+1	+1	+1	+1	20,37	12,62	18,62
17	-2	0	0	0	2,375	3,125	2,875
18	+2	0	0	0	18,5	27,75	28,00
19	0	-2	0	0	14,25	14,87	14,00
20	0	+2	0	0	11,87	14,37	14,25
21	0	0	-2	0	17,00	20,25	13,00
22	0	0	+2	0	19,37	12,87	9,375
23	0	0	0	-2	19,62	11,37	13,25
24	0	0	0	+2	20,37	12,12	12,62
25	0	0	0	0	17,5	11,62	14,75
26	0	0	0	0	18,87	10,62	13,37
27	0	0	0	0	16,87	11,87	13,125
28	0	0	0	0	17,37	12,25	14,00

Como pode ser observado, para ambos os delineamentos foi demonstrada boa repetibilidade uma vez que as concentrações obtidas para os pontos centrais (ensaios 25 a 28) apresentaram valores muito próximos. Para o delineamento I foram produzidos $17,65 \pm 0,85$ g/L de biossurfactante bruto, enquanto que para o segundo e terceiro delineamento foram produzidos $11,59 \pm 0,69$ g/L e $13,81 \pm 0,72$ g/L, respectivamente. Dessa forma foi demonstrado que nas mesmas condições (40 g/L de fontes de carbono hidrofóbica e hidrofílica, 1,0 g/L de NaNO₃ e 3 g/L de extrato de levedura) a maior produção de biossurfactante bruto foi alcançada quando óleo de soja e glicose foram utilizados como fontes de carbono.

Realizando a análise estatística dos resultados para a produção de extrato bruto do DCCR-I foi possível estimar os efeitos dos parâmetros associados ao processo. A Tabela 12 fornece os coeficientes de regressão para cada parâmetro, sendo destacados em negrito os estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

Tabela 12. Coeficientes de regressão para a resposta (Y) extrato bruto de MEL obtida para o DCCR-I.

Parâmetros	CR	EP	t(13)	p –valor
Média	17,6525	1,8130	9,7362	0,00000
<i>Linear</i>				
X₁	4,485	0,7401	6,0592	0,00004
X ₂	-0,2975	0,7401	-0,4019	0,6942
X₃	1,8066	0,7401	2,4408	0,0297
X ₄	-0,0466	0,7401	-0,0630	0,9506
<i>Quadrático</i>				
X₁²	-2,2970	0,7401	-3,103	0,0083
X₂²	-1,6414	0,7401	-2,2176	0,0450
X ₃ ²	-0,3602	0,7401	-0,4866	0,6346
X ₄ ²	0,0922	0,7401	0,1246	0,9026
<i>Interação</i>				
X ₁ X ₂	-1,0550	0,9065	-1,1637	0,2654
X₁X₃	2,0700	0,9065	2,2834	0,0398
X ₁ X ₄	-0,7900	0,9065	-0,8714	0,3993
X ₂ X ₃	0,0856	0,9065	0,0944	0,9261
X₂X₄	1,9131	0,9065	2,1103	0,0547
X ₃ X ₄	-0,8981	0,9065	-0,9907	0,3399

CR = coeficientes de regressão; EP = erro padrão; X₁= fonte de carbono hidrofóbica (g/L); X₂= fonte de carbono hidrofílica (g/L); X₃= extrato de levedura (g/L); X₄= NaNO₃ (g/L). Parâmetros em negrito: estatisticamente significativos para o modelo ($p < 0,1$).

Nesse delineamento especificamente, verificou-se que foram significativos os termos lineares para o óleo de soja e extrato de levedura, bem como os termos quadráticos para o óleo de soja e para a glicose e duas interações (óleo de soja x extrato de levedura e glicose x nitrato de sódio) a 10% de significância. Utilizando apenas os parâmetros significativos foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos dados (Tabela 13). Pode-se observar que uma porcentagem de variação explicada em torno de 80% foi obtida, além de um valor de F calculado cerca de 6 vezes maior que o valor tabelado.

Tabela 13. Análise de variância para o extrato bruto de MELs utilizando óleo de soja e glicose como fontes de carbono.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	891,80	7	127,40	11,81	0,02711
Resíduo	215,77	20	10,80		
Total	1107,57	27			

$F_{\text{calc}}:F_{\text{tab}} = 5,7$

% de variação explicada (R^2) = 80,03; $F_{\text{tab}} 7,20; 0,10 = 2,06$

Com base nesses resultados foi possível a elaboração de um modelo matemático (Equação 2) considerado adequado para a predição da concentração de extrato bruto de MEL (Y) utilizando óleo de soja (X_1) e glicose (X_2) como fontes de carbono, e extrato de levedura (X_3) e nitrato de sódio (X_4) como fontes de nitrogênio:

$$Y = 17,331 + 4,485X_1 - 0,297X_2 + 1,806X_3 - 2,243X_1^2 - 1,588X_2^2 + 2,070X_1X_3 + 1,913X_2X_4 \text{ (Equação 2)}$$

A partir desse modelo podem ser elaboradas superfícies de resposta e curvas de contorno para verificar as melhores condições para a produção de extrato bruto de MELs. A Figura 19 traz as curvas de contorno (A a C) construídas utilizando os parâmetros significativos do modelo matemático.

Com base na curva de contorno A (Figura 19 A) é possível verificar que a maior produção de extrato bruto ocorre quando a concentração de óleo de soja e glicose estão em torno de 55 g/L e 30 g/L, respectivamente. Além disso, o efeito positivo do extrato de levedura sobre a produção de extrato bruto pode ser observado com base nas curvas de contorno B e C. Assim, concentrações de extrato de levedura em torno do maior nível adotado (5,0 g/L) ou superiores favoreceriam o aumento da concentração de extrato bruto no processo biotecnológico em questão. Essa conclusão é condizente com o estudo desenvolvido por Konishi e colaboradores (2011) para a linhagem de *P. hubeiensis* SY62, onde as maiores concentrações de MELs eram obtidas com 5 g/L e 10 g/L de extrato de levedura. Esses autores também demonstraram que com o aumento da concentração de fonte de carbono hidrofóbica e hidrofílica a concentração de biossurfactante era incrementada, sendo obtidos em torno de 49 g/L de MEL quando 100 g/L de glicose e óleo de oliva era utilizados no processo. Entretanto,

quando as concentrações das fontes de carbono eram superiores a 100 g/L foi observada a diminuição da concentração de MEL produzido ao final do processo biotecnológico.

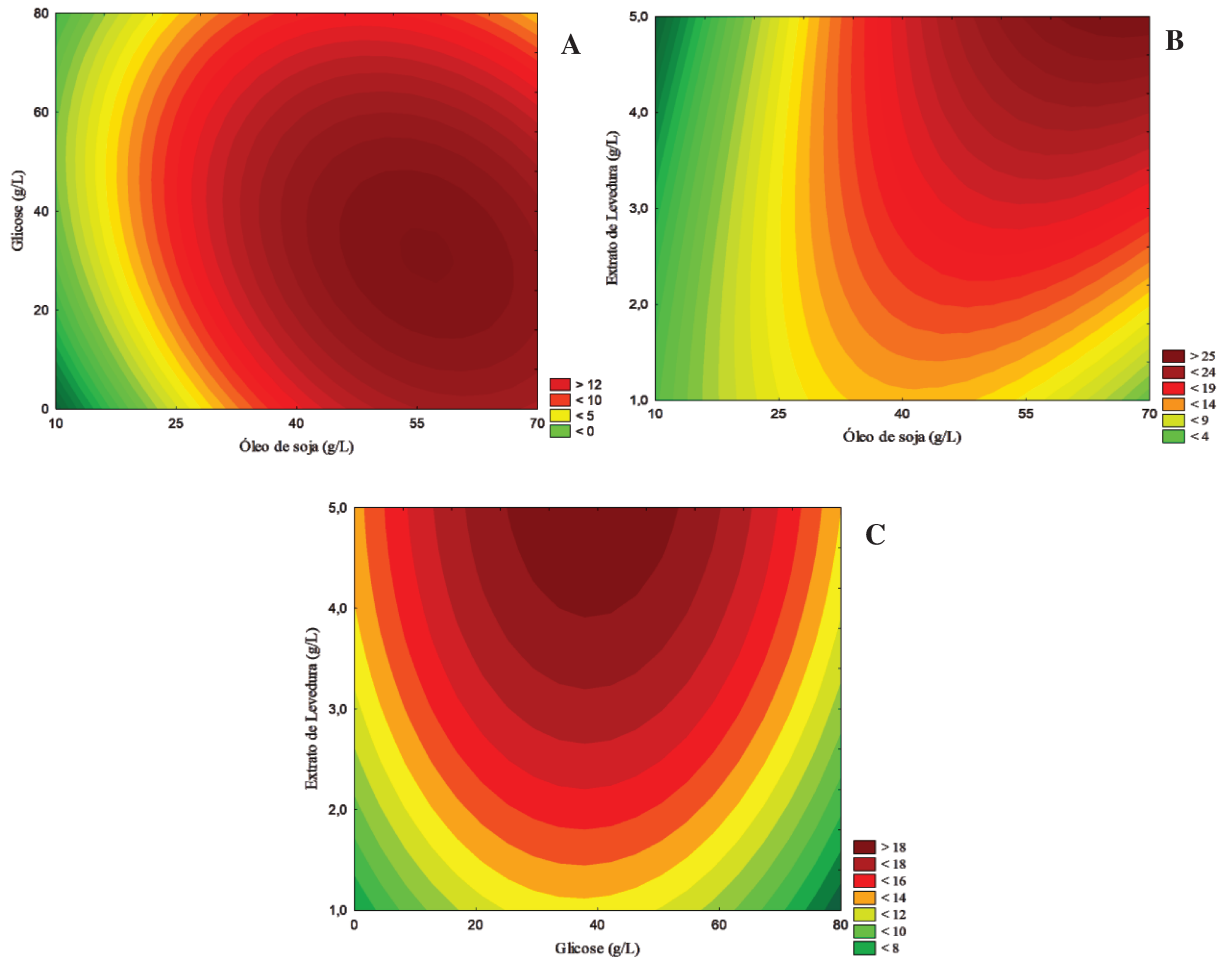


Figura 19. Curvas de contorno das variáveis significativas do processo de produção de extrato bruto de MELs por *P. aphidis* UFMG-Y3468 utilizando óleo de soja e glicose como fontes de carbono. DCCR-I.

Procedendo a análise estatística dos resultados obtidos para o delineamento experimental utilizando óleo de soja e manitol como fontes de carbono (DCCR-II) da mesma forma como descrito anteriormente, foram obtidos os coeficientes de regressão dos parâmetros do processo biotecnológico a um nível de significância de 10 % (Tabela 14). Pode-se observar que assim como observado para o DCCR-I, os termos lineares para óleo de soja e extrato de levedura. Entretanto, o termo quadrático significativo no DCCR-II foi o relacionado ao extrato de levedura e a única interação significativa foi o para óleo de soja $\times$ glicose. Assim, utilizando esses parâmetros significativos, foi realizada a ANOVA dos dados (Tabela 15).

Tabela 14. Coeficientes de regressão para a resposta (Y) extrato bruto de MEL obtida para o DCCR-II.

Parâmetros	CR	EP	t(13)	p –valor
Média	11,590	1,040	11,141	0,0000
<i>Linear</i>				
X₁	5,953	0,4246	14,017	0,0000
X ₂	-0,5791	0,4246	-1,3637	0,1957
X₃	-1,3808	0,44246	-3,2514	0,0063
X ₄	0,3075	0,4246	0,7240	0,4818
<i>Quadrático</i>				
X ₁ ²	0,4867	0,4246	1,1461	0,2723
X ₂ ²	0,2824	0,4246	0,6649	0,5177
X₃²	0,7674	0,4246	1,8069	0,0939
X ₄ ²	-0,4363	0,4246	-1,0274	0,3229
<i>Interação</i>				
X₁X₂	-1,1650	0,5201	-2,2398	0,0432
X ₁ X ₃	-0,5075	0,5201	-0,9757	0,3470
X ₁ X ₄	-0,3987	0,5201	-0,7666	0,4569
X ₂ X ₃	-0,6325	0,5201	-1,2160	0,2455
X ₂ X ₄	0,2887	0,5201	0,5551	0,5882
X ₃ X ₄	-0,4912	0,5201	-0,9444	0,3621

CR = coeficientes de regressão; EP = erro padrão; X₁= fonte de carbono hidrofóbica (g/L); X₂= fonte de carbono hidrofílica (g/L); X₃= extrato de levedura (g/L); X₄= NaNO₃(g/L). Parâmetros em negrito: estatisticamente significativos para o modelo ($p < 0.1$).

Com base nos resultados da ANOVA é possível observar um valor de F calculado para a regressão altamente significativo (53,32) sendo 24 vezes maior que o valor tabelado. Além disso o coeficiente de determinação obtido foi cerca de 90%, indicando que o modelo matemático se ajusta bem aos dados experimentais do delineamento em questão e é adequado para descrever os resultados através de superfícies de resposta e curvas de contorno.

Tabela 15. Análise de variância para a área total de MELs utilizando óleo de soja e manitol como fontes de carbono.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	931,87	4	232,96	53,32	0,0123
Resíduo	100,49	23	4,369		
Total	1032,36	27			

$F_{\text{calc}}: F_{\text{tab}} = 24,12$

% de variação explicada (R^2) = 90,26; $F_{4,23}$; 0,10 = 2,21

Dessa forma, o modelo matemático reparametrizado obtido para o DCCR-II fica caracterizado pela equação:

$$Y = 11,923 + 5,953X_1 - 1,3808X_3 + 0,712X_3^2 - 1,165X_1X_2 \text{ (Equação 3)}$$

em que Y representa a concentração de extrato bruto de MEL (g/L) e X representa as variáveis independentes codificadas (X_1 : óleo de soja; X_2 : manitol e X_3 : extrato de levedura). As curvas de contorno geradas pelo modelo, considerando apenas os parâmetros significativos, são apresentadas na Figura 20.

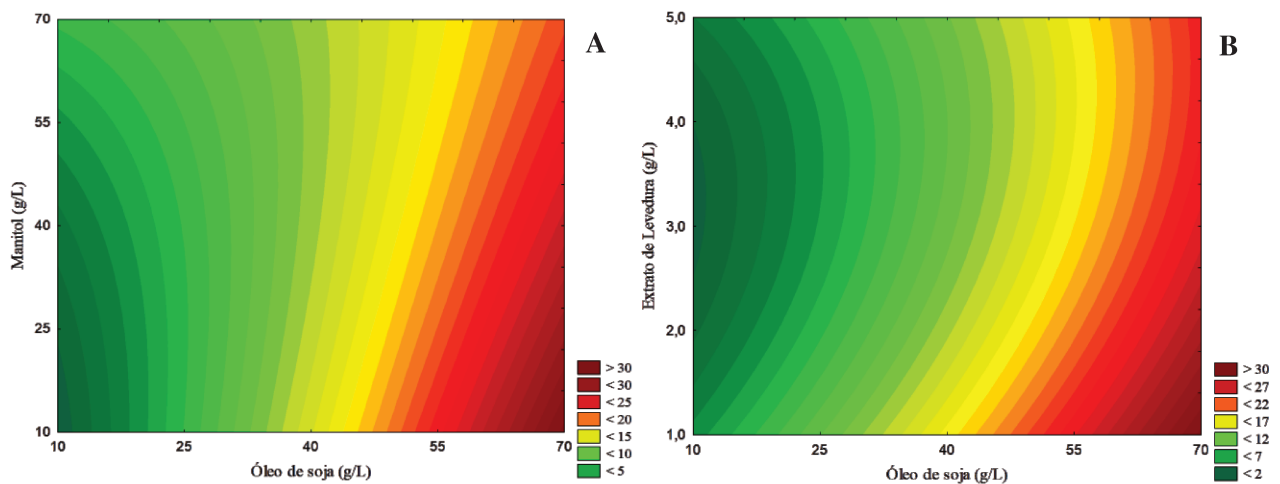


Figura 20. Curvas de contorno para as variáveis significativas do processo de produção de extrato bruto de MELs por *P. aphidis* UFMG-Y3468 utilizando óleo de soja e manitol como fontes de carbono. DCCR-II.

Através das curvas de contorno A e B pode-se verificar que para o DCCR-II uma maior produção de extrato bruto de biossurfactante é obtida quando a concentração de óleo de soja é superior a 60 g/L. Percebe-se que para esse delineamento especificamente as concentrações de manitol e extrato de levedura poderiam ser aquelas correspondentes aos menores níveis avaliados (-2) para cada uma dessas variáveis, ou seja, uma maior concentração de extrato bruto pode ser obtida utilizando 10 g/L de manitol e 1 g/L de extrato de levedura. Essa observação pode ser considerada interessante sob o ponto de vista econômico uma vez que maiores concentrações de extrato bruto podem ser obtidas apenas aumentando a concentração do componente hidrofóbico, que apresenta um menor custo quando comparado com o manitol e extrato de levedura.

Para o terceiro delineamento experimental (DCCR-III) foi observado que entre todos os coeficientes de regressão estimados, os estatisticamente significativos foram os termos lineares para ácido oleico, extrato de levedura e nitrato de sódio, além do termo quadrático para o extrato de levedura (Tabela 16). Com base nesses coeficientes foi realizada a ANOVA dos dados para avaliar a validade do modelo matemático (Tabela 17).

Tabela 16. Coeficientes de regressão para a resposta (Y) extrato bruto de MEL obtida para o DCCR-III.

Parâmetros	CR	EP	t(13)	p –valor
Média	13,8112	0,7430	18,5866	0,0000
<i>Linear</i>				
X₁	7,1712	0,3033	23,6395	0,0000
X ₂	0,1195	0,3033	0,3942	0,6998
X₃	-0,5466	0,3033	-1,8020	0,0947
X₄	-0,6108	0,3033	-2,0135	0,0652
<i>Quadrático</i>				
X ₁ ²	0,4519	0,3033	1,4899	0,1601
X ₂ ²	0,1238	0,3033	0,4082	0,6897
X₃²	-0,6105	0,3033	-2,0125	0,0653
X ₄ ²	-0,1736	0,3033	-0,5724	0,0652
<i>Interação</i>				
X ₁ X ₂	-0,2106	0,3715	-0,5669	0,5804
X ₁ X ₃	-0,2418	0,3715	0,6510	0,5263
X ₁ X ₄	-0,5400	0,3715	-1,4534	0,1698
X ₂ X ₃	0,0862	0,3715	0,2321	0,8200
X ₂ X ₄	-0,0706	0,3715	-0,1900	0,8521
X ₃ X ₄	0,0081	0,3715	0,0218	0,9828

CR = coeficientes de regressão; EP = erro padrão; X₁= fonte de carbono hidrofóbica (g/L); X₂= fonte de carbono hidrofílica (g/L); X₃= extrato de levedura (g/L); X₄= NaNO₃(g/L). Parâmetros em negrito: estatisticamente significativos para o modelo ($p < 0.1$).

Tabela 17. Análise de variância para a área total de MELs utilizando ácido oleico e manitol como fontes de carbono.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	1262,96	4	315,74	170,08	0,0442
Resíduo	42,69	23	1,85		
Total	1305,66	27			

$F_{\text{calc}}:F_{\text{tab}} = 76,96$

% de variação explicada (R^2) = 96,73; $F_{4,23; 0,10} = 2,21$

A partir dos resultados da análise de variância pode-se verificar a validade e robustez do modelo matemático construído com os parâmetros significativos uma vez que foram obtidos altos valores para o coeficiente de determinação, aproximadamente 97%, e de F calculado, cerca de 78 vezes maior que o F tabelado. A equação do modelo reparametrizado, a partir das variáveis codificadas, é representado abaixo:

$$Y = 14,213 + 7,171X_1 - 0,546X_3 - 0,677X_3^2 - 0,611X_4 \text{ (Equação 4)}$$

em que Y representa a concentração de extrato bruto produzido (g/L) e X as variáveis independentes codificadas (X_1 : ácido oleico; X_3 : extrato de levedura e X_4 : nitrato de sódio). A partir desse modelo foram construídas as curvas de contorno para verificar as melhores condições para produção de extrato bruto considerando os parâmetros significativos estatisticamente (Figura 21).

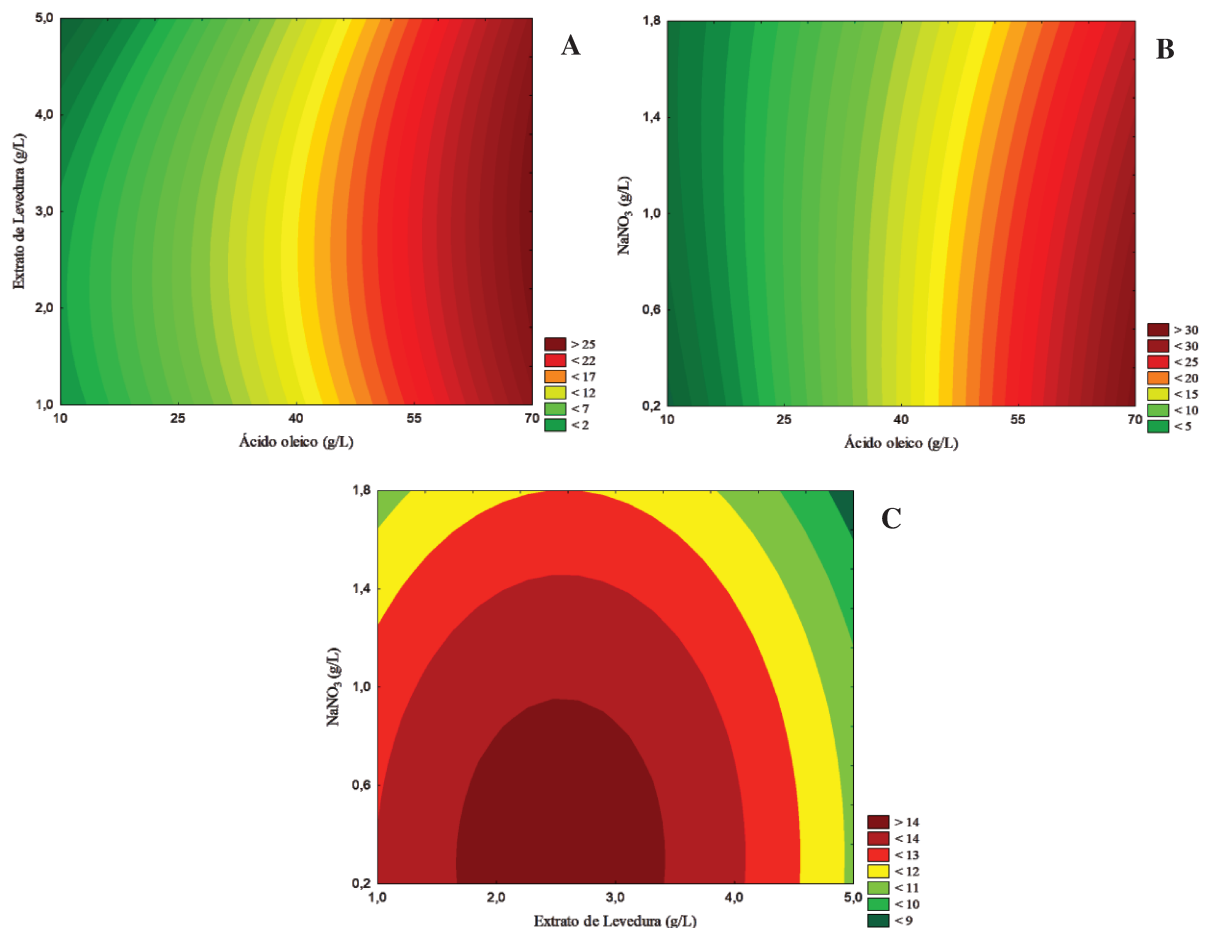


Figura 21. Curvas de contorno para as variáveis significativas do processo de produção de extrato bruto de MELs por *P. aphidis* UFMG-Y3468 utilizando ácido oleico e manitol como fontes de carbono. DCCR-III.

A partir da análise das curvas de contorno A e B da Figura 21 é possível notar que assim como ocorreu para o DCCR-II maiores concentrações de extrato bruto podem ser obtidas aumentando a concentração de substrato hidrofóbico, no caso do DCCR-III o ácido oleico, para valores acima de 55 g/L. Além disso, nota-se que as fontes de nitrogênio quando comparadas com a fonte de carbono hidrofóbica apresentam efeito negativo sobre a produção de extrato bruto (Figura 21 A e B), sendo indicado que as concentrações ótimas para o extrato de levedura e nitrato de sódio poderiam ser fixadas em torno de 2,5 g/L e 0,4 g/L, respectivamente (Figura 21 C).

Com intuito de verificar se as tendências observadas nas análises estatísticas para a resposta extrato bruto seriam representativas para o conteúdo de isoformas de MEL, foi proposto a utilização da soma das áreas de todas as isoformas de biossurfactantes encontradas no extrato bruto de cada ensaio como resposta para os três delineamentos executados. Cabe salientar que essa resposta foi escolhida considerando a sua correlação direta com a concentração das isoformas. Além disso, não foram expressas em termos de concentração pela indisponibilidade de padrões comerciais para a elaboração de curvas de quantificação. A Tabela 18 apresenta a matriz codificada utilizada nos delineamentos experimentais I, II e II com as respectivas respostas baseadas nas áreas totais das isoformas de MEL obtidas através de LC-ESI-MS. Para a análise estatística de cada delineamento foram considerados os três pontos centrais com valores mais próximos para evitar o comprometimento da qualidade das análises estatísticas de obtenção dos coeficientes de regressão e consequentemente da análise de variância.

Assim, analisando os dados da Tabela 18 pode-se observar que para os delineamentos I e II, pode ser sugerida boa repetibilidade devido à similaridade numérica dos valores nos pontos centrais, enquanto que para o delineamento III ocorre variações nos valores dos ensaios 25 a 28. Em termos quantitativos, a produção de isoformas de MELs (área total) variou de $0,48 \times 10^{-6}$ UA a $17,45 \times 10^{-6}$ UA no DCCR-I, de $0,93 \times 10^{-6}$ UA a $17,5 \times 10^{-6}$ UA no DCCR-II e de $1,29 \times 10^{-6}$ UA a $32,33 \times 10^{-6}$ UA no DCCR-III. Portanto, utilizando a área total de isoformas como variável dependente, o melhor perfil de produção foi encontrado para o DCCR-III.

Tabela 18. Matriz codificada para os três delineamentos experimentais com resposta (Y) expressa em termos de área total de isoformas de MEL contidas no extrato bruto produzido após 216 horas de processo.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Área total MEL (UA)		
					DCCR-I	DCCR-II	DCCR-III
1	-1	-1	-1	-1	3791784	6345118	21778792
2	+1	-1	-1	-1	4415999	14539685	18820918
3	-1	+1	-1	-1	8508432	4816578	16281738
4	+1	+1	-1	-1	3337962	17512749	32330833
5	-1	-1	+1	-1	2193263	2669711	7319685
6	+1	-1	+1	-1	11068095	6488390	11877661
7	-1	+1	+1	-1	3572353	1473311	20766853
8	+1	+1	+1	-1	5797149	2652669	19663833
9	-1	-1	-1	+1	15973882	3940493	7771258
10	+1	-1	-1	+1	14719929	13757217	10673985
11	-1	+1	-1	+1	3797096	4149510	13475310
12	+1	+1	-1	+1	3878218	8955210	19936120
13	-1	-1	+1	+1	6940602	2782269	8966964
14	+1	-1	+1	+1	9812239	6521848	9121393
15	-1	+1	+1	+1	2452865	2476509	2819906
16	+1	+1	+1	+1	3874168	1125659	17109391
17	-2	0	0	0	1354612	930719	5510554
18	+2	0	0	0	5226006	8773596	11166670
19	0	-2	0	0	3160268	9444641	1291125
20	0	+2	0	0	6208714	2141706	17027697
21	0	0	-2	0	487370	13161167	22827507
22	0	0	+2	0	8648077	1549039	29679103
23	0	0	0	-2	14637239	8041684	63764353
24	0	0	0	+2	17448773	3660622	23741313
25	0	0	0	0	-	4222914	15803279
26	0	0	0	0	8685794	4496166	24360479
27	0	0	0	0	9904904	4071260	-
28	0	0	0	0	10348385	-	21212630

UA: Unidade de área.

A partir dos resultados apresentados foram determinados os coeficientes de regressão para a resposta de interesse do processo (Área total de MEL) em cada um dos delineamentos. Na tabela 19 são expressos os coeficientes de regressão para a área total de MELs produzidos no DCCR-I, utilizando óleo de soja como fonte de carbono hidrofóbica, glicose como fonte de carbono hidrofílica, extrato de levedura e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio. Observa-se que foram significativos os termos quadráticos para a as quatro variáveis e apenas o termo linear para glicose a 10% de significância ($p < 0,1$). A ANOVA para

a variável dependente considerando todos os termos estatisticamente significativos está apresentada na Tabela 20.

Tabela 19. Coeficientes de regressão para a resposta área total de isoformas de MEL obtida para o DCCR-I.

Parâmetros	CR	EP	t(13)	p –valor
Média	9646361	1933725	4,988	0,0003
<i>Linear</i>				
X ₁	725678	683675	1,0614	0,3093
X ₂	-1150027	683675	-1,6821	0,1183
X ₃	150369	683675	0,2199	0,8296
X ₄	1016126	683675	1,4862	0,1630
<i>Quadrático</i>				
X ₁ ²	-1695347	725147	-2,337	0,0375
X ₂ ²	-1346802	725147	-1,8572	0,0879
X ₃ ²	-1375994	725147	-1,8975	0,0820
X ₄ ²	1492827	725147	2,0586	0,0619
<i>Interação</i>				
X ₁ X ₂	-784999	837328	-0,9375	0,3669
X ₁ X ₃	1319478	837328	1,5758	0,1410
X ₁ X ₄	-214579	837328	-0,2562	0,8020
X ₂ X ₃	316389	837328	0,3778	0,7121
X₂X₄	-2074441	837328	-2,4774	0,0290
X ₃ X ₄	-1116621	837328	-1,3335	0,2071

CR = coeficientes de regressão; EP = erro padrão; X₁= fonte de carbono hidrofóbica (g/L); X₂= fonte de carbono hidrofílica (g/L); X₃= extrato de levedura (g/L); X₄= NaNO₃ (g/L). Parâmetros em negrito: estatisticamente significativos para o modelo ($p < 0.1$).

Tabela 20. Análise de variância para a área total de MELs utilizando óleo de soja e glicose como fontes de carbono.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	$3,27 \times 10^{14}$	9	$3,63 \times 10^{13}$	3,17	0,08138
Resíduo	$1,94 \times 10^{14}$	17	$1,14 \times 10^{13}$		
Total	$5,21 \times 10^{14}$	26			

$F_{\text{calc}}: F_{\text{tab}} = 1,56$

% de variação explicada (R^2) = 65,82; $F_{\text{tab}} 9,17; 0,10 = 2,03$

Considerando os resultados da análise de variância percebe-se que a porcentagem de variação explicada pelos dados obtidos foi cerca de 66%, menor que o considerado aceitável para processos biotecnológicos (> 70%). Além disso, o valor de F calculado foi apenas de 1,5

vezes maior que o valor tabelado, concluindo assim que um modelo matemático construído com os termos significativos não apresentaria qualidade estatística suficientemente adequada para estimar a produção de MELs em termos de área total de isoformas.

Em contrapartida, para o DCCR-II foram observados 8 parâmetros significativos, entre eles todos os termos lineares, o termo quadrático de extrato de levedura, seguido de três interações (Tabela 21), sendo possível obter um excelente coeficiente de determinação (aproximadamente 91%) e um valor de F calculado quase 13 vezes maior que o valor tabelado, indicando que é possível a elaboração de um modelo matemático preditivo válido (Tabela 22).

Tabela 21. Coeficientes de regressão para a resposta área total de isoformas de MEL obtida para o DCCR-II.

Parâmetros	CR	EP	t(12)	p –valor
Média	4263447	861231	4,9594	0,0003
<i>Linear</i>				
X₁	2441070	304491	8,0168	0,0000
X₂	-1187017	304491	-3,8983	0,0021
X₃	-2960435	304491	-9,7225	0,0000
X₄	-897984	304491	-2,9491	0,0121
<i>Quadrático</i>				
X ₁ ²	197184	322961	0,6105	0,5528
X ₂ ²	432438	322961	1,3389	0,2053
X₃²	822920	322961	2,5480	0,0255
X ₄ ²	446933	322961	1,3838	0,1916
<i>Interação</i>				
X ₁ X ₂	-514948	372924	-1,3808	0,1925
X₁X₃	-1757900	372924	-4,7138	0,0005
X ₁ X ₄	-554851	372924	-1,4878	0,1625
X ₂ X ₃	-474100	372924	-1,2713	0,2277
X ₂ X ₄	-419209	372924	-1,1241	0,28294
X₃X₄	752119	372924	2,0168	0,0666

CR = coeficientes de regressão; EP = erro padrão; X₁= fonte de carbono hidrofóbica (g/L); X₂= fonte de carbono hidrofílica (g/L); X₃= extrato de levedura (g/L); X₄= NaNO₃ (g/L). Parâmetros em negrito: estatisticamente significativos para o modelo ($p < 0.1$).

Tabela 22. Análise de variância para a área total de MELs utilizando óleo de soja e manitol como fontes de carbono.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	$4,75 \times 10^{14}$	7	$6,78 \times 10^{13}$	26,59	0,00214
Resíduo	$4,48 \times 10^{13}$	19	$2,55 \times 10^{12}$		
Total	$5,23 \times 10^{14}$	26			

$F_{\text{calc}}:F_{\text{tab}} = 12,90$

% de variação explicada (R^2) = 90,73; $F_{\text{tab}} 7,19$; 0,10 = 2,06

Portanto, com base nos resultados estatísticos apresentados para o DCCR-II em função da área total das isoformas de MEL obteve-se um modelo de segunda ordem, como apresentado pela equação abaixo:

$$Y = 5,4 \times 10^6 + 2,4 \times 10^6 X_1 - 1,1 \times 10^6 X_2 - 2,9 \times 10^6 X_3 - 8,9 \times 10^5 X_4 + 6,1 \times 10^5 X_3^2 - 1,7 \times 10^6 X_1 X_3 - 5,5 \times 10^5 X_1 X_4 + 7,5 \times 10^5 X_3 X_4 \text{ (Equação 5)}$$

em que Y representa a área total de isoformas de MEL produzidas e X as variáveis independentes codificadas (X_1 : óleo de soja; X_2 : manitol; X_3 : extrato de levedura e X_4 : nitrato de sódio). A partir desse modelo foram construídas as curvas de contorno para verificar as condições ótimas para a produção de MELs com base na área total de isoformas.

Na Figura 22 (A a F) são encontradas as curvas de contorno das superfícies de respostas que podem ser construídas a partir do modelo apresentados anteriormente. Com base nas curvas de contorno 19A, 19B e 19C pode ser verificado o efeito positivo do aumento da concentração de óleo de soja sobre a produção de isoformas de MEL, indicando que utilizando concentrações superiores a 70 g/L (valor codificado: +2) é possível incrementar a produção de MELs. Entretanto, a mesma tendência não se aplicaria para a suplementação com fonte de carbono hidrofílica onde foi observado o aumento na produção de MEL com o decréscimo na concentração de manitol, sendo suficiente o emprego de aproximadamente 10 g/L desse substrato para alcançar uma produção satisfatória de MELs. Os resultados obtidos com a soma total das áreas das isoformas de MEL para o DCCR-II são condizentes com os encontrados quando a concentração de extrato bruto foi utilizada como variável dependente para as análises estatísticas, indicando a correlação direta entre a concentração de extrato bruto obtido e o conteúdo total de isoformas de MEL presentes no mesmo.

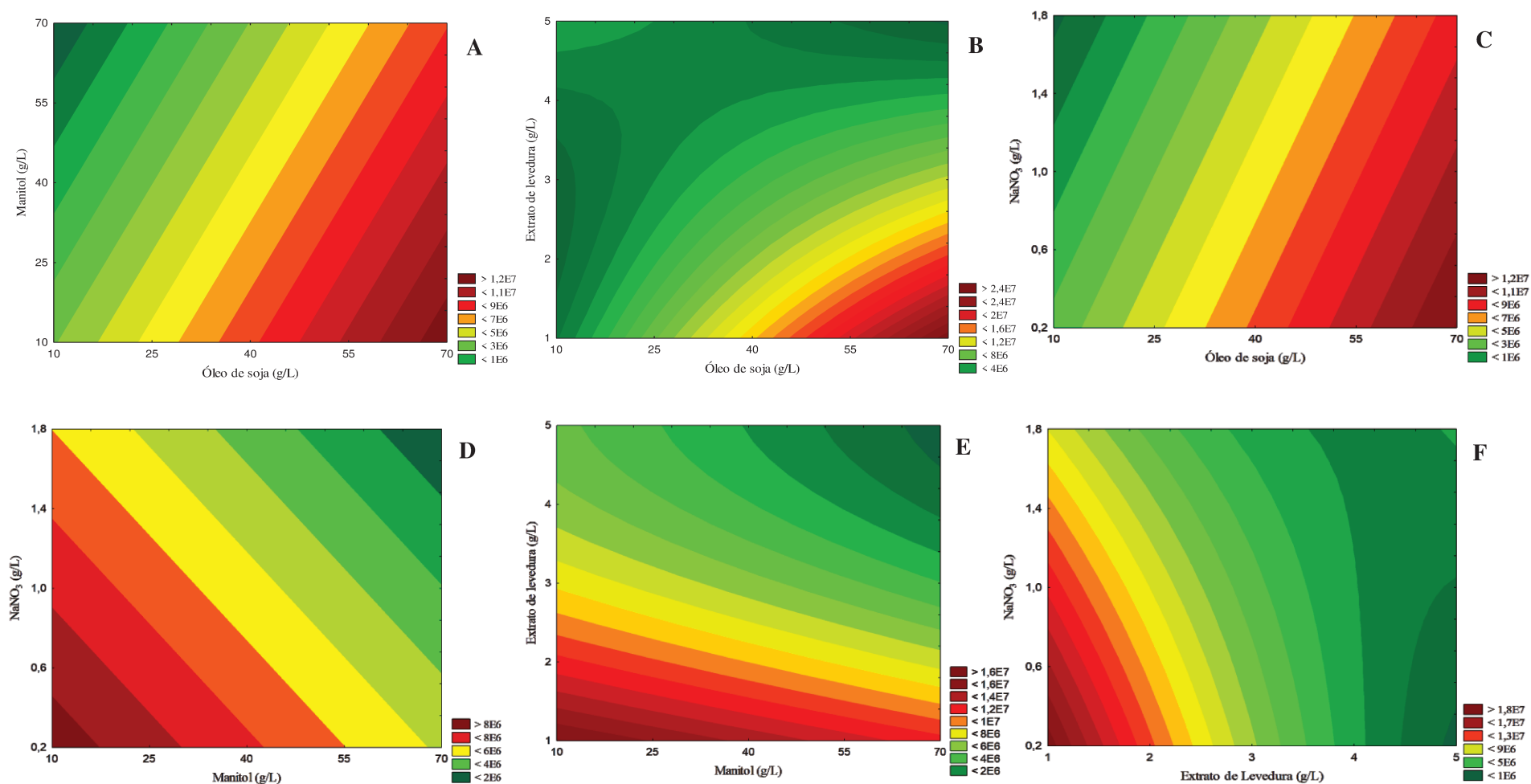


Figura 22. Curvas de contorno do processo de produção de MELs, expresso em área total de isoformas, por *P. aphidis* UFMG-Y3468 utilizando óleo de soja e manitol como fontes de carbono. DCCR-II.

O efeito positivo do aumento da concentração da fonte de carbono hidrofóbica, especificamente o óleo de soja, sobre a produção de MEL foi reportada por Morita e colaboradores (2008a). Esses autores demonstraram que concentrações de MEL eram obtidas quando óleo de soja era aplicado como única fonte de carbono e que aumentando a concentração desse substrato de 40 g/L para 160 g/L a concentração de MEL mais que duplicava, passando de aproximadamente 18 g/L para cerca de 42 g/L. Esse fenômeno pode ser explicado baseando-se no processo de biossíntese dos MELs em leveduras do gênero *Pseudozyma* sp., em que são observadas diferenças fisiológicas na produção desses biossurfactantes dependendo da característica da fonte de carbono. Quando fontes hidrofílicas são utilizadas (glicose, sacarose, entre outras) observa-se que o processo de biossíntese das cadeias de ácido graxo do MEL é realizada por síntese *de novo*, enquanto utilizando fontes de carbono hidrofóbicas, como o óleo de soja, as cadeias de ácido graxo são provenientes dos compostos lipídicos do substrato envolvendo uma via bioquímica de encurtamento de cadeia e β -oxidação, sendo considerada mais vantajosa em termos energéticos e metabólicos (KITAMOTO et al., 1998; MORITA et al., 2007; MORITA et al., 2010b).

Em relação as fontes de nitrogênio, é possível concluir que para o DCCR-II a condição ótima para a produção de MELs seria alcançada com valores próximos do menor nível avaliado (-2) no delineamento para extrato de levedura e nitrato de sódio, sendo necessárias concentrações próximas de 1,0 g/L e 0,2 g/L, respectivamente. Dessa forma ao contrário do que foi observado por Konishi e colaboradores (2011) e Faria e colaboradores (2014) em relação as fontes de nitrogênio sobre a produção de MELs, foi verificado que a produção desse biossurfactante pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 foi negativamente influenciada pelo aumento da concentração de extrato de levedura e nitrato de sódio.

Portanto, para o processo de produção de MELs pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 utilizando óleo de soja e manitol, seria mais adequado o ajuste dos níveis para um próximo planejamento objetivando alcançar as melhores faixas de concentrações de substrato hidrofílico e hidrofóbico, bem como as fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico. Entretanto esse fato não invalidaria a validação experimental do modelo descrito pela Equação 5 para esse delineamento, sendo que essa será realizada posteriormente.

Por fim, para o terceiro planejamento experimental, utilizando ácido oleico e manitol como fontes de carbono, foi realizada a determinação dos coeficientes de regressão (Tabela 23) e utilizando os coeficientes significativos procedeu-se a análise de variância

(ANOVA) (Tabela 24). Analogamente ao segundo planejamento, foi possível alcançar um modelo válido estatisticamente uma vez que o coeficiente de determinação se mostrou superior a 70% e o valor de F calculado foi quatro vezes superior ao tabelado.

Tabela 23. Coeficientes de regressão para a resposta área total de isoformas de MEL obtida para o DCCR-III.

Parâmetros	CR	EP	t(12)	p –valor
Média	20458796	4636092	4,4129	0,0008
<i>Linear</i>				
X ₁	2152744	1639106	1,3133	0,2136
X₂	3230270	1639106	1,9707	0,0722
X ₃	-1238336	1639106	-0,7554	0,4645
X₄	-5792169	1639160	-3,5337	0,0041
<i>Quadrático</i>				
X₁²	-4189442	1738535	-2,4097	0,0329
X₂²	-3984242	1738535	-2,2917	0,0408
X ₃ ²	289231	1738535	0,1663	0,8706
X₄²	4664113	1738535	2,6827	0,0199
<i>Interação</i>				
X ₁ X ₂	1939944	2007487	0,9663	0,3529
X ₁ X ₃	-284743	2007487	-0,1418	0,8895
X ₁ X ₄	453830	2007487	0,2260	0,8249
X ₂ X ₃	5952	2007487	0,0029	0,9976
X ₂ X ₄	-777442	2007487	-0,3872	0,7053
X ₃ X ₄	984077	2007487	0,4902	0,6328

CR = coeficientes de regressão; EP = erro padrão; X₁= fonte de carbono hidrofóbica (g/L); X₂= fonte de carbono hidrofílica (g/L); X₃= extrato de levedura (g/L); X₄= NaNO₃ (g/L). Parâmetros em negrito: estatisticamente significativos para o modelo ($p < 0.1$).

Tabela 24. Análise de variância para a área total de MELs utilizando ácido oleico e manitol como fontes de carbono.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	$2,51 \times 10^{15}$	6	$4,18 \times 10^{14}$	9,27	0,0573
Resíduo	$9,02 \times 10^{14}$	20	$4,51 \times 10^{13}$		
Total	$3,41 \times 10^{15}$	26			

$F_{\text{calc}}: F_{\text{tab}} = 4,43$

% de variação explicada (R^2) = 76,13; $F_{\text{tab}} 6,20; 0,10 = 2,09$

A equação do modelo reparametrizado, a partir das variáveis codificadas, é representado por:

$$Y = 2,1 \times 10^7 + 2,1 \times 10^6 X_1 + 3,2 \times 10^6 X_2 - 5,7 \times 10^6 X_4 - 4,3 \times 10^6 X_1^2 + 4,6 \times 10^6 X_4^2 \text{ (Equação 6)}$$

em que Y representa a área total de isoformas de MEL detectadas no extrato bruto do DCCR-III (UA) e X as variáveis independentes codificadas (X_1 : ácido oleico; X_2 : manitol e X_4 : nitrato de sódio). A partir desse modelo foram construídas as curvas de contorno para verificar as melhores condições para produção de extrato bruto considerando os parâmetros significativos estatisticamente (Figura 23).

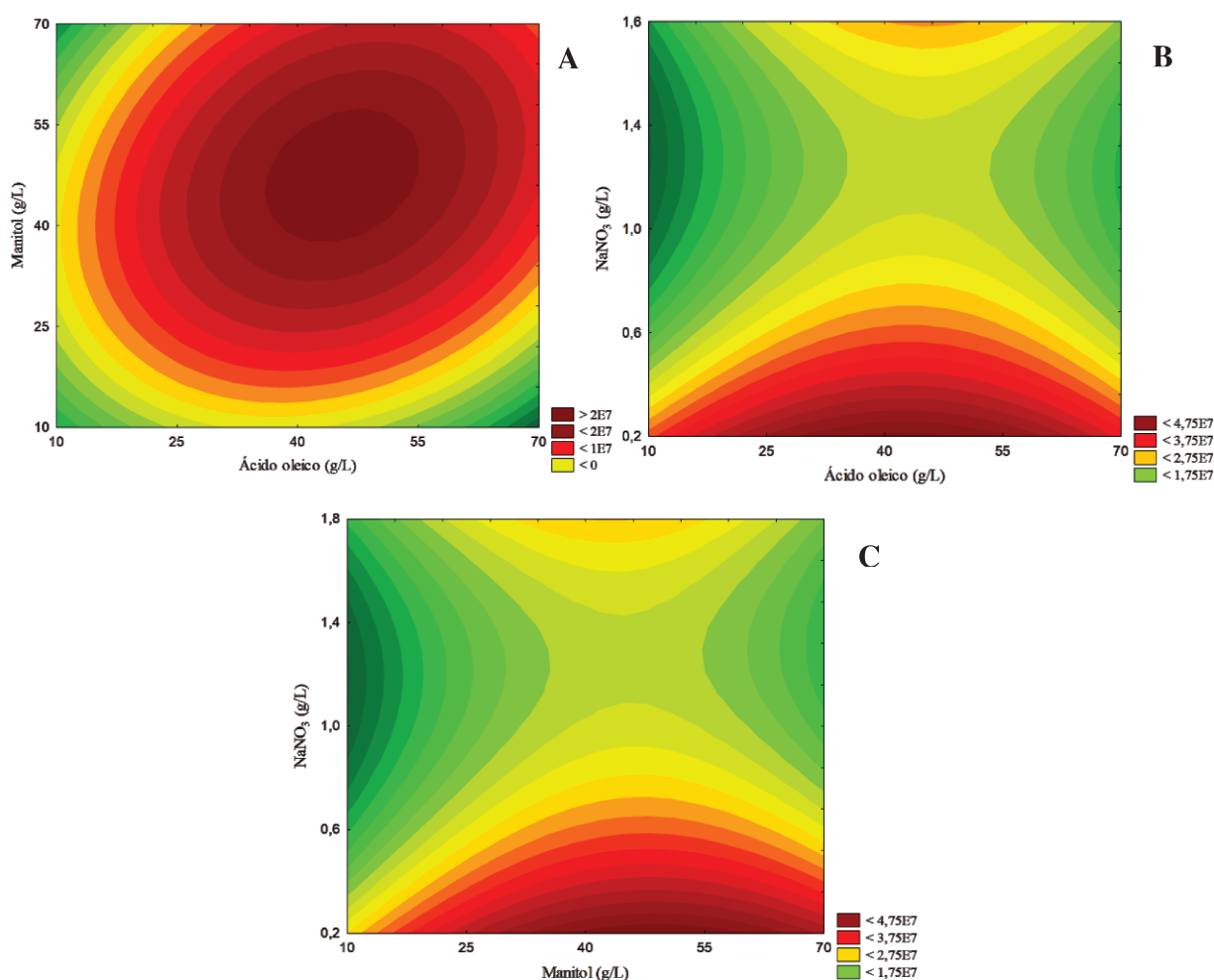


Figura 23. Curvas de contorno do processo de produção de MELs, expresso em área total de isoformas, por *P. aphidis* UFMG-Y3468 utilizando ácido oleico e manitol como fontes de carbono. DCCR-III.

A partir das curvas contorno apresentadas é possível concluir que a concentração ótima de ácido oleico para a maior produção de MELs, em termos de área total, foi em torno de 45 g/L, sendo que essa mesma concentração pode ser considerada a ótima para a fonte de carbono hidrofílica, no caso o manitol. Além disso, observa-se também que para alcançar uma condição de maior produção de biossurfactantes, a concentração de nitrato de sódio poderia ser fixada no menor nível avaliado no planejamento em questão, cerca de 0,2 g/L. Diferentemente do que foi observado para a resposta extrato bruto do DCCR-III em que seriam necessárias concentrações superiores a 55 g/L de ácido oleico para que a produção do extrato fosse maximizada, foi possível estimar uma região ótima para a concentração de substrato hidrofóbico para uma maior produção de isoformas. Assim, considerando que essas isoformas estão presentes no extrato bruto, seria necessário ampliar da faixa de concentração analisada para o componente hidrofóbico visando maximizar a produção de extrato bruto e posteriormente verificar se as condições ótimas para a produção de isoformas seria mantida.

5.6.2 Influência do meio de cultivo na composição de isoformas de MELs por *P. aphidis* UFMG- Y3468 através de análise quimiométrica

Os dados para os três delineamentos experimentais executados foram tratados quimiometricamente através da análise de componentes principais (PCA) de forma complementar no intuito de gerar informações sobre a distribuição e possíveis correlações que poderiam haver no conjunto de dados obtidos e que não foram evidenciadas através dos tratamentos estatísticos outrora utilizados nesse trabalho.

A análise de componentes principais é uma metodologia exploratória de análise multivariada que tem sido amplamente utilizada para a redução da dimensionalidade de dados sem que as relações entre as amostras sejam afetadas (FERREIRA, 2015). Esse método não-supervisionado tem sido aplicado para identificar combinações lineares de múltiplos picos obtidos por espectrometria de massas, revelando similaridades e diferenças em dados adquiridos de diferentes amostras (PACHUTA, 2004; GRAHAM et al., 2006; VAEZIAN et al., 2010). Além disso, a PCA tem se mostrado promissora para a interpretação de conjuntos de dados obtidos durante os processos biotecnológicos, incluindo etapas de “*upstream*” e “*downstream*” (RATHORE et al., 2011).

Assim, as Figuras 24, 25 e 26 ilustram os gráficos de scores e pesos de PC1 vs PC2 para cada DCCR realizado. Cabe salientar que o gráfico A mostra a distribuição das amostras

ao longo das componentes principais e o gráfico B sobrepõem essa informação com os pesos (denotados pelas variáveis de estudo e isoformas de MELs identificadas). Para facilitar a visualização foram atribuídos símbolos diferentes (▲ e +) para as amostras em que foi observado maior e menor produção de MELs.

A Figura 24 A mostra a distribuição das amostras do DCCR-I utilizando óleo de soja e glicose como fontes de carbono para a produção de MELs. Para os dados desse delineamento, a porcentagem de variância explicada pela PC1 foi 33,5%, enquanto que a PC2 descreve 20,8% da informação original dos dados.

Pode-se notar que as amostras localizadas mais a esquerda do gráfico de scores são aquelas em que houve a maior produção de MELs (maiores valores de área total de isoformas). Pode ser evidenciada a separação na primeira componente principal de dois grupos de amostras, aquelas marcadas em vermelho foram as que apresentaram maior produção de MEL. Em relação a área total pode-se comparar os extremos observados no gráfico para o grupo de maior e menor produção, as amostras 23 (mais a esquerda) e 21 (mais a direita), respectivamente. A área total referente a amostra 23 foi de $1,4 \times 10^7$ UA enquanto que para a amostra 21 foi encontrada $4,8 \times 10^5$ UA. A partir da sobreposição dos scores e pesos, Figura 24 B, pode ser observada a influência das variáveis sobre a distribuição das amostras. Além disso, para as amostras com maior produção de MELs, marcadas em vermelho, é possível visualizar diferentes sub-grupos de acordo com a sua disposição ao longo da PC1.

Entre os sub-grupos visualizados, aquele composto pelas amostras 6, 9, 10, 13, 14 e 24 na parte superior direita do gráfico de escores, é onde pode ser verificada a maior produção de isoformas de MEL-A-18 e MEL-B/MEL-C-20, sendo que o NaNO_3 foi a variável do meio de cultivo que teve maior influência nessa discriminação. O sub-grupo localizado mais abaixo composto pelas amostras 22, 23, 25, 26, 27 e 28, compreende os ensaios em que houve a maior produção das isoformas MEL-B/MEL-C-24 e MEL-B/MEL-C-26, variando de $1,4 \times 10^6$ UA a $2,6 \times 10^6$ UA, sendo a fonte de carbono hidrofílica e hidrofóbica determinante para essa discriminação.

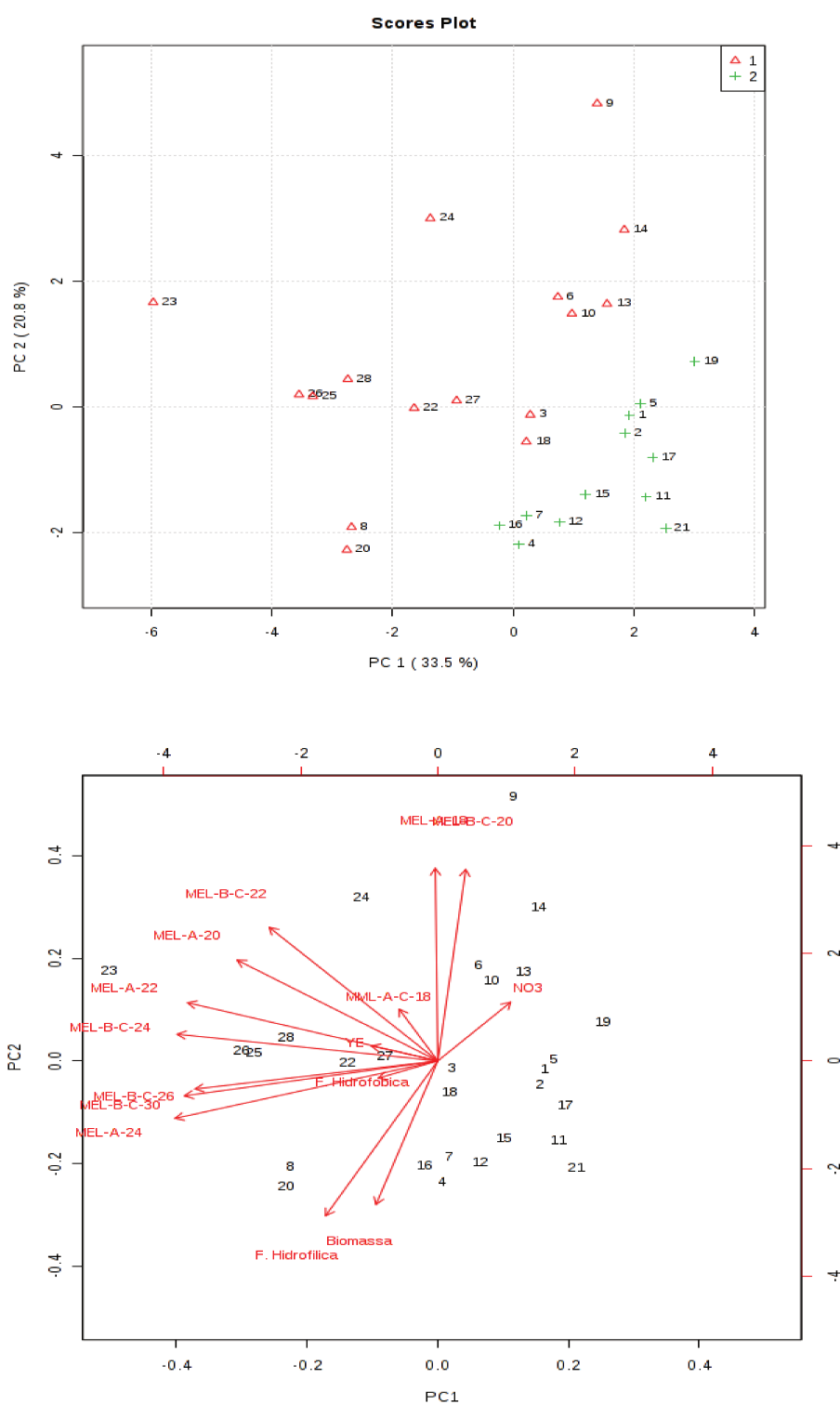
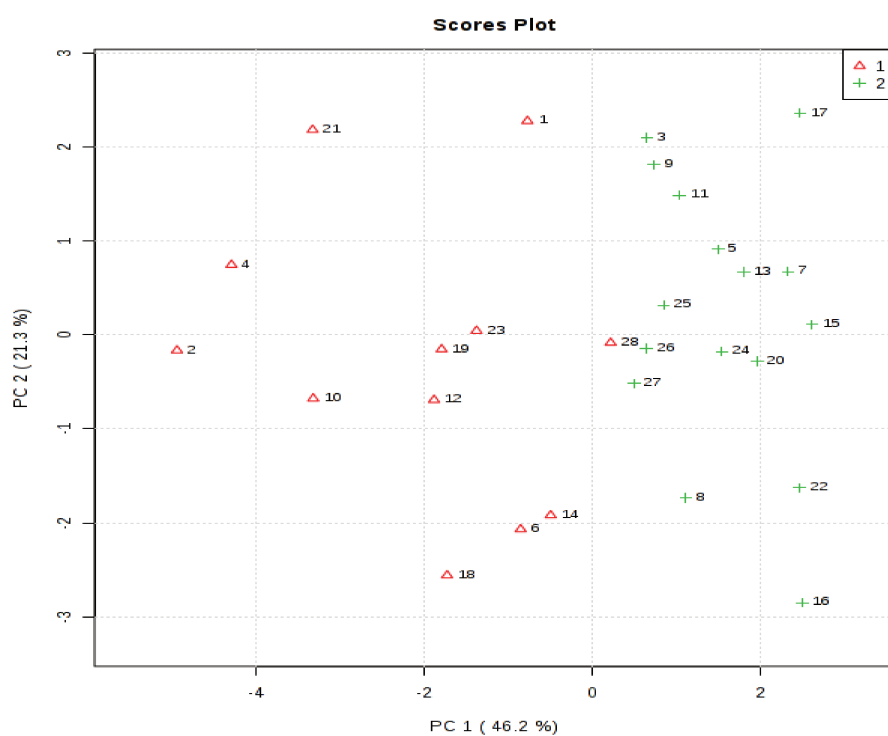


Figura 24. Gráfico dos escores de PC1 *versus* PC2, para os dados autoescalados dos 28 ensaios do DCCR-I (A). Gráfico biplot composto pela sobreposição do gráfico de escores e pesos (*loadings*)(B).

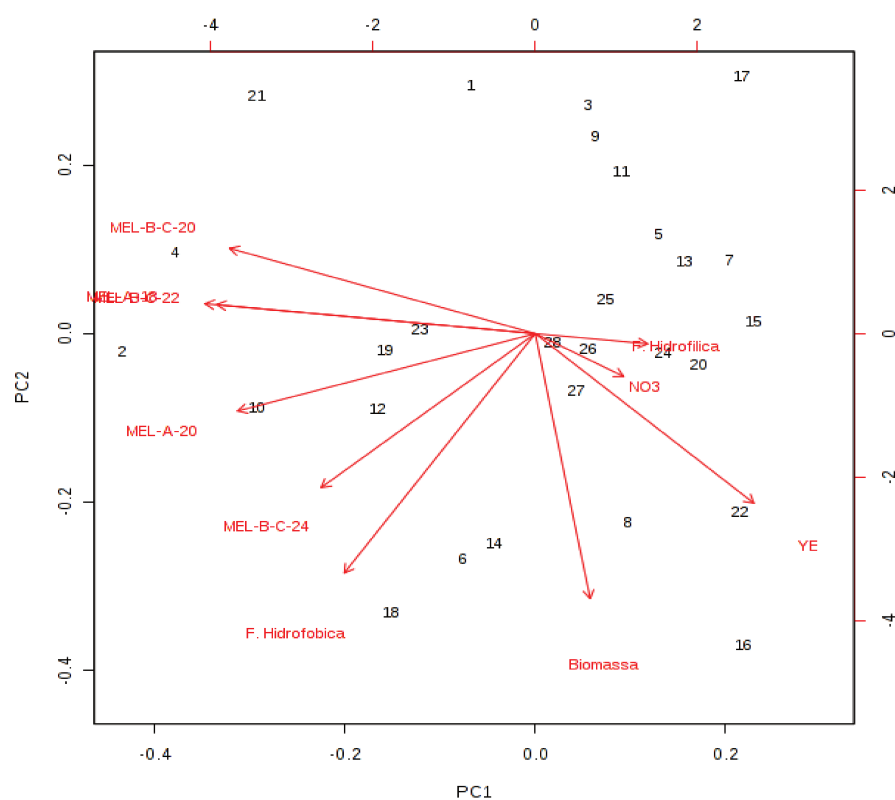
Com base nas informações apresentadas, o uso da análise de componentes principais se mostrou uma ferramenta importante para compreender o processo de produção de isoformas de MEL nos ensaios do DCCR-I pois permitiu identificar as similaridades e diferenças existentes entre as amostras, correlacionando essas informações com o tipo de isoforma de MEL produzida e as variáveis independentes estudadas nesse delineamento. Essas informações não poderiam ser fornecidas utilizando o planejamento experimental de forma isolada haja visto que no primeiro momento, as análises estatísticas foram realizadas com o intuito de construir um modelo preditivo para o processo em questão.

Assim como no DCCR-I, a análise de PCA para os dados do DCCR-II permitiu a discriminação de dois grupos de amostras, aquelas com maior e menor produção de MEL, considerando a soma de áreas das isoformas produzidas (Figura 25 A). Entretanto, a distribuição das amostras se mostrou muito diferente da visualizada para o primeiro delineamento, demonstrando que o conjunto de dados do DCCR-II possui informações singulares apesar de a única diferença entre eles ser a fonte de carbono hidrofílica utilizada, no DCCR-I foi utilizado glicose e no DCCR-II manitol.

A porcentagem de variação explicada pelas duas componentes principais foi de 67,5%, sendo 46,2% pela PC1 e 21,3% pela PC2. Pode-se observar que entre as amostras com melhor perfil de produção, destacam-se as 2, 4, 10 e 21 que compõem um sub-grupo com área total de isoformas variando de $1,31 \times 10^7$ UA a $1,75 \times 10^7$ UA. Em relação ao tipo de isoforma de MEL produzida, esses são os ensaios do DCCR-II em que foi observada maior produção de isoformas MEL-A-18 e MEL-B/MEL-C-22. Adicionalmente, o sub-grupo composto pelas amostras 6, 12, 14, 18, 19 e 23 consiste no conjunto em que foi observada maior produção de isoformas MEL-A-20 e MEL-B/MEL-C-24. Considerando a influência das variáveis independentes utilizadas no DCCR-II, nota-se forte correlação positiva da fonte de carbono hidrofóbica com o grupo de amostras com maior produção de MELs.



A



B

Figura 25. Gráfico dos escores de PC1 *versus* PC2, para os dados autoescalados dos 28 ensaios do DCCR-II (A). Gráfico biplot composto pela sobreposição do gráfico de escores e pesos (*loadings*) (B).

É interessante notar que assim como foi verificado nas curvas de contorno do DCCR-II, as fontes de nitrogênio (nitrato e extrato de levedura) e a fonte de carbono hidrofílica influenciaram negativamente a produção de MELs, contribuindo para a discriminação dos grupos com maior e menor capacidade de produção de biossurfactantes (Figura 25 B). Em contrapartida, a fonte de carbono hidrofóbica foi a variável determinante para o grupo de ensaios com melhor perfil de produção de MEL de forma geral.

Na análise de componentes principais dos dados do DCCR-III novamente foram discriminados dois grupos em relação a capacidade de produção de MELs (Figura 26). Entretanto, diferentemente das análises de PCA para o conjunto de dados do DCCR-I e DCCR-II, a distribuição das amostras foi menos homogênea, principalmente para aquelas do grupo com menor produção.

A porcentagem de variação explicada pela PC1 foi 37,8 %, enquanto que a PC2 descreveu 25,2% da informação original dos dados do delineamento em que ácido oleico e manitol foram utilizados como fontes de carbono (Figura 26 A). Podem ser observados dois sub-grupos dentro do grupo de amostras com maior potencial de produção de MEL, o primeiro compreendendo as amostras 1, 4, 7, 8, 12 e 22, em que as principais isoformas produzidas foram a MEL-A-18, MEL-A-20, MEL-B/MEL-C-20 e MEL-B/MEL-C-22. A variável independente que demonstrou relevância para o agrupamento desses ensaios foi a fonte hidrofílica utilizada no processo.

Em contrapartida, o segundo sub-grupo observado no gráfico de scores compreendeu as amostras 2, 21, 24 e 26, sendo a fonte hidrofóbica a variável mais relevante por discriminar essas amostras das demais entre as produtoras de MEL. Além disso, para esse grupo de amostras as isoformas mais produzidas foram MEL-A-22:1, MEL-A-22 e MEL-B/MEL-C-24 (Figura 26 B). Da mesma forma como verificado para o DCCR-II, percebeu-se que as fontes de nitrogênio possuíam correlação com as amostras com menores valores de produção de MEL.

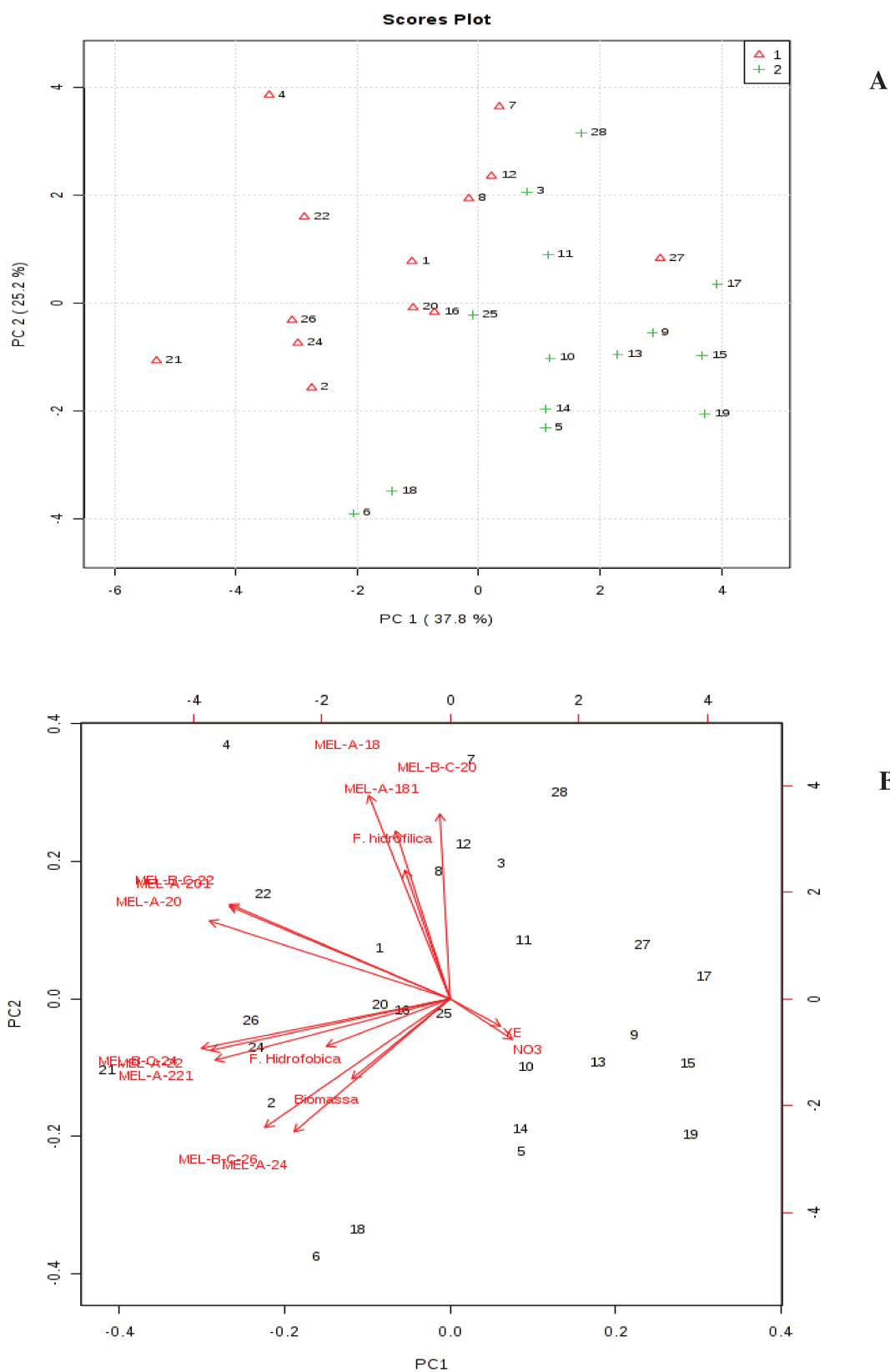


Figura 26. Gráfico dos escores de PC1 *versus* PC2, para os dados autoescalados dos 28 ensaios do DCCR-III (A). Gráfico biplot composto pela sobreposição do gráfico de escores e pesos (*loadings*) (B).

Portanto, para os três delineamentos experimentais executados nesse trabalho foram observadas correlações diferenciais entre o tipo de isoforma de MEL produzido e as variáveis independentes que afetavam a produção. A fonte hidrofóbica para ambos os delineamentos se mostrou determinante para a discriminação do grupo de amostras com maior potencial de produção de MELs, enquanto que as fontes de nitrogênio influenciaram negativamente a produção de MEL para o DCCR-II e DCCR-III. A primeira observação corrobora com estudos anteriores em que diferentes fontes de carbono aplicadas no processo biotecnológico demonstraram influência diferencial sobre a composição de MELs produzidos por linhagens de *Pseudozyma* sp. (FUKUOKA et al., 2007; KONISHI et al., 2008; MORITA et al., 2011a).

Deve ser destacado também que a suplementação do meio de cultivo com manitol não se mostrou importante no direcionamento da produção de MML haja visto que nos dois delineamentos em que esse substrato foi utilizado não foram identificadas isoformas de MML como ocorreu quando apenas ácido oleico foi aplicado como fonte de carbono. Esse comportamento foi diferente do observado por Morita e colaboradores nos estudos de produção de MML, MAL e MRL em que a adição de um precursor hidrofílico foi determinante para a produção desses análogos de MEL (MORITA et al., 2009; MORITA et al., 2012b; MORITA et al., 2015).

Dessa forma, a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 utilizada nesse trabalho pode ser objeto de estudo para trabalhos em metabolômica para que sejam investigados os fatores que determinam a produção de MML, além dos fatores que possam estimular a especificidade na produção desse biossurfactante. Além disso, a análise multivariada de dados dos delineamentos experimentais através de PCA possibilitou a visualização das correlações existentes entre as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas simultaneamente sobre a composição de MELs produzidos pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468. Portanto, sugere-se que com base nessas informações novos estudos explorem o potencial biotecnológico dessa linhagem e que estratégias de delineamento sejam elaboradas para a otimização do processo de produção de MELs.

6. CONCLUSÃO GERAL

O trabalho desenvolvido nesta tese avaliou o potencial biotecnológico de linhagens de leveduras da família *Ustilagenaceae* para a produção de biossurfactantes através de um estudo inicial de *screening* utilizando meios de cultivo rico em nutrientes e meio mínimo com glicose como fonte de carbono. Entre as 34 linhagens estudadas foi possível a seleção de quatro linhagens de *Pseudozyma aphidis* (UFMG-Y1387, UFMG-Y3468, UFMG-Y3533 e UFMG-Y5768) com potencial de produção de compostos tensoativos, capazes de reduzir a tensão superficial dos meios de cultivo para valores menores que 32 mN/m. Além disso, essas linhagens foram capazes de crescer e produzir biossurfactantes em meio mineral contendo diferentes fontes de carbono, incluindo glicose, ácido oleico e óleo de soja, apresentando valores de tensão superficial variando de 26,93 mN/m até 30,12 mN/m após 192 horas de processo. Entre as quatro leveduras selecionadas a linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 apresentou melhores resultados em termos de redução da tensão superficial e de diluição micelar crítica (CMD) para os diferentes meios de cultivo testados, sendo utilizada para as demais etapas do trabalho.

Sequencialmente, foi realizada a identificação dos biossurfactantes através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas, confirmando o potencial biotecnológico da linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 em produzir manosileritritol lipídeos (MELs) utilizando glicose e ácido oleico como fontes de carbono. Essa linhagem foi capaz de produzir majoritariamente MEL-A, sendo verificado também sua capacidade de produção de MEL do tipo B e C e pela primeira vez foi constatada a produção de manosilmanitol lipídeo (MML) por uma espécie de *P. aphidis*. Para fins comparativos a etapa de purificação e caracterização foi conduzida para os meios de cultivo das linhagens de *P. aphidis* UFMG-Y3468 e *P. aphidis* UFMG-Y5768. Essa segunda linhagem foi utilizada para avaliar se haveriam diferenças intra-espécie em relação aos biossurfactantes glicolipídicos produzidos. Foi confirmado o potencial de produção de MEL-A (majoritariamente MEL-A-18), MEL-B/MEL-C e MML pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 e de MEL-A (majoritariamente MEL-A-20), MEL-B/MEL-C pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y5768. Portanto, foi demonstrada que linhagens de mesma espécie são capazes de produzir diferentes tipos de biossurfactantes glicolipídicos quando cultivadas nas mesmas condições.

Os glicolipídeos produzidos pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y3468 apresentaram baixos valores de CMC, variando de 0,94 mg/L para o MML, 1,26 mg/L para o

MEL-B/MEL-C e 1,81 mg/L para o MEL-A, enquanto que valores superiores foram observados para os MELs produzidos pela linhagem de *P. aphidis* UFMG-Y5768, sendo encontrado uma CMC de 4,96 mg/L para o MEL-A e 3,65 mg/L para o MEL-B/MEL-C. Os valores de HLB dos compostos purificados variaram de 8,25 a 9,12, sugerindo a potencial aplicação desses compostos como agentes tensoativos, molhantes e dispersantes constituindo uma importante informação para o desenvolvimento de estudos futuros na área de cosméticos.

A etapa final do trabalho tratou do desenvolvimento três delineamentos experimentais para avaliar as melhores concentrações e os efeitos de glicose e manitol como fontes de carbono hidrofílicas, óleo de soja e ácido oleico como fontes de carbono hidrofóbicas e extrato de levedura e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, respectivamente. Como variáveis dependentes foram utilizadas a concentração de extrato bruto e a área total de isoformas de biossurfactantes identificadas por LC-ESI-MS. Utilizando como variável dependente a produção de extrato bruto, foi possível a construção de três modelos matemáticos preditivos estatisticamente válidos, com coeficientes de determinação maiores que maiores que 80%. Para o DCCR-I foi observada uma variação na produção de 5,87 g/L a 27,25 g/L de extrato bruto, sendo sugerido através da análise das curvas de contorno que a condição ótima para a produção seria aquela em que fossem utilizados concentrações de fontes de carbono em torno de 55 g/L e 5 g/L de extrato de levedura. A produção de extrato bruto nos ensaios do DCCR-II e DCCR-III variou de 4,62 g/L a 27,75 g/L e 5,0 g/L a 28 g/L, respectivamente. Através da análise das curvas de contorno para esses dois delineamentos foi observada a importância do aumento da concentração de óleo de soja e ácido oleico para valores maiores que 55 g/L para que uma maior produção de extrato fosse alcançada.

Utilizando a área total de isoformas de biossurfactantes com variável dependente foi possível elaborar modelos preditivos com características estatísticas adequadas para o DCCR-II e DCCR-III, com coeficiente de determinação próximo de 91% e 76%, respectivamente. Além disso, foi verificado novamente para o DCCR-II a importância do aumento da concentração do componente hidrofóbico para que as condições ótimas de produção fossem alcançadas. Por fim, utilizando a ferramenta de PCA (Principal Component Analysis) foi constatado a forte influência da fonte de carbono hidrofóbica na discriminação dos ensaios com maior e menor produção de biossurfactantes para os três delineamentos realizados no trabalho.

Portanto, este trabalho atingiu os objetivos propostos demonstrando o potencial biotecnológico de leveduras da família *Ustilaginaceae* para a produção de biossurfactantes, especificamente manosilritritol lipídeos e manosilmanitol lipídeo utilizando meios de cultivo com fontes de carbonos simples e relativamente baratas. Além disso, foi demonstrado o potencial de aplicação dos produtos purificados considerando as suas características de CMC e HLB, fornecendo subsídios para novas investigações.

Como perspectivas futuras, podem ser sugeridos estudos para a continuidade e complementaridade desse trabalho com vistas a validação dos modelos matemáticos propostos, aumento da escala do processo fermentativo e estudo da aplicação dos compostos em formulações cosméticas e de alimentos, além da avaliação das suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antiproliferativas.

7. REFERÊNCIAS

ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p.116-125, 2012.

ALI RAZA, Z.; AHMAD, N.; KAMAL, S. Multi-response optimization of rhamnolipid production using grey rational analysis in Taguchi method. **Biotechnology Reports**, v.3, p.86-94, 2014.

ANDRÄ, J.; RADEMAN, J.; HOWE, J.; KOCH, M.H.J.; HEINE, H.; ZÄHRINGER, U.; BRANDENBURG, K. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. **Biological Chemistry**, v.387, p.301-310, 2006.

ANDRÉ, P.; VILLAIN, F. Free radical scavenging properties of mannitol and its role as a constituent of hyaluronic acid fillers: a literature review. **International Journal of Cosmetic Sciences**, v.39, p.355-360, 2017.

ARAUJO, L.V.; GUIMARÃES, C.R.; MARQUIT, R.L.S.; SANTIAGO, V.M.J.; SOUZA, M.P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D.M.G. Rhamnolipid and surfactin: anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v.63, p.171-178, 2016.

AREESIRISUK, A.; CHIU, C.H.; YEN, T.B.; LIU, C.H.; GUO, J.H. A novel oleaginous yeast strain with high lipid productivity and its application to alternative biodiesel production. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.51, p.411-418, 2015.

ARUTHELVI, J.I.; BHADURI, S.; UPPARA, P.V.; DOBLE, M. Mannosylerythritol lipids: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.1559-1570, 2008.

ARUTHELVI, J.I.; DOBLE, M. Mannosylerythritol lipids: microbial production and their applications. In: Soberón-Chávez G (ed) **Biosurfactants**, microbiology monographs 20. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 121–149, 2011.

ASMER, H.J.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.65, p.1460–1466, 1988.

ASH, M.; ASH, I. **Handbook of industrial surfactants** (1Ed). Synapse Information Resources, Inc., 2010.

ASSELINEAU, C.; ASSELINEAU, J. Trehalose-containing glycolipids. **Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids**, v.16, p.59–99, 1978.

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

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

BARROS, F.F.; PONEZI, A.N.; PASTORE, G.M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.35, p.1071–1078, 2008.

BASAK, G.; DAS, D.; DAS, N. Dual role of acidic diacetate sophorolipid as biostabilizer for ZnO nanoparticle synthesis and biofunctionalizing agent against *Salmonella enterica* and *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.87–96, 2014.

BEGEROW, D.; SCHÄFER, A.M.; KELLNER, R.; YURKOV, A.; KEMLER, M.; OBERWINKLER, F.; BAUER, R. Ustilaginomycotina. In: Esser K (ed) **The Mycota-Systematics and Evolution- Part A**. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, pp 295–329, 2014.

BENEITO-CAMBRA, M.; HERRERO-MARTÍNEZ J.M.; RAMIS-RAMOS, G. Analytical methods for the characterization and determination of nonionic surfactants in cosmetics and environmental matrices. **Analytical Methods**, v.5, p.341–354, 2013.

BRASIL. DECRETO Nº 2, DE 03 DE FEVEREIRO DE 1994. Aprova o texto do Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada na Cidade do Rio de Janeiro, no período de 5 a 14 de junho de 1992, Brasília,DF, Fev 1994. Disponível em:

<<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decleg/1994/decretolegislativo-2-3-fevereiro-1994-358280-publicacaooriginal-1-pl.html>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

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

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

ČEJKOVÁ, A.; SCHREIBEROVÁ, O.; JEZDIK, R.; CHUDoba, J.; JIRKU, V.; ŘEZANKA, T.; MASAK, J. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* as producers of rhamnolipids. **Journal of Biotechnology**, v.185, S119–S120, 2014.

CHANG, M.H.; KIM, H.J.; JAHNG, K.Y.; HONG, S.C. The isolation and characterization of *Pseudozyma* sp. JCC 207, a novel producer of squalene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78, p.963–972, 2008.

CHANG, S.Y.; LIU, L.; ASHER, S.A. Preparation and properties of tailored morphology, monodisperse colloidal silica-cadmium sulfide nanocomposites. **Journal of the American Chemical Society**, v.116, p.6739-6744, 1994.

CHANDRADASS, J.; BAE, D.S. Synthesis and characterization of alumina nanoparticles by Igepal CO-520 stabilized reverse micelle and sol-gel processing. **Materials and Manufacturing Processes**, v.23, p.494-498, 2008.

CHEN, J.; HUANG, P.T.; ZHANG, K.Y.; DING, F.R. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter* sp. from petroleum-contaminated soil. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, p.660–671, 2012.

CHOI, J.H.; MOON, K.H.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. Production of xylitol in cell recycle fermentations of *Candida tropicalis*. **Biotechnological Letters**, v.22, p.1625-1628, 2000.

CONROZIER, T.; MATHIEU, P.; RINAUDO, M. Mannitol preserves the viscoelastic properties of hyaluronic acid in a in vitro model of oxidative stress. **Rheumatology and Therapy**, v.1, p.45-54, 2014.

CORAZZA, M.; LAURIOLA, M.M.; ZAPPATERRA, M.; BIACHI, A.; VIRGILI, A. Surfactants, skin cleansing protagonists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.24, p.1-6, 2009.

DANIEL, H.J.; OTTO, R.T.; BINDER, M.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deprotenized whey concentrates as substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.40–45, 1999.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Microbial surfactants of marine origin: Potentials and prospects. Em: SEN, R. (Ed) **Biosurfactants**, Springer series: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Science + Business Media. New York, USA, .672, p. 88–100, 2010.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, v.42, p.499–504, 2009.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.79, p.246-253, 2010.

DE SOUSA, J.R.; CORREIA, J.A.C.; ALMEIDA J.G.L.; RODRIGUES, S.; PESSOA, O.D.L.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. **Process Biochemistry**, v.46, p.1831-1839, 2011.

DEEBA, F.; PRUTHI, V.; NEGI, Y.S. Fostering triacylglycerol accumulation in novel oleaginous yeast *Cryptococcus psychrotolerans* IITRFD utilizing groundnut shell for improved biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.242, p.113-120, 2017.

DEEPIKA, K.V.; KALAM, S.; SRIDHAR, P.R.; 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**, v.5, p.38-47, 2016.

DENGLE-PULATE, V.; BHAGWAT, S.; PRABHUNE, A. Microbial oxidation of medium chain fatty alcohol in the synthesis of sophorolipids by *Candida bombicola* and its

physicochemical characterization. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.16, p.173–181, 2013.

DENGLE-PULATE, V.; CHANDORKAR, P.; BHAGWAT, S.; PRABHUNE, A. Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.17, p.543–552, 2014.

DESAI, J.; DESAI, A. Production of biosurfactants. Em: Kosaric, N. (Ed.) **Biosurfactants: production, properties and applications**, Marcel Dekker, New York, p. 65-97, 1993.

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

DESPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, v.54, p.43–150, 1995.

DÍAZ DE RIENZO, M.A.; BANAT, I.M.; DOLMAN, B.; WINTERBURN, J.; MARTIN, P.J. Sophorolipid biosurfactants: possible use as antibacterial and antibiofilm agent. **New Biotechnology**, v.32, p.720–726, 2015.

DÍAZ DE RIENZO, M.A.; KAMALANATHAN, I.D.; MARTIN, P.J. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC9027 using foam fractionation. **Process Biochemistry**, v.51, p.820–827, 2016

DO VALLE GOMES, M.Z.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v.25, p.441-447, 2012.

DUBEAU, D.; DEZIEL, E.; WOODS, D.E.; LEPINE, F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC Microbiology**, v.9, p.263, 2009.

ELAZZAZY, A.M.; ABDELMONEIM, T.S.; ALMAGHRABI, O.A. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.22, p.466-475, 2014.

ENSHAEIEH, M.; MADANI, M.; GHOSAVAND, S. Optimizing of lipid production in *Cryptococcus heimaeyensis* through M32 array of Taguchi design. **Process Safety and Environmental Protection**, v.111, p.757-765, 2017.

EQLI, T.; ZINN, M. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. **Biotechnology Advances**, v.22, p.35-43, 2003.

ERYASAR K.; KARASU-YALCIN, S. Evaluation of some lignocellulosic byproducts of food industry for microbial xylitol production by *Candida tropicalis*. **3 Biotech**, v.6, p.202, 2016.

FAI, A.E.C.; SIMIQUELI, A.P.R.; ANDRADE, C.J.; GHISELLI, G.; PASTORE, G.M. Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: An integrated process. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, p.535-542, 2015.

FAN, L.; LI, H.; CHEN, Q. Characterization and inducing melanoma cell-apoptosis activity of mannosylerythritol lipids-A produced from *Pseudozyma aphidis*. **Plos One**, e0148198, p.1-17, 2016.

FAN, L.; XIE, P.; WANG, Y.; HUANG Z.; ZHOU, J. Biosurfactant-Protein interaction: Influences of mannosylerythritol lipids-A on β -glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, publication date (Web): December 14, 2017.

FARIA, N.T.; SANTOS, M.V.; FERNANDES, P.; FONSECA, L.L.; FONSECA, C.; FERREIRA, F.C. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, from pentoses and D-glucose/D-xylose mixtures by *Pseudozyma* yeast strains. **Process Biochemistry**, v.49, p.1790-1799, 2014.

FELDBRÜGGE, M.; KELLNER, R.; SCHIPPER, K. The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.3253–3265, 2013.

FERREIRA, M.M.C. **Quimiometria. Conceitos, Métodos e Aplicações**. Ed.1. Editora Unicamp, Campinas, SP, Brasil, 2015.

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; SMYTH, T.J.P.; BANAT, I.M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.112, p.617–627, 2010.

FUKUOKA, T.; KAWAMURA, M.; MORITA, T.; IMURA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma crassa*, produces novel diastereomers of conventional mannosylerythritol lipids as glycolipid biosurfactants. **Carbohydrate Research**, v.343, p. 2947-2955, 2008a.

FUKUOKA, T.; MORITA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid-B. **Carbohydrate Research**, v.343, p.555-560, 2008b.

FUKUOKA, T.; MORITA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; SAKAI, H.; KITAMOTO, D. Structural characterization and surface-active properties of a new glycolipid biosurfactant, mono-acylated mannosylerythritol lipid, produced from glucose by *Pseudozyma antarctica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, p.801-810, 2007.

FUNSTON, S.J.; TSAOUSI, K.; RUDDEN, M.; SMYTH, T.J.; STEVENSON, P.S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Characterising rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* E264, a non-pathogenic producer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p.7945–7956, 2016.

GANDHI, N.R.; SKEBBA, V.L.P. Rhamnolipid compositions and related methods of use. US Patent N° WO 2007095258 A2.

GAO, J.; YUAN, W.; LI, Y.; BAI, F.; JIANG, Y. Characterization of inulinase promoter from *Kluyveromyces marxianus* for intensive protein expression in industrial biotechnology. **FEMS Yeast Research**, v.17, 2017.

GEISER, E.; WIEBACH, V.; WIERCHX, N.; BLANK, L.M. Prospecting the biodiversity of the fungal family *Ustilaginaceae* for the production of value-added chemicals. **Fungal Biology and Biotechnology**, v.1, p. 1-10, 2014.

GENOT, C.; KABRI, T.H.; MEYNIER, A. 5- Stabilization of omega-3 oils and enriched foods using emulsifiers. **Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids**, p.150-193, 2013.

GRAHAM, D.J.; WAGNER, M.S.; CASTNER, D.G. Information from complexity: Challenges of TOF-SIMS data interpretation. **Applied Surface Science**, v.252, p.6860-6868, 2006.

GRIFFIN, W.C. Calculations of HLB values of nonionic surfactants. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.5, p.249-256, 1954.

GUAN, R.; YUAN, X.; WU, Z.; WANG, H.; JIANG, L.; LI, Y.; ZENG, G. Functionality of surfactants in waste-activated sludge treatment: A review. **Science of The Total Environment**, v.609, p.1433-1442, 2017.

GUEVARRA, E.D; TABUCHI, T. Accumulation of itaconic, 2-hydroxyparaconic, itatartatic, and malic acids by strains of the genus *Utilago*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.54, p.2353-2358, 1990.

GÜNTHER, M.; GRUMAZ, C.; LORENZ, S.; STEVENS, P.; LINDEMANN, E.; HIRTH, T.; SOHN, K.; ZIKEB, S.; RUPP, S. The transcriptomic profile of *Pseudozyma aphidis* during production of mannosylerythritol lipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, p.1375-1388, 2015.

GOOSSENS, E.; WIJNANTS, M.; PACKET, D.; LEMIÈRE, F. Enhanced separation and analysis procedure reveals production of tri-acylated mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma aphidis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, p. 1537-1550, 2016.

HASSAN, M.; ESSAM, T.; YASSIN, A.S.; SALAMA, A. Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett-Burman design. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.82, p.573-579, 2016.

HASSAS, B.V.; KARAKAS, F.; ÇELİK, M.S. Ultrafine coal dewatering: Relationship between hydrophilic lipophilic balance (HLB) of surfactants and coal rank. **International Journal of Mineral Processing**, v. 133, p.97-104, 2014.

HELLMUTH, H.; BODE, N.; DREJA, M.; BUHL, A. (2016) **Detergent comprising a mannosylerythritol lipid**. Alemanha, Patente DE102014221889.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.F.; COSTA, I.A.L.; SILVA, D.D.V.; DUSSÁN, K.; VILLELA, T.R.; CANETTIERI, E.V.; CARVALHO, J.A.; SOARES NETO, T.G.; FELIPE, M.G.A.

Biochemical conversion of sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate supplemented with co-substrates for xylitol production. **Bioresource Technology**, v.200, p.1085-1088, 2016.

HIEMENZ, P.C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. 3 Ed, Taylor & Francis, New York, 1997.

HIRATA, Y.; RYU, M.; ODA, Y.; IGARASHI, K.; NAGATSUKA, A.; FURUTA, T.; SUGIURA, M. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.108, p.142–146, 2009.

HOŠKOVÁ M, SCHREIBEROVÁ O, JEŽDÍK R, CHUDOBA J, MASÁK J, SIGLER K, ŘEZANKA T. Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. **Bioresource Technology**, v.130, p.510–516, 2013.

HU, Y.; JU, L.K. Purification of lactonic sophorolipids by crystalization. **Journal of Biotechnology**, v.87, p.263–272, 2001.

IMURA, T.; MASUDA, Y.; MINAMIKAWA, H.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; MORITA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Enzymatic conversion of diacetylated sophorolipid into acetylated glucoselipid: surface-active properties of novel bolaform biosurfactants. **Journal of Oleo Science**, v.59, p.495–501, 2010.

INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. Biosurfactant MEL-A dramatically increases gene transfection via membrane fusion. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 423-431, 2004.

ISHIKAWA, E.; ISHIKAWA, T.; MORITA, Y.S.; TOYONAGA, K.; YAMADA, H.; TAKEUCHI, O.; KINOSHITA, T.; AKIRA, S.; YOSHIDA, Y.; YAMASAKI, S. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. **The Journal of Experimental Medicine**, v.206, p. 2879–2888, 2009.

ISSHIKI, S.; SHITASUE, S.; MASE, T.; KONDO, T.; KAMINO, S.; KAMEI, Y. Characterization of an aminopeptidase from *Pseudozyma hubeiensis* 31-B and potential applications. **Mycoscience**, v.58, p.60–67, 2017.

JAN, A.H.; SUBILEAU, M.; DEYRIEUX, C.; PERRIER, V.; DUBREUCQ, E. Elucidation of a key position for acyltransfer activity in *Candida parapsilosis*

lipase/acyltransferase (CpLIP2) and in *Pseudozyma antarctica* lipase A (CAL-A) by rational design. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1864, p.187–194, 2016.

JEYA, M.; LEE, K.M.; TIWARI, M.K.; KIM, J.S.; GUNASEKARAN, P.; KIM, S.W.; KIM, I.W.; LEE, J.K. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83, p.225–231, 2009.

JIANG, H.; MENG, X.; DAI, H.; DENG, J.; LIU, Y.; ZHANG, L.; ZHAO, Z.; ZHANG, R. High-performance porous spherical or octapod-like single-crystalline BIVO₄ photocatalysts for the removal of phenol and methylene blue under visible-light illumination. **Journal of Hazardous Materials**, v.217, p.92–99, 2012.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: optimization, monitoring and effect of mixing. **Biochemical Engineering Journal**, v.115, p.93–100, 2016.

JOHNSON, E.A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts- the ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.503–517, 2013b.

JOHNSON, E.A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts- the basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.7563–7577, 2013a.

KAUPERT NETO, A.A.; BORIN, G.P.; GOLDMAN, G.H.; DAMÁSIO, A.R.L.; OLIVEIRA, J.V.C. Insights into the plant polysaccharide degradation potential of the xylanolytic yeast *Pseudozyma brasiliensis*. **FEMS Yeast Research**, v.16:117, 2016.

KHAN, I.; OH, D. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.34, p.376–384, 2016.

KIELISZEK, M.; KOT, A.M.; BZDUCHA-WRÓBEL, A.; BLAZEJAK, S.; GIENTKA, I.; KURCZ, A. Biotechnology use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. **Fungal Biology Reviews**, v.31, p.185–198, 2017.

KIM, O.S.; JEON, J.W.; LEE, H.W.; PARK, Y.I.; SEO, W.T.; OH, H.M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.; YOON, B.D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v.24, p.225–229, 2002.

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

KITAMOTO, D.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T. Self-assembling properties of glycolipids biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p.315-328, 2009.

KITAMOTO, D.; YANAGISHITA, H.; KITAMOTO, H. Contribution of a chain-shortening pathway to the biosynthesis of the fatty acids of mannosylerythritol lipid (biosurfactant) in the yeast *Candida antarctica*: effect of β -oxidation inhibitors on biosurfactant synthesis. **Biotechnology Letters**, v.20, p.813-818, 1998.

KONISHI, M.; NAGAHAMA, T.; FUKUOKA, T.; MORITA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D.; HATADA, Y. Yeast extract stimulates production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma hubeiensis* SY62. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.111, p.702-705, 2011.

KONISHI, M.; YOSHIDA, Y.; HORIUCHI, J. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.119, p.317–322, 2015.

KONISHI, M.; MAKINO, M. Selective production of deacetylated mannosylerythritol lipid, MEL-D, by acetyltransferase disruption mutant of *Pseudozyma hubeiensis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.125, p.105-110, 2018.

KONISHI, M.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KAKUGAWA, K.; KITAMOTO, D. Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by newly isolated yeast strains belonging to the genus *Pseudozyma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, 521-529, 2007.

KÜGLER, J.H.; MUHLE-GOLL, C.; KÜHL, B.; KRAFT, A.; HEINZLER, R.; KIRSCHLÖFER, F.; HENKEL, M.; WRAY, V.; LUY, B.; BRENNER-WEISS, G.; LANG, S.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Trehalose lipid biosurfactants produced by the actinomycetes *Tsukamurella spumae* and *T. pseudospumae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p.8905–8915, 2014.

KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B. Application of *Rhodococcus* in bioremediation of contaminated environments. Em: ALVAREZ, H.M. (ed) **Biology of *Rhodococcus***. Springer, Berlin, p. 231–262, 2010.

LANG, S.; PHILP, J.C. Surface-active lipids in rhodococci. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.74, p.59–70, 1998.

LECHUGA, M.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; JURADO, E.; NÚÑEZ-OLEA, J.; RÍOS, F. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.125, p.1-8, 2016.

LÉMERY, E.; BRIANÇON, S.; CHEVALIER, Y.; BORDES, C.; ODDOS, T.; GOHIER, A.; BOLZINGER, M.A. Skin tootoxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.469, p.166-179, 2015.

LEVINSON, W.E.; KURTZMAN, C.P.; KUO, T.M. Production of itaconic acid by *Pseudozyma antarctica* NRRL Y-7808 under nitrogen-limited growth conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 824-827, 2006.

LIU, J.; CHEN, Y.; XU, R.; JIA, Y. Screening and evaluation of biosurfactant-producing strains isolated from oilfield wastewater. **Indian Journal of Microbiology**, v.53, p.168-174, 2013.

LIU, J.; YUAN, M.; LIU, J.N.; HUANG, X.F. Bioconversion of mixed volatile fatty acids into microbial lipids by *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. **Bioresource Technology**, v.241, p.645-651, 2017.

LIU, J.H.; CHEN, M.M.; HUANG, J.W.; WANN, H.; HO, L.K.; PAN, W.H.T.; CHEN, Y.C.; LIU, C.M.; YEH, M.Y.; TSAI, S.K.; YOUNG, M.S.; HO, L.T.; KUO, C.D.; CHUANG, H.Y.; CHAO, F.P.; CHAO, H.M. Therapeutic effects and mechanisms of action of manitol during H₂O₂-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelium cells. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.26, p.249-257, 2010.

LORENZ, S.; GUENTHER, M.; GRUMAZ, C.; RUPP, S.; ZIBEK, S.; SOHN, K. Genome sequence of the basidiomycetous fungus *Pseudozyma aphidis* DSM70725, an efficient producer of mannosylerythritol lipids. **Genome Announcements**, v.2, p. e00053-14,1-4, 2014.

MA, K.Y.; SUN, M.Y.; DONG, W.; HE, C.Q.; CHEN, F.L.; MA, Y.L. Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 for bioremediation of crude oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.6, p.144–151, 2016.

MA, X.; LI, H.; SONG, X. Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 376, p.165–172, 2012.

MA, X.; LI, H.; SONG, X. Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.376, p.165–172, 2012.

MA, X.J.; LI, H.; WANG, D.X.; SONG, X. Sophorolipid production from delignified corncob residue by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC1576 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 96219. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p.475–483, 2014.

MAASSEN, N.; PANAKOVA, M.; WIERCKX, N.; GEISER, E.; ZIMMERMANN, M.; BÖLKER, M.; KLINNER, U.; BLANK, L.M. Influence of carbon and nitrogen concentration on itaconic acid production by the smut fungus *Ustilago maydis*. **Engineering in Life Sciences**, v.14, p.129-134, 2014.

MADDIKERI, G.L.; GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. **Chemical Engineering Journal**, v.263, p.479–487, 2015.

MANAARGADOO-CATIN, M.; ALI-CHERIF, A.; POUGNAS, J.L.; PERRIN, C. Hemolysis by surfactants- A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.228, p.1-16, 2016.

MAO, X.; JIANG, R.; XIAO, W.; YU, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v.285, p.419-435, 2015.

MARQUÉS, A.M.; PINAZO, A.; FARFAN, M.; ARANDA, F.J.; TERUEL, J.A.; ORTIZ, A.; MANRESA, A.; ESPUNY, M.J. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.158, p.110–117, 2009

MARTÍNEZ, O.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; BARRENA, R. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. **Journal of Cleaner Production**, v.158, p.8-17, 2017.

MISHRA, M.; MUTHUPRASANNA, P.; SURYA PRABHA, K.; SOBHITA RANI, P.; SATISH BABU, I.A.; SARATH CHANDIRA, I.; ARUNACHALAM, G.; SHALINI, S. Basics and potential applications of surfactants- A review. **International Journal of Pharmaceutical Technology Research**, v.1, p.1354-1365, 2009.

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

MNIF, I.; GHRIBI, D. Microbial derived surface active compounds: properties and screening concept. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.1001-1020, 2015.

MOLINA, G.; ABRAHÃO, M.R.E.; PESSÔA, M.G.; BUTION, M.L.; PAULINO, B.N.; NÉRI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Industrial additives obtained through microbial biotechnology: bioflavors and biocolorants. Em: GUPTA, V.K.; SHARMA G.D.; TUOHY, M.G.; GAUR, R. (eds) **The Handbook of Microbial Bioresources**, 1ed. CABI Publishing, Boston, pp 549–566, 2016.

MOLINA, G.; FANARO, G.B. Introductory overview of biotechnological additives. Em: **Biotechnological Production of Natural Ingredients for Food Industry**. BICAS, J.L.; MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. (eds) Bentham Science Publishers. pp: 3-20, 2016.

MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; HIROSE, N.; KITAMOTO, D. Isolation and screening of glycolipid biosurfactant producers from sugarcane. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.76, 1788-1791, 2012a.

MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Formation of the two novel glycolipid biosurfactants, mannosylribitol lipid and mannosylarabitol lipid, by *Pseudozyma parantarctica* JCM 11752T. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.96, p.931–938, 2012b.

MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KOSAKA, A.; IMURA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Selective formation of mannosyl-L-arabitol lipid by *Pseudozyma tsukubaensis* JCM16987. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, p.5833-5841, 2015.

MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Production of mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.4691-4700, 2013a.

MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Accumulation of cellobiose lipids under nitrogen-limiting conditions by two ustilaginomycetous yeasts, *Pseudozyma aphidis* and *Pseudozyma hubeiensis*. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 44-49, 2013b.

MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; YAMAMOTO, S.; KITAGAWA, M.; SOGABE, A.; KITAMOTO, D. Production of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylmannitol lipid, by *Pseudozyma parantarctica* and its interfacial properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83, p.1017-1025, 2009a.

MORITA, T.; ISHIBASHI, Y.; HIROSE, N.; WADA, K.; TAKAHASHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid B, from sugarcane juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.75, p.1371-1376, 2011b.

MORITA, T.; KITAGAWA, M.; SUZUKI, M.; YAMAMOTO, S.; SOGABE, A.; YANAGIDANI, S.; IMURA, T.; FUKUOKA, T.; KITAMOTO, D. A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows potential moisturizing activity toward cultured human skin cells: the recovery effect of MEL-A on the SDS-damaged human skin cells. **Journal of Oleo Science**, v.58, p.639-642, 2009b.

MORITA, T.; ISHIBASHI, Y.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, using

sucrose by fungal and yeast strains, and their interfacial properties. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73, p.2352-2355, 2009c.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Discovery of *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73, p.305-313, 2006.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Physiological differences in the formation of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, between *Pseudozyma antarctica* and *Pseudozyma aphidis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74-307-313, 2007.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.105, p. 493-502, 2008c.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; SAKAI, H.; KITAMOTO, D. Efficient production of di- and tri-acylated mannosylerythritol lipids as glycolipid biosurfactants by *Pseudozyma parantarctica* JCM 11752. **Journal of Oleo Science**, v.57, p.557-565, 2008a.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; YAMAMOTO, S.; KITAGAWA, M.; SOGABE, A.; KITAMOTO, D. Identification of *Pseudozyma graminicola* CBS 10092 as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **Journal of Oleo Science**, v.57, p.123–131, 2008b.

MORITA, T.; OGURA, Y.; TAKASHIMA, M.; HIROSE, N.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KONDO, Y.; KITAMOTO, D. Isolation of *Pseudozyma churashimaensis* sp. nov., a novel ustilaginomycetous yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.112, p.137–144, 2011a.

MORITA, T.; TAKASHIMA, M.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Isolation of basidiomycetous yeast *Pseudozyma tsukubaensis* and production of glycolipid biosurfactant, a diastomer type of mannosylerythritol lipid-B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.88, p.679–688, 2010a.

MORITA, T.; ITO, E.; KITAMOTO, H.K.; TAKEGAWA, K.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Identification of the gene PaEMT1 for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica*. **Yeast**, v.27, p.905-917, 2010b.

MORYA, V.K.; PARK, J.; KIM, T.J.; JEON, S.; KIM, E. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v.143, p.282–288, 2013.

MOUAFI, F.E.; ELSOUD, M.M.A.; MOHARAM, M.E. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnology Reports**, v.9, p.31-37, 2016.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v.24, p.509-516, 2006.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants. Em: KOSARIC, N. (Ed) **Biosurfactants. Production, properties and applications**. Surfactant Science Series, v.48, Dekker New York, p.329-371, 1993.

NALANI, S.; PARTHASARATHI, R. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium* wilt of eggplant. **Annals of Agrarian Science**, In press, 2017.

NAYAK, A.S.; VIJAYKUMAR, M.H.; KAREGOUDAR, T.B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. **International Biodegradation & Biodegradation**, v.63, p.73-79, 2009.

NEGIN, C.; ALI, S.; XIE, Q. Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery. **Petroleum**, v.3, p.197-211, 2017.

NEHIR EL, S.; SIMSEK, S. Food technological applications for optimal nutrition: An overview of opportunities for the food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, p.2-12, 2012.

NERI-NUMA, I.A.; PAULINO, B.N.; PESSÔA, M.G.; ABRAHÃO, M.R.E.; BUTION, M.L.; MOLINA, G.; PASTORE, G.M. Industrial additives obtained through biotechnology: biosurfactants and prebiotic carbohydrates. Em: GUPTA, V.K.; SHARMA G.D.; TUOHY,

M.G.; GAUR, R. (eds) **The Handbook of Microbial Bioresources**, 1ed. CABI Publishing, Boston, pp: 528-548, 2016.

NGUYEN, T.T.; YOUSSEF, N.H.; MCINERNEY, M.J.; SABATINI, D.A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water Research**, v.42, p.1735-1743, 2008.

NICOLÒ, M.S.; CAMBRIA, M.G.; IMPALLOMENI, G.; RIZZO, M.G.; PELLICORIO, C.; BALLISTRERI, A.; GUGLIELMINO, S.P.P. Carbon source effects on the mono/di-rhamnolipid ratio produced by *Pseudomonas aeruginosa* L05, a new human respiratory isolate. **New Biotechnology**, v.39, p.36-41, 2017.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Advances**, v.21, p.1593-1600, 2005.

NIU, Y.; FAN, L.; GU, D.; WU, J.; CHEN, Q. Characterization, enhancement and modelling of mannosylerythritol lipid production by fungal endophyte *Ceriporia lacerate* CHZJU. **Food Chemistry**, v.228, p.610-617, 2017.

OHADI, M.; DEGHANNOUDEH, G.; SHAKIBAIE, M.; BANAT, I.M.; POURNAMDARI, M.; FOROOTANFAR, H. Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.12, p.1-9, 2017.

OHLENDORF, B.; LORENZEN, W.; KEHRAUS, S.; KRICK, A.; BODE, H.B.; KONIG, G.M. Myxotyrosides A and B, unusual rhamnosides from *Myxococcus* sp. **Journal of Natural Products**, v.72, p.82-86, 2009.

OLIVEIRA, J.V.C.; BORGES, T.A.; SANTOS, R.A.C.; FREITAS, L.F.D.; ROSA, C.A.; GOLDMAN, G.H.; RIAÑO-PACHÓN, D.M. *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov., a xylanolytic, ustilaginomycetous yeast species isolated from an insect pest of sugarcane roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.2159–2168, 2014.

OLKOWSKA, E.; POLKOWSKA, Z.; NAMIESNIK, J. Analytics of surfactants in the environment: problems and challenges. **Chemical Reviews**, v.111, p.5667-5700, 2011.

ONGHENA, M.; GEENS, T.; GOOSSENS, E.; WIJNANTS, M.; PICO, Y.; NEELS, H.; COVACI, A.; LEMIERE, F. Analytical characterization of mannosylerythritol lipid biosurfactants produced by biosynthesis based on feedstock sources from the agrofood industry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.400, p.1263-1275, 2011.

PACHUTA, S.J. Enhancing and automating TOF-SIMS data interpretation using principal component analysis. **Applied Surface Science**, v.231-232, p.217-223, 2004.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p.633-654, 2011.

PATOWARY, K.; PATOWARY, R.; KALITA, M.C.; DEKA, S. Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. **Frontiers in Microbiology**, v.8, article 279, 2017.

PARK, G.W.; CHANG, H.N.; JUNG, K.; SEO, C.; KIM, Y.C.; CHOI, J.H.; WOO, H.C.; HWANG, I. Production of microbial lipid by *Cryptococcus curvatus* on rice straw hydrolysates. **Process Biochemistry**, v.56, p.147-153, 2017.

PASQUALI, R.C.; SACCO, N.; BREGNI, C. The studies on hydrophilic-lipophilic balance (HLB): Sixty years after William C. Griffin's pioneer work (1949-2009). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, p.313-317, 2009.

PASQUALI, R.C.; TAUROZZI, M.P.; BREGNI, C. Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.356, p.44-51, 2008.

PAULINO, B.N.; PESSÔA, M.G.; MOLINA, G.; KAUPERT NETO, A.A.; OLIVEIRA, J.V.C.; MANO, M.C.R.; PASTORE, G.M. Biotechnological production of value-added compounds by ustilaginomycetous yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.101, p.1-21, 2017.

PEREIRA, A.G.; PACHECO, G.J.; TAVARES, L.F.; NEVES, B.C.; KRONEMBERGER, F.A.; REIS, R.S.; FREIRE, D.M.G. Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 48, p.1271-1278, 2013.

PÉREZ-TORRADO, R.; GAMERO, E.; GÓMEZ-PASTOR, R.; GARRE, E.; ARANDA A.; MATAALLANA, E. Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v.46, p.167-175, 2015.

PETRIKOV, K.; DELEGAN, Y.; SURIN, A.; PONAMOREVA, O.; PUNTUS, I.; FILONOV, A.; BONORIN, A. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: formation and structure. **Process Biochemistry**, v.48, p.931–935, 2013.

QASI, M.A.; KANWAL, T.; JADOON, M.; AHMED, S.; FATIMA, N. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. **Biotechnology Progress**, v.30, p.1065-1075, 2014.

RAMOS, J.L.; UDAONDO, Z.; FERNÁNDEZ, B.; MOLINA, C.; DADDAOUA, A.; SEGURA, A.; DUQUE, E. First- and second-generation biochemicals from sugars: biosynthesis of itaconic acid. **Microbial Biotechnology**, v.9, p.8-10, 2016.

RANE, A.N.; BAIKAR, V.V.; KUMAR, V.R.; DEOPURKAR, R.L. Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v.8, artigo 492, 2017.

RAU, U.; NGUYEN, L.A.; ROEPER, H.; KOCH, H.; LANG, S. Downstream processing of mannosylerythritol lipids produced by *Pseudozyma aphidis*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.107, p.373-380, 2005b.

RAU, U.; NGUYEN, L.A.; SCHULZ, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; ROEPER, H.; KOCH, H.; LANG, S. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.66, p.551-559, 2005a.

RATHORE, A.S.; BHUSHAN, N.; HADPE, S. Chemometrics applications in biotech processes: A review. **Biotechnology Progress**, v.27, p.307-315, 2011.

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

ROBERT, T.; FRIEBEL, S. Itaconic acid- a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. **Green Chemistry**, v.18, p.2922-2934, 2016.

RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.; VAN DER MEI, H.C. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. **Process Biochemistry**, v.41, p.1-10, 2006.

ROELANTS, S.L.K.W.; CIESIELSKA, K.; DE MAESENEIRE, S.L.; EVERAERT, B.; DENON, Q.; MOENS, H.; VANLERBERGHE, B.; VAN BOGAERT, I.N.A.; VAN DER MEEREN, P.; DE VREESE, B.; SOETAERT, W. Towards the industrialization of new biosurfactants: biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmerella bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.11, p.550–559, 2016.

ROONEY, A.P.; PRICE, N.P.J.; RAY, K.J.; KUO, T.M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. **FEMS Microbiology Letters**, v.295, p.82-87, 2009.

RYLL, R.; KUMAZAWA, Y.; YANO, I. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids—a review. **Microbiology and Immunology**, v.45, p.801–811, 2001.

SAHA, B.C. Emerging biotechnologies for production of itaconic acid and its applications as a platform chemical. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.44, p.303-315, 2017.

SAJNA, K.V.; SUKUMARAN, R.K.; JAYAMURTHY, H.; REDDY, K.K.; KANJILAL, S.; PRASAD, R.B.N.; PANDEY, A. Studies on biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. **Biochemical Engineering Journal**, v.78, p.85-92, 2013.

SANTOS, D.K.F.; BRANDÃO, Y.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, p.48-57, 2014.

SANTOS, D.K.F.; RESENDE, A.H.M.; ALMEIDA, D.G.; DA SILVA, R.C.F.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; BANAT, I.M.; SARUBBO, L.A. *Candida lipolytica* UCP0988

biosurfactant: Potential as a bioremediation agente and in formulating a comercial related product. **Frontiers in Microbiology**, v.8, artigo 767, 2017.

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**, v.17, 401, p.1-31, 2016.

SCHULZ, A.; WILLEMSSEN, Y.; SCHIMIEDEL, P.; KROPF, C.; BODE, N.; HELLMUTH, H. (2016) **Removal of antiperspirant soilings**. Alemanha, DE102014225184.

SHAH, V.; JURJEVIC, M.; BADIA, D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. **Biotechnology Progress**, v. 23, p.512–515, 2007.

SHAO, Z. Trehalolipids. Em: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (ed) **Biosurfactants, microbiology monographs** 20. Springer-Verlag, Berlin, p. 121–149, 2011.

SHIN, J.D.; LEE, J.; KIM, Y.B.; HAN, I.S.; KIM, E.K. Production and characterization of methyl ester sophorolipids with 22-carbon-fatty acids. **Bioresource Technology**, v.101, p.3170–3174, 2010.

SHIN, J.D.; LEE, J.; KIM, Y.B.; HAN, I.S.; KIM, E.K. Production and characterization of methyl ester sophorolipids with 22-carbon-fatty acids. **Bioresource Technology**, v.101, p.3170–3174, 2010.

SHINOZAKI, Y.; KIKKAWA, Y.; SATO, S.; FUKUOKA, T.; WATANABE, T.; YOSHIDA, S.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; KITAMOTO, H.K. Enzymatic degradation of polyester films by a cutinase-like enzyme from *Pseudozyma antarctica*: surface plasmon resonance and atomic force microscopy study. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.8591–8598, 2013.

SMIRNOU, D.; KRČMÁŘ, M.; KULHÁNEK, J.; HERMANNOVÁ, M.; BOBKOVÁ, L.; FRANKE, L.; PEPELIAEV, S.; VELEBNÝ, V. Characterization of hyaluronan-degrading enzymes from yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.177, p.700–712, 2015.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; ZERKOWSKI, J.A.; FOGLIA, T.A. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology Letters**, v.29, p.1341–1347, 2007.

SPOHNER, S.C.; SCHAUM, V.; QUITMANN, H.; CZERMAK, P. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.222, p.104-116, 2016.

SURAIYA, S.; SIDDIQUE, M.P.; LEE, J.M.; KIM, E.Y.; KIM, J.M.; KONG, I.S. Enhancement and characterization of natural pigments produced by *Monascus* spp. Using *Saccharina japonica* as fermentation substrate. **Journal of Applied Phycology**, p.1-14, 2017.

SYLDATK, C.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V.; WITTE, L. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on *n*-alkanes. **Zeitschrift fur Naturforschung. Section C, Biosciences**, v.40, p.51-60, 1985.

TAKAHASHI, M.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, show antioxidant and protective effects against H₂O₂-induced oxidative stress in cultured human skin fibroblasts. **Journal of Oleo Science**, v.61, p.457-464, 2012.

TAKAKUWA, N.; NAGAHAMA, S.; MATSUMURA, H.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M. Efficient conversion of crude glycerol into triacylglycerol by the yeast *Pseudozyma* sp. TYC-2187 for biodiesel production. **Journal of Oleo Science**, v.62, p.605-612, 2013.

TULEVA, B.; CHRISTOVA, N.; COHEN, R.; ANTONOVA, D.; TODOROV, T.; STOINEVA, I. Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from soil strain *Micrococcus luteus* BN56. **Process Biochemistry**, v.44, p.135–141, 2009.

VAN BOGAERT, I.N.A.; ZHANG, J.X.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v.46, p.821–833, 2011.

VAN HAESENDONCK, I.P.H.; VANZEVEEREN, E.C.A. Rhamnolipids in bakery products. US Patent N° WO 2004/040984.

VAN RIJSWIJCK, I.M.; DIJKSTERHUIS, J.; WOLKERS-ROOIJACKERS, J.C.; ABEE, T.; SMID, E.J. Nutrient limitation leads to penetrative growth into agar and affects aroma formation in *Pichia fabianii*, *P. kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.32, p.89-101, 2015.

VISHNYAKOV, A.; LEE, M.T.; NEIMARK, A. Prediction of the critical micelle concentration of nonionic surfactants by dissipative particle dynamics simulations. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v.4, p.797-802, 2013.

WADEKAR, S.D.; KALE, S.B.; LALI, A.M.; BHOWMICK, D.N.; PRATAP, A.P. Jatropha oil and karanja oil as carbon sources for production of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.114, p.823–832, 2012.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. Em: SEN, R. (Ed) **Biosurfactants**, Springer series: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Science + Business Media. New York, USA, .672, p. 1–13, 2010.

WANG, Q.M.; BEGEROW, D.; GROENEWALD, M.; LIU, X.Z.; THEELEN, B.; BAI, F.Y.; BOEKHOUT, T. Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the *Ustilaginomycotina*. **Studies in Mycology**, v.81, p.55–83, 2015.

WANG, Q.M.; THEELEN, B.; GROENEWALD, M.; BAI, F.Y.; BOEKHOUT, T. *Moniliellomycetes* and *Malasseziomycetes*, two new classes in *Ustilagomycotina*. **Persoonia**, v.33, p.41–47, 2014.

WATANABE, T.; SHINOZAKI, Y.; SUZUKI, K.; KOITABASHI, M.; YOSHIDA, S.; SAMESHIMA-YAMASHITA, Y.; KUZE KITAMOTO, H. Production of a biodegradable plastic-degrading enzyme from cheese whey by the phyllosphere yeast *Pseudozyma antarctica* GB-4(1)W. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.118, p.183–187, 2014.

WEI, Y.H.; LAI, C.C.; CHANG, J.S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Process Biochemistry**, v.42, p.40-45, 2007.

WELSH, K.J.; HUNTER, R.L.; ACTOR, J.K. Trehalose 6,6'-dimycolate—a coat to regulate tuberculosis immunopathogenesis. **Tuberculosis**, v.93, S3–S9, 2013.

WILLIAMS, J.J. B.1.II- Formulation of Carpet Cleaners. **Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces**, v.1, p. 103-123, 2007.

WITTGENS, A.; TISO, T.; ARNDT, T.T.; WENK, P.; HEMMERICH, J.; MÜLLER, C.; WICHMANN, R.; KÜPPER, B.; ZWICK, M.; WILHELM, S.; HAUSMANN, R.; SYLDATK,

C.; ROSENAU, F.; BLANK, L.M. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. **Microbial Cell Factories**, v.10:80, p.1-17, 2011.

WORAKITKANCHANAKUL, W.; IMURA, T.; FUKUOKA, T.; MORITA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S.; MINAMIKAWA, H.; KITAMOTO, D. Phase behavior of ternary mannosylerythritol lipid/water/oil systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.68, p.207-212, 2009.

WU, W.H.; HUNG, W.C.; LO, K.Y.; CHEN, Y.H.; WAN, H.P.; CHENG, K.C. Bioethanol production from taro waste using thermos-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* K21. **Bioresource Technology**, v.201, p.27-32, 2016.

XIA, J.; WISHART, D.S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v.55, p.1-14, 2016.

YAKIMOV, M.M.; GIULIANO, L.; BRUNI, V.; SCARFI, S.; GOLYSHIN, P.N. Characterization of Antarctic hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing bioemulsifiers. **New Microbiology**, v.22, p.249–256, 1999.

YAMAMOTO, S.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; YANAGIDANI, S.; SOGAHE, A.; KITAMOTO, D.; KITAGAWA, M. The moisturizing effects of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, on human skin. **Journal of Oleo Science**, v.61, p.407-412, 2012.

YAN, X.; SIMS, J.; WANG, B.; HAMANN, M.T. Marine actinomycete *Streptomyces* sp. ISP2-49E, a new source of rhamnolipid. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.55, p.292-295, 2014.

YANG, X.; ZHU, L.; XUE, C.; CHEN, Y.; QU, L.; LU, W. Recovery of purified lactonic sophorolipids by spontaneous crystallization during the fermentation of sugarcane molasses with *Candida albicans* O-13-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v.51, p.248–353, 2012.

YEH, M.S.; MEI, Y.H.; CHANG, J.S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, v.21, p.1329-1334, 2005.

YOU, S.; WANG, X.; QI, W.; SU, R.; HE, Z. Optimisation of culture conditions and development of a novel fed-batch strategy for high production of β -galactosidase by

Kluyveromyces lactis. **International Journal of Food Science and Technology**, v.52, p.1887-1893, 2017.

YU, M.; LIU, Z.; ZENG, G.; ZHONG, H.; LIU, Y.; JIANG, Y.; LI, M.; HE, Y. Characteristics of mannosylerythritol lipids and their environmental potential. **Carbohydrate Research**, v.407, p.63-72, 2015.

ZAFEIRI, I.; HORRIDGE, C.; TRIPODI, E.; SPYROPOULOS, F. Emulsions co-stabilised by edible pickering particles and surfactants: The effect of HLB value. **Colloid and Interface Science Communications**, v.17, p.5-9, 2017.

ZAMBANINI, T.; BUESCHER, J.M.; MEURER, G.; WIERCKX, N.; BLANK, L.M. Draft genome sequence of *Ustilago trichophora* RK089, a promising malic acid producer. **Genome Announcements**, 4:e00749-e00716, 2016 (a).

ZAMBANINI, T.; KLEINEBERG, W.; SARIKAYA, E.; BUESCHER, J.M.; MEURER, G.; WIERCKX, N.; BLANK, L.M. Enhanced malic acid production from glycerol with high-cell density *Ustilago trichophora* TZ1 cultivations. **Biotechnology for Biofuels**, v.9,1, 2016 (b).

ZAMBANINI, T.; TEHRANI, H.H.; GEISER, E.; MERKER, D.; SCHLEESE, S.; KRABBE, J.; BUESCHER, J.M.; MEURER, G.; WIERCKX, N.; BLANK, L.M. (2017) Efficient itaconic acid production from glycerol with *Ustilago vetiveriae* TZ1. **Biotechnology for Biofuels**, v.10, p.131, 2017.

ZANNINI, E.; WATERS, D.M.; COFFEY, A.; ARENDT, E.K. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p.1121-1135, 2016.

ZEIKUS, J.G.; JAIN, M.K.; ELANKOVAN, P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.545–552, 1999.

ZHANG, J.; GENG, A.; YAO, C.; LU, Y.; LI, Q. Xylitol production from D-xylitol and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. **Bioresource Technology**, v.105, p.134-141, 2012.

ZHANG, J.; XUE, Q.; GAO, H.; LAI, H.; WANG, P. Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. **Microbial Cell Factories**, v.3, 168, 2016.

ZHENG, Y.; ZHENG, M.; MA, Z.; XIN, B.; GUO, R.; XU, X. 8-Sugar Fatty Acid Esters. **Polar Lipids**, p.215-243, 2015.

8. ANEXOS

8.1 Termo de Transferência de Material para aquisição das linhagens de leveduras



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Collection of Microorganisms, DNA and Cells of UFMG
Bloco P3, sala9
Av. Antônio Carlos, 6627
31270-901, Belo Horizonte –MG- Brazil

Fone: 55 (31) 3409-2751
Fax: 55 (31) 3409-2730

TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL REFERENTE À REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO PARA FINS DE PESQUISA CIENTÍFICA SEM POTENCIAL COMERCIAL

O Termo de Transferência de Material - TTM foi instituído para controlar as remessas de patrimônio genético existente em condição in situ no território nacional, na plataforma continental e zona econômica exclusiva, e mantidas em condições ex situ, destinadas a instituições de pesquisa nacionais ou estrangeiras, com base nas seguintes premissas:

- o reconhecimento de que o intercâmbio do patrimônio genético realizado entre instituições de pesquisa nas áreas biológicas e afins, sediadas no Brasil e no exterior, é fundamental para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade brasileira;
- a necessidade de garantir o cumprimento do disposto na Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB, em especial, a soberania nacional sobre a biodiversidade, o consentimento prévio fundamentado e a repartição de benefícios, decorrentes do uso do patrimônio genético.

TTM n° 03/ 2017 / UFMG

Instituição remetente

Nome: Coleção de Micro-organismos da UFMG
Sigla: CM-UFMG
Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte, MG.

Dados do Representante Legal

Nome: Carlos Augusto Rosa
Documento de Identificação (tipo, número e órgão emissor):
Cargo: Curador
Ato que delega competência (anexar cópia):

Instituição destinatária

Nome: Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos-DCA-FEA-UNICAMP
Endereço: Av. Monteiro Lobato, 80, cp 6121, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Barão Geraldo, Campinas-Sp Cep 13083-862

Dados do Representante Legal

Nome: Gláucia Maria Pastore
Documento de Identificação (tipo, número e órgão emissor):
Cargo: Pró-Reitora de Pesquisa
Ato que delega competência (anexar cópia):

8.2 Artigos publicados

8.2.1 Artigo 1

Appl Microbiol Biotechnol (2016) 100:10265–10293
DOI 10.1007/s00253-016-7980-z



MINI-REVIEW

Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants

Bruno Nicolau Paulino¹ · Marina Gabriel Pessôa¹ · Mario Cezar Rodrigues Mano¹ · Gustavo Molina² · Iramaia Angélica Neri-Numa¹ · Glaucia Maria Pastore¹

Received: 5 August 2016 / Revised: 20 October 2016 / Accepted: 1 November 2016 / Published online: 14 November 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Biosurfactants are natural compounds with surface activity and emulsifying properties produced by several types of microorganisms and have been considered an interesting alternative to synthetic surfactants. Glycolipids are promising biosurfactants, due to low toxicity, biodegradability, and chemical stability in different conditions and also because they have many biological activities, allowing wide applications in different fields. In this review, we addressed general information about families of glycolipids, rhamnolipids, sophorolipids, mannosylerythritol lipids, and trehalose lipids, describing their chemical and surface characteristics, recent studies using alternative substrates, and new strategies to improve of production, beyond their specificities. We focus in providing recent developments and trends in biotechnological process and medical and industrial applications.

Keywords Surfactants · Biosurfactants · Glycolipids · Rhamnolipids · Sophorolipids · Mannosylerythritol lipids · Trehalose lipids

Introduction

Synthetic surfactants are an important group of chemical compounds widely used in different fields, although many of these

compounds have been associated with environmental and toxicological problems and still considered expensive (Gudiña et al. 2015; Liu et al. 2013; Lechuga et al. 2016). Therefore, in recent years, it has increased the interest in compounds with tensoactive properties, biodegradability, and low toxicity characteristics, such as natural surfactants. These compounds are surface-active agents that can be produced by plants (saponins), animals (pulmonary surfactant), and microorganisms (biosurfactants) (Lang et al. 1989; Luna et al. 2011).

The biosurfactants are a diverse group of amphiphilic compounds produced by bacteria, fungi, and yeast strains that have the ability to reduce surface and interfacial tension in liquids or biphasic systems (e.g., liquid/gas, liquid/liquid, and solid/liquid) and may display emulsifying activity and interesting biological properties (Cameotra and Makkar 2010; Banat et al. 2014a). In addition, biosurfactants have clear advantages when compared to synthetic surfactants such as lower critical micelle concentration (CMC), lower toxicity, higher biodegradability, thermostability, and tolerance in several pH and ionic strength conditions (Varvaresou and Iakovou 2015; Soberón-Chávez and Maier 2011). Other advantage of the biological surfactant production is the possibility of using low-cost substrates. Most of reported process have been using agro-industrial wastes in the culture medium, in order to reduce costs and make the process more attractive in large scale (Nitschke and Pastore 2006; Barros et al. 2008; Andrade et al. 2016).

Biosurfactants can be classified according to their molecular weight in two groups: low and high molecular weight biosurfactants (Gudiña et al. 2013). The low molecular weight biosurfactants are the most studied group and comprises two important subgroups: glycolipids and lipopeptides. These can be subdivided into several biosurfactant families such as rhamnolipids, sophorolipids, trehalolipids, mannosylerythritol lipids (glycolipids), surfactins, fengycins, and iturins (lipopeptides), among others. In addition, each family is

✉ Bruno Nicolau Paulino
b.n.17@hotmail.com

¹ Laboratory of Bioflavors and Bioactive Compounds, Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz” Barão Geraldo – Campinas, São Paulo CEP 13083-862, Brazil

² Institute of Science and Technology, Food Engineering, UFVJM, Diamantina, Minas Gerais, Brazil

8.2.2 Licença para uso do conteúdo do Artigo 1 na tese de doutorado

SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 05, 2018

This Agreement between UNICAMP -- BRUNO PAULINO ("You") and Springer ("Springer") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer and Copyright Clearance Center.

License Number	4237851355368
License date	Nov 28, 2017
Licensed Content Publisher	Springer
Licensed Content Publication	Applied Microbiology and Biotechnology
Licensed Content Title	Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants
Licensed Content Author	Bruno Nicolau Paulino, Marina Gabriel Pessôa, Mario Cezar Rodrigues Mano et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2016
Licensed Content Volume	100
Licensed Content Issue	24
Type of Use	Book/Textbook
Requestor type	Agency acting on behalf of other industry
Portion	Full text
Format	Print and Electronic
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	DOCTORAL THESIS IN PORTUGUESE
Print run	10
Author of this Springer article	Yes and you are the sole author of the new work
Order reference number	THESIS
Title of new book	BIOTECNOLOGICAL POTENTIAL OF YEASTS FROM USTILAGINACEAE FAMILY FOR MANNOSYLERYTHRITOL LIPIDS PRODUCTION
Publisher of new book	UNICAMP
Author of new book	BRUNO NICOLAU PAULINO
Expected publication date of new book	Feb 2018
Estimated size of new book (pages)	250
Requestor Location	UNICAMP Av. Monteiro Lobato, 80

	University of Campinas Barão Geraldo CAMPINAS, SP 13083-862 Brazil Attn: UNICAMP
Billing Type	Invoice
Billing Address	UNICAMP Av. Monteiro Lobato, 80 University of Campinas Barão Geraldo CAMPINAS, Brazil 13083-862 Attn: UNICAMP
Total	0.00 USD

8.2.3 Artigo 2

Appl Microbiol Biotechnol (2017) 101:7789–7809
DOI 10.1007/s00253-017-8516-x



MINI-REVIEW

Biotechnological production of value-added compounds by ustilaginomycetous yeasts

Bruno N. Paulino¹ · Marina G. Pessôa¹ · Gustavo Molina² · Antônio A. Kaupert Neto³ · Juliana V. C. Oliveira³ · Mario C. R. Mano¹ · Glaucia M. Pastore¹

Received: 4 July 2017 / Revised: 3 September 2017 / Accepted: 4 September 2017 / Published online: 18 September 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract The use of yeasts in bioprocesses can be considered one of the most relevant strategies in industrial biotechnology, and their potential is recognized due to the ability of these microorganisms for production of diverse value-added compounds. Yeasts from *Ustilaginaceae* family have been highlighted in the last years as a promising source of industrial interesting compounds, including enzymes, sugars, lipids, organic acids, and biosurfactants. These compounds may exhibit various applications in pharmaceutical, cosmetic, food, medical, and environmental fields, increasing the scientific attention in the study of ustilaginomycetous for biotechnological purposes. In this mini-review, we provide a comprehensive overview about the biotechnological use of yeasts from *Ustilaginaceae* family to produce value-added compounds, focusing in recent trends, characteristics of processes currently developed, new opportunities, and potential applications.

Keywords *Ustilaginaceae* · *Pseudozyma* · *Ustilago* · Enzymes · Itaconic acid · Mannosylerythritol lipids · Squalene

Introduction

Yeasts can be considered the major producers of natural compounds through fermentative processes, and the importance of basidiomycetous and ascomycetous yeasts in industrial production of value-added metabolites has been extensively revised in last years (Johnson 2013a; Johnson 2013b; Azhar et al. 2017). The historical and modern role of yeasts in production of food ingredients (amino acids, pigments, enzymes, flavors), beverages (beer, wine, sake, cachaça), heterologous proteins (hormones, vaccines), and other compounds showed that these microorganisms are economically suitable and offer wide range of potential applications for industrial exploration (Mannazzu et al. 2015; Demain and Martens 2016; Basso et al. 2016; Portugal et al. 2017; Johnson 2013b).

Ustilaginaceae is a family belonging to *Ustilaginomycotina* subphylum (*Basidiomycota*, fungi) that comprises several species of smut fungi and may exhibit various morphological characteristics. These microorganisms are mostly dimorphic and present a yeast stage during part of their life cycle, which can comprise unicellular budding cells as well as cultures that might produce hyphae (Begerow et al. 2014; Wang et al. 2015).

Nowadays, researchers have been proposing a taxonomic review of this group based on phylogenetic and multiple gene sequence analysis, resulting on reclassification of some species and description of new genus and classes (Wang et al. 2014; Wang et al. 2015). For example, the strain formerly described as *Pseudozyma brasiliensis* and known by endoxylanase production characteristics was renamed as *Kalmonozyma brasiliensis* (Oliveira et al. 2014; Wang et al. 2015). Similarly, the reclassification of the biosurfactant producer *Pseudozyma churashimaensis* to *Dirkmeia churashimaensis* was recently suggested (Morita et al. 2011a; Wang et al. 2015). In the case of some species with

✉ Bruno N. Paulino
b.n.17@hotmail.com

¹ Laboratory of Bioflavors and Bioactive Compounds, Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz” Barão Geraldo—Campinas, São Paulo CEP 13083-862, Brazil

² Institute of Science and Technology, Food Engineering, UFVJM, Diamantina, Minas Gerais, Brazil

³ Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, São Paulo 13083-100, Brazil

8.2.2 Licença para uso do conteúdo do Artigo 2 na tese de doutorado

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 05, 2018

This Agreement between UNICAMP -- BRUNO PAULINO ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4270221248167
License date	Jan 15, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Applied Microbiology and Biotechnology
Licensed Content Title	Biotechnological production of value-added compounds by ustilaginomycetous yeasts
Licensed Content Author	Bruno N. Paulino, Marina G. Pessôa, Gustavo Molina et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2017
Licensed Content Volume	101
Licensed Content Issue	21
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	yes, including original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	yes
Title	BIOTECNOLOGICAL POTENTIAL OF YEASTS FROM USTILAGINACEAE FAMILY FOR MANNOSYLERYTHRITOL LIPIDS PRODUCTION
Instructor name	n/a
Institution name	Universidade Estadual de Campinas
Expected presentation date	Feb 2018
Portions	Some parts of the text and figures 1.
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	UNICAMP Av. Monteiro Lobato, 80 University of Campinas Barão Geraldo CAMPINAS, SP 13083-862

	Brazil
	Attn: UNICAMP
Billing Type	Invoice
Billing Address	UNICAMP
	Av. Monteiro Lobato, 80
	University of Campinas
	Barão Geraldo
	CAMPINAS, Brazil 13083-862
	Attn: UNICAMP
Total	0.00 USD