UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PAULO RICARDO FRANCO MARCELINO

**Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em
hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**

LORENA - SP

2016

PAULO RICARDO FRANCO MARCELINO

**Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em
hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências pelo programa de Pós-
graduação em Biotecnologia Industrial na área de
concentração de Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Versão reimpressa e corrigida

LORENA - SP
SETEMBRO, 2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marcelino, Paulo Ricardo Franco

Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar / Paulo Ricardo Franco Marcelino; orientador Silvio Silvério da Silva - ed. reimp., corr. - Lorena, 2016.
155 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016
Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Hidrolisado hemicelulósico. 3. Leveduras. 4. Biossurfactantes. I. Título. II. da Silva, Silvio Silvério, orient.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais,

Meu maior tesouro!

Como dizia o poeta,

“Pai e mãe, ouro de mina...”

O mínimo que posso fazer é dedicar tudo o que conquistei até agora a vocês!

Mais uma vez, obrigado por todos os ensinamentos e o amor dedicado!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade do meu viver, resiliente a todos os desafios que por Ele foram impostos.

Aos meus pais, exemplos de pessoas, profissionais e por todo o amor dedicado nunca me deixando desacreditar. Amo vocês!

Aos meus familiares, em especial a Tia Fátima, Luis Eduardo e Jéssica, por todo o carinho que sempre demonstraram.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, por toda a confiança depositada, pelo espírito científico e o apoio incondicional para o desenvolvimento deste trabalho. Mais uma vez, muito obrigado por servir como exemplo profissional para todos que convivem contigo!

Aos Prof. Dr. Júlio César dos Santos, Dr. Marcus Bruno Soares Forte, Dra. Maria Inês Rezende, Prof. Dra. Talita Martins Lacerda e Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, por sempre estarem ao meu lado, me auxiliando e aconselhando. Vocês além de bons profissionais, mostraram ser excelentes pessoas. Vocês são provas vivas de que Deus envia pessoas especiais para nos ajudar nas tarefas mais árduas da vida.

Também quero agradecer a um importante colaborador deste trabalho, Guilherme Fernando Dias Peres, o aluno de iniciação científica iluminado! Muito obrigado por tudo, pois, sem sua ajuda, certamente tudo teria sido mais difícil!

Agradeço também aos meus amigos de laboratório e departamento (Michele, Flaviana, Henrique, Carol, Dayelle, Mayara, Dani Verde, Leonardo, Camila, Rebeca, Olívia, Lucas, Matheus Rosseto, Gilda, Adriana, Paulinho, Nicamor, Priscila Arruda, Felipe Antunes, Zé Cobrinha, Isnaldi, Zé Moreira e Lucinha) por toda a ajuda e os momentos de risos e descontração durante tantos dias difíceis. Deixo um abraço em especial a Walkíria e a Nadir!

Quero deixar meu muito obrigado também, aos colaboradores da UNESP de Rio Claro (Prof. Dr. Jonas Contiero, Prof. Dr. Cláudio Von Zuben e Msc. Vinicius da Silva), a Teresa Figueiredo da BASF, ao Prof. Dr. Paulo Suzuki (DEMAR), ao Jorge Rosa (DEMAR) e a Prof. Dra. Jayne Carlos de Souza Barboza (DEQUI) por todo o auxílio no decorrer do trabalho.

Também quero agradecer a Sabrina, Leyanes, Rafael, Bruna Tavares, Ruly, Mariete (Betty), Carlos, Dalva, Sueli e Samira, por sempre estarem ao meu lado, incentivando e acreditando! Verdadeiros amigos!

A CAPES pela bolsa de doutorado e a FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial e todos os docentes que o e a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para o meu crescimento pessoal e científico.

EPIGRAFE

Poeminha do Contra

*“Todos estes que aí estão
Atravancando o meu caminho,
Eles passarão.
Eu passarinho!”*

(Mário Quintana, 1978)

RESUMO

MARCELINO, P. R. F. **Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2016. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

Os biossurfactantes são compostos de origem vegetal e microbiana, com propriedades tensoativas e/ou emulsificantes, que devido ao seu apelo ambiental em relação aos surfactantes sintéticos vêm se destacando nos últimos anos. São considerados produtos ecologicamente corretos, por serem biodegradáveis e exibirem reduzida/nula toxicidade. Além disso, a possibilidade de biossíntese utilizando processos fermentativos, empregando subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes é outra vantagem destes bioprodutos. O presente trabalho avaliou a produção de biossurfactantes por leveduras utilizando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Durante o estudo utilizou-se processos fermentativos em frascos na biossíntese dos biossurfactantes e métodos cromatográficos, espectrofotométricos, espectrométricos na caracterização dos hidrolisados e dos biossurfactantes. Observou-se que as 30 leveduras estudadas produziram biossurfactantes glicolipídicos em meio de cultivo suplementado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando entre 14 e 99 % da xilose e exibiram produtividades variando de 0,0035 a 0,1667 g/L.h. Os glicolipídeos produzidos pelas leveduras SSS1, SSS5, SSS6, SSS13, SSS18, SSS27 e SSS28 apresentaram potencial larvicida quando testados frente a *Aedes aegypti*, eliminando entre 20 – 100 % das larvas. Dentre as leveduras estudadas, a *Trichosporon mucoides* (SSS11) mostrou-se como melhor produtora de biossurfactante glicolipídico (produção de $11,334 \pm 2,169$ g/L – produtividade de 0,1667 g/L.h), produzindo um soforolipídeo com propriedades emulsificantes destacadas em diversas condições ambientais, onde os parâmetros temperatura, salinidade e pH foram variados. Após a otimização da produção tendo como base o meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico, o biossurfactante produzido pela levedura apresentou um índice de emulsificação variando entre 86 – 90 % e uma tensão superficial de 34 mN/m, sendo considerado um promissor bioproduto para aplicação industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Bagaço de cana-de-açúcar; Hidrolisado hemicelulósico; Leveduras; Biossurfactantes

ABSTRACT

MARCELINO, P. R. F. **Second-generation biosurfactants production by yeasts in hemicellulosic sugar cane bagasse hidrolysate**. 2016. 155 p. Thesis (Doctoral of Science) –Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

Biosurfactants are plant and microbial metabolites with surface-active properties and / or emulsifiers, which due to environmental concerns about synthetic surfactants, have been highlighted in recent years. This intrinsic biodegradability and non-toxicity of biosurfactants are responsible for their increased importance when compared to synthetic analogues. More than that, additionally the possibility of using alternative substrates for its synthesis, like biodegradable agroindustrial subproducts and the use of a bioprocess, reduce their the final cost of the production. Considering this, the present research evaluated biosurfactants production by yeasts using sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate as carbon source, suggesting these compounds are potential alternative products for lignocellulosic biorefineries. The 30 yeasts studied produced glycolipid biosurfactants in supplemented sugar cane bagasse hydrolysate growth media, with 14 - 99 % of xylose and 0,0035 –0,1667 g/L.h productivity. The glycolipids produced by yeasts SSS1, SSS5, SSS6, SSS13, SSS18, SSS27 and SSS28 presented high larvicidas properties when tested against *Aedes aegypti*, killing 20 – 100 % of larvaes. Among the analyzed yeasts, *Trichosporon mucoides* (SSS11) was the best glycolipid biosurfactant product (11,334 $\pm$ 2,169 g/L – productivity of 0,1667 g/L.h), allowing the isolation of a sophorolipid with emulsifier properties, tested in many physico-chemical conditions like variation of temperature, salt concentrations and pH. After nutritional otimization using the supplemented hemicellulosic hydrolysate media growth, the biosurfactant produced by *Trichosporon mucoides* presented emulsification levels from 86 – 90 % and a superficial tension of 34 mN/m, being considered an important bioproduct for industrial application.

KEYWORDS: Sugar cane bagasse; Hemicellulosic hydrolysate; Yeasts; Biosurfactants

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do modelo “cabeça-cauda” do tensoativo dodecilbenzeno sulfonato de sódio (SDS)	25
Figura 2 - Representação das forças intermoleculares que agem na camada superficial da água sendo responsáveis pelo fenômeno de tensão superficial	27
Figura 3 - (A) Processo de micelização; (B) Representação gráfica de algumas propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante (a área hachurada corresponde à CMC)	27
Figura 4 - Micrografia da emulsão preparada com a mistura dos óleos de urucum, café e melaleuca e a mistura dos tensoativos <i>Cetereath 5</i> e <i>Stereath 2</i> , 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente (25 ± 2 °C)	28
Figura 5 - Evolução do número de publicações sobre biossurfactantes nos últimos vinte anos	34
Figura 6 - Estrutura química de um soforolípídeo quaternário de amônio obtido por modificação estrutural de uma soforolactona produzido por <i>Starmerella bombicola</i>	37
Figura 7 - Micrografias eletrônicas de varredura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivadas em meios de cultivo suplementado com (A) 2 % de glicose e (B) 2 % de n-hexadecano	40
Figura 8 - Micrografias eletrônicas de transmissão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivadas em meios de cultivo suplementado com (A, B, C, D e E) 2 % do hidrocarboneto n-hexadecano e (F) 2 % de glicose	41
Figura 9 - Ação dos compostos biossurfactantes nas membranas celulares e seu efeito antimicrobiano	42
Figura 10 - Estrutura da biomassa lignocelulósica	46
Figura 11 - Esquema simplificado das reações que ocorrem durante a hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica	52
Figura 12 - Representação esquemática do mecanismo de inibição de ácidos fracos, derivados furânicos e compostos fenólicos em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Figura 13 - Participação dos biossurfactantes nos principais segmentos industriais em que são aplicados no mercado mundial	57
Figura 14 - Esquema simplificado da Gliconeogênese – percurso central da síntese de carboidratos a partir de metabólitos intermediários do catabolismo de carboidratos e lipídeos	61

Figura 15 - Esquema simplificado da lipogênese em células eucarióticas – síntese de ácidos graxos a partir de metabólitos intermediários do catabolismo de carboidratos e lipídeos	62
Figura 16 - Esquema simplificado da integração metabólica mostrando o metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos como substratos	63
Figura 17 - Fluxograma das etapas envolvidas no presente trabalho	66
Figura 18 - Micrografias ópticas das emulsões obtidas entre o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD livre de células com querosene - magnificação de 400X – (A) região com menor compactação e (B) região com maior compactação	88
Figura 19 - Levedura SSS8 com pigmentação rosada indicando a produção de biopigmentos ao ser cultivada em meios com hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.	90
Figura 20 - Micrografias ópticas dos biossurfactantes nas formas cristalizadas produzidos pelas leveduras (A) SSS15, (B) SSS19, (C) SSS20 e (D) SSS29 em meio de cultivo HD. Os cristais analisados apresentam uma magnificação de 1000X	91
Figura 21 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos biossurfactantes nas formas cristalizadas produzidos pelas leveduras (A) SSS15, (B) SSS19, (C) SSS20 e (D) SSS28 em meio HD	93
Figura 22 - Difrátogramas dos biossurfactantes nas formas cristalizadas produzidos pelas leveduras (A) SSS15, (B) SSS19, (C) SSS20 e (D) SSS28 em meio HD	95
Figura 23 - Número de larvas de <i>A. aegypti</i> vivas em até 96 horas de exposição aos biossurfactantes. A notação Biossurfactante 1, 5, 6, 13, 18, 27 e 28 refere-se aos compostos produzidos respectivamente pelas leveduras SSS1, SSS5, SSS6, SSS13, SSS18, SSS27 e SSS28.....	99
Figura 24 - Estimativa da CL ₅₀ do biossurfactante produzido pela levedura SSS28 em meio de cultivo com hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono em ensaios com larvas de <i>A. aegypti</i>	100
Figura 25 - Ação dos biossurfactantes produzidos por leveduras em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar em larvas e pupas de <i>A. aegypti</i> . (A) Experimento sem a aplicação do biossurfactante e (B) Experimento 24 horas após a aplicação do biossurfactante	101
Figura 26 - Micrografias das larvas de <i>A. aegypti</i> (A) sem a aplicação de biossurfactante – magnificação de 400X, (B) 12 horas após a aplicação do biossurfactante produzido pela	

levedura SSS28 na concentração de 800 mg/L - magnificação de 400X e (C) 12 horas após a aplicação do biossurfactante produzido pela levedura SSS28 na concentração de 800 mg/L – magnificação de 1000X.....	102
Figura 27 - Teste enzimático para a detecção da produção de xilanases e celulasas pela levedura SSS11. Halos de degradação da hemicelulose (A) após 7 dias e (B) 14 dias de cultivo em meio suplementado com xilana. Halos de degradação da celulose (C) após 7 dias e (D) 14 dias de cultivo em meio suplementado com carboximetilcelulose	104
Figura 28 - Cinética da produção de biossurfactante glicolipídico pela levedura SSS11 em meio HD e avaliação das propriedades emulsificantes e tensoativas durante a fermentação.....	106
Figura 29 - Perfil das emulsões formadas entre o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em diferentes compostos hidrofóbicos. (A) Índice de Emulsificação (E.I. ₂₄ - %) e (B) Atividade Emulsificante (A.E. – U.E./mL)	108
Figura 30 - Microscopia óptica das emulsões formadas entre o biossurfactante e (A) óleo de soja, (B) querosene e (C) óleo de motor automotivo – magnitude de 400X	109
Figura 31 - Perfil das emulsões formadas entre o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 e querosene em diferentes (A) Temperaturas (°C), (B) Concentrações de NaCl (%) e (C) pH.....	111
Figura 32 - Extrato bruto do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD. (A) extrato bruto durante a rotaevaporação do solvente e (B) extrato bruto após a evaporação do solvente	114
Figura 33 - Espectros de infravermelho do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD.....	114
Figura 34 - Micrografias eletrônicas de varredura da casca de arroz encontrada no farelo após tratamento térmico para a obtenção de extrato de farelo de arroz. A casca de arroz observada em (A) apresenta uma magnificação de 100X e em (B) uma magnitude de 206X.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais aplicações industriais dos surfactantes sintéticos	29
Tabela 2 - Tipos de biossurfactantes e seus principais representantes.....	35
Tabela 3 - Principais propriedades e aplicações industriais dos biossurfactantes	38
Tabela 4 - Composição química de biomassas lignocelulósicas.....	47
Tabela 5 - Principais produtos obtidos por microrganismos cultivados em bagaço de cana-de-açúcar e seus hidrolisados por meio de fermentações em estado sólido ou submersas ..	48
Tabela 6 - Principais tipos de processos de pré-tratamento e técnicas utilizadas	51
Tabela 7 - Principais empresas produtoras de biossurfactantes no mundo e principais aplicações	55
Tabela 8 - Alguns estudos da produção de biossurfactantes por leveduras utilizando resíduos industriais	59
Tabela 9 - Relação de leveduras e códigos utilizados para a identificação	69
Tabela 10 - Delineamento do planejamento fatorial PB do tipo 2^8 com 3 repetições do ponto central para seleção dos fatores nutricionais para a análise da produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 em meio HD	79
Tabela 11 - Delineamento do planejamento DCCR do tipo 2^4 com 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central para a análise da produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 em meio HD	80
Tabela 12 - Composição físico-química dos hidrolisados hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não-destoxificado e destoxificado	82
Tabela 13 - Resultados da seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes nos meios SX, HND e HD baseando-se na avaliação das propriedades emulsificantes e tensoativas ..	85
Tabela 14 - Bandas dos grupamentos químicos presentes nos cristais de biossurfactantes nas produzidos pelas leveduras em meio de cultivo HD	94
Tabela 15 - Pârametros da produção de biossurfactantes glicolipídicos pelas leveduras em meio HD	96
Tabela 16 - Sinais de RMN ^1H e ^{13}C do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD	115
Tabela 17 - Parâmetros físico-químicos e composição química parcial do EFS e EFA obtidos pós-tratamento térmico	117

Tabela 18 - Delineamento do planejamento fatorial PB do tipo 2^8 com 3 repetições do ponto central para seleção dos fatores nutricionais para a análise da produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 em meio HD tendo como respostas I.E. ₂₄ e TS	122
Tabela 19 - Estimativa de efeitos e p-valor dos fatores estudados no planejamento de PB para a seleção dos nutrientes utilizados na produção de biossurfactantes pela levedura SSS11	123
Tabela 20 - Delineamento do planejamento DCCR do tipo 2^4 com 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central para a análise da produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 em meio HD tendo como respostas I.E. ₂₄ e TS	124
Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado em função do I.E. ₂₄ e TS dos biossurfactantes produzidos pela levedura SSS11 em meio HD no planejamento DCCR do tipo 2^4 com 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central	125
Tabela 22 - Estimativa de efeitos dos fatores estudados, erro padrão, t e p-valor para I.E. ₂₄ e TS dos biossurfactantes produzidos pela levedura SSS11 em meio HD no planejamento DCCR do tipo 2^4 com 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central	126
Tabela 23 - Otimização numérica da produção de biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD de acordo com a função <i>Desirability</i>	128

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. Surfactantes.....	25
2.1.1. Conceito, classificação, propriedades gerais e aplicações	25
2.1.2. Histórico: desenvolvimento e uso dos surfactantes sintéticos e a ascensão dos biossurfactantes na sociedade contemporânea	31
2.2. Biossurfactantes: conceito, classificação, propriedades gerais e aplicações	34
2.3. Por que os microrganismos produzem os biossurfactantes?.....	39
2.4. Produção biotecnológica de biossurfactantes utilizando subprodutos agroindustriais como alternativa sustentável	43
2.4.1. Utilização de subprodutos agroindustriais como matéria-prima em bioprocessos	43
2.4.2. A utilização de biomassas vegetais como matéria-prima nos bioprocessos: um olhar especial para os materiais lignocelulósicos.....	46
2.4.3. Mercado e utilização de subprodutos industriais na produção de biossurfactantes...	55
2.5. Mecanismos de biossíntese de biossurfactantes por leveduras.....	60
3. OBJETIVOS.....	65
3.1. Geral:	65
3.2. Específicos:	65
4. MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1. Obtenção e concentração do hidrolisado hemicelulósico	67
4.2. Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico	67
4.3. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar	68
4.4. Microrganismos	69
4.6. Seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes em meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não-destoxificado (HND) e destoxificado (HD) e em meio sintético contendo xilose (SX)	70
4.6.1. Preparo dos meios de cultivo e fermentação.....	70
4.6.2. Teste do colapso da gota (C.G.).....	71
4.6.3. Teste de atividade β -hemolítica (A.H.).....	72
4.6.5. Determinação da estabilidade emulsificante (E.E.)	72
4.6.6. Caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras nos meios SX e HD e quantificação dos biossurfactantes do tipo glicolípídeo.....	73

4.7. Testes para a avaliação do potencial larvicida conta <i>Aedes aegypti</i> de alguns biossurfactantes produzidos pelas leveduras em meio HD	74
4.8. Estudo cinético da produção de biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD ...	75
4.9. Caracterização físico-química e estrutural do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD	76
4.10. Otimização da produção de biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD: um estudo nutricional para a formulação de meios de cultivo.....	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1. Caracterização físico-química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos para a formulação de meio de cultivo na produção de biossurfactantes por leveduras	82
5.2. Seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes: avaliação do potencial emulsificante e tensoativo.....	84
5.3. Caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras em meio SX e HD.....	90
5.4. Quantificação dos biossurfactantes glicolipídicos produzidos pelas leveduras em meio HD.....	96
5.5. Uma potencial aplicação dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras em meio HD com atividade larvicida para o combate de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	98
5.6. Produção de biossurfactante pela levedura SSS11 (<i>T. mucoides</i>): características biotecnológicas da espécie leveduriforme, cinética da produção e caracterização físico-química e estrutural.....	103
5.7. Otimização da produção de biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD: um estudo nutricional para a formulação de meios de cultivo.....	116
5.7.1. Caracterização físico-química dos extratos de farelos de soja e arroz utilizados como fontes de nutrientes na formulação de meios de cultivo para a produção de biossurfactante pela levedura SSS11	116
5.7.2. Otimização da produção de biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD: estudos de suplementação com fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas e indutores na formulação de meios de cultivo na produção de biossurfactante com destacadas propriedades emulsificantes e tensoativas	121
6. CONCLUSÃO	130
7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	131

REFERÊNCIA	132
-------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

Os surfactantes são compostos que apresentam propriedades tensoativas e/ou emulsificantes amplamente aplicados em vários segmentos industriais e devido a isso são de fundamental importância para a sociedade. Entretanto, a maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo, representando riscos ao meio ambiente e aumentando os custos de produção. O contínuo crescimento da preocupação ambiental, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, resultaram na busca por biossurfactantes (surfactantes naturais) como alternativa aos produtos existentes. Diante deste cenário, os biossurfactantes de segunda geração, compostos de origem microbiana obtida via fermentativa, vêm se destacando nos últimos anos, por serem considerados produtos ecologicamente corretos. Esses produtos “verdes” ou sustentáveis são versáteis e apresentam propriedades físico-químicas iguais ou superiores aos surfactantes de origem sintética.

O grande desafio na produção dos biossurfactantes alternativos aos surfactantes sintéticos, é a redução dos custos do processo produtivo. A utilização de subprodutos agrícolas e industriais como matérias-primas nos bioprocessos, tornou-se uma solução interessante para as indústrias. Assim, é possível obter produtos de alto valor agregado, os chamados *bio based products*, a baixos custos produtivos, garantindo lucros e menores impactos ao meio ambiente. O Brasil já utiliza subprodutos agroindustriais, como por exemplo o bagaço de cana-de-açúcar, para a produção biotecnológica de combustíveis, xilitol, enzimas e outros produtos.

As pesquisas nacionais utilizando material lignocelulósico como matéria-prima têm sido direcionadas de forma significativa à produção de etanol de segunda geração, havendo no entanto, a necessidade de diversificação dos produtos obtidos nas biorrefinarias, para a consolidação dessas novas plataformas tecnológicas no cenário nacional. A produção de *bio based products* pode trazer vários benefícios à economia e a sociedade, tais como, a geração de empregos com mão-de-obra altamente qualificada, maiores investimentos em pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I), além da conquista de mercados externos e diminuição de importações.

Frente a tal desafio tecnológico, o Grupo de Microbiologia Aplicada e Biotecnologia (GMBio) e o laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL), com 25 anos de tradição em trabalhos de conversão da biomassa lignocelulósica e Microbiologia Aplicada, tem sido um dos pioneiros no cenário nacional em pesquisas para a produção de *bio based products* a partir, principalmente, da hemicelulose da

biomassa lignocelulósica. Uma de suas linhas de pesquisa, conforme explanado no presente trabalho, é a produção de biossurfactantes por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, propondo-os como alternativas de produtos as biorrefinarias. Os trabalhos encontrados na literatura até o momento, mostraram a produção dos biossurfactantes principalmente em fontes de carbono oleosas ou açúcares hexoses e agentes fermentadores como bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, muitas vezes patogênicas, e sensíveis ao próprio surfactante produzido na fermentação. Sendo assim, objetiva-se nesse estudo, converter a xilose do hidrolisado (principal fonte de carbono dos meios de cultivo) em biossurfactantes, reduzindo os custos da produção, além de utilizar leveduras não-patogênicas, como agentes fermentadores, devido a maior resistência destes microrganismos ao produto gerado.

Desta forma, o caráter inovador do presente trabalho deve-se ao fato de que ainda não há relatos na literatura da produção de biossurfactantes por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, conforme pode ser comprovado pela patente de nº BR 10 2014 031965-4 depositada junto do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

Espera-se que este trabalho, diante do exposto, contribua significativamente com a geração de conhecimentos científicos e tecnológicos na área de biossurfactantes, mostrando a possibilidade de produção destas biomoléculas a partir da biomassa lignocelulósica e a utilização de microrganismos não-patogênicos como agentes fermentadores no processo. Apresentando, de forma geral, esses bioprodutos como uma alternativa viável para as futuras biorrefinarias lignocelulósicas multiprodutos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Surfactantes

2.1.1. Conceito, classificação, propriedades gerais e aplicações

Os surfactantes são substâncias com estruturas anfifílicas cujas extremidades possuem polaridades opostas, sendo comumente representadas pelo modelo “cauda” apolar e “cabeça” polar (Figura 1). Em função dessa natureza dual, essas substâncias tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, sendo responsáveis por fenômenos de adsorção nas interfaces e superfícies de um determinado sistema (HUNTER, 1992). Os grupamentos hidrofóbicos presentes nas estruturas das moléculas surfactantes, responsáveis pela solubilidade em substâncias apolares, como por exemplo, em óleos e hidrocarbonetos, são geralmente formados por cadeias hidrocarbônicas lineares ou ramificadas, podendo conter grupos cíclicos ou aromáticos, não apresentando pólos de concentração de carga eletrostática. Já os grupamentos hidrofílicos são determinantes para a solubilidade dos tensoativos em água, sendo altamente polares, pois apresentam uma concentração de cargas, sejam elas positivas ou negativas, devido à presença de átomos com diferentes eletronegatividades, tais como, oxigênio, nitrogênio, enxofre e fósforo, formando espécies iônicas ou não-iônicas (ATWOOD; FLORENCE, 1985; HUNTER, 1992; DALVIN, 2011).

Figura 1 - Representação do modelo “cabeça-cauda” do tensoativo dodecilbenzeno sulfonato de sódio (SDS)

Fonte: Adaptado de (RINALDI et al., 2000)

De acordo com Borsato e colaboradores (2004), os surfactantes sintéticos podem ser classificados de acordo com os grupamentos polares presentes em sua estrutura, sendo agrupados em aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfóteros, sendo comuns na literatura e nas indústrias. Porém, outros autores, como Daltin (2011), também os classificam levando em consideração seus grupamentos apolares denominando-os de ácidos graxos naturais, parafinas, olefinas, alquilbenzenos, álcoois, alquifenóis, polipropilenoglicóis, fluorocarbonos e silicones. Além dos surfactantes sintéticos, obtidos quimicamente a partir de petróleo e seus derivados, atualmente, pode-se encontrar surfactantes sintetizados por vegetais, sendo estes denominados de naturais, como as saponinas e os ésteres de açúcares, e por microrganismos, os biosurfactantes. Atualmente os surfactantes de origem natural e microbiana vêm se destacando cada vez mais nos meios tecnológicos e industrial, por serem considerados produtos ecologicamente corretos ou produtos “verdes”, não prejudicando o meio ambiente e a possibilidade de obtenção desses compostos utilizando recursos renováveis, reduzindo assim os custos de produção, estando inseridos no contexto de sustentabilidade.

Os surfactantes são fundamentais para a indústria, pois são responsáveis por dois fenômenos de extrema importância nos mais diversos processos: a redução da tensão superficial e o emulsionamento de líquidos.

A tensão superficial é um efeito físico que ocorre na camada superficial de um líquido, conferindo-a uma determinada elasticidade, devido a um desbalanceamento de forças de atração responsáveis pela coesão das moléculas ali situadas. Isto ocorre, pois as moléculas de água localizadas na superfície líquida sofrem atração única e permanentemente pelas forças intermoleculares das moléculas inferiores e laterais, já que não há a presença de moléculas de água acima. Sendo assim, há uma tendência das moléculas da superfície serem “arrastadas” para o seio do líquido. Este fenômeno é rotineiro e pode ser exemplificado quando se observa os insetos caminharem nas superfícies líquidas sem afundar (Figura 2) (ATKINS; JONES, 2010; DALTIM, 2011).

Os surfactantes são capazes de diminuir a tensão superficial do meio aquoso. Isto ocorre, pois, o aumento da concentração dos surfactantes em soluções faz com que estes se organizem em agregados moleculares (que contêm entre 50 e 100 moléculas) denominados micelas, devido a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e da água (Figura 3A). A concentração onde se inicia o processo de formação das micelas, micelização, é denominada concentração micelar crítica (CMC), que é uma propriedade intrínseca e

característica do surfactante a uma dada temperatura e concentração eletrolítica. O processo de formação dos agregados ocorre num intervalo pequeno de concentrações e pode ser detectado pela variação brusca produzida em determinadas propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do surfactante, como apresentado na Figura 3B (MINATTI; ZANETTE, 1996; MANIASSO, 2001; RIZZATI, 2003; RIZZATI; ZANETTE; MELO, 2009).

Figura 2 - Representação das forças intermoleculares que agem na camada superficial da água sendo responsáveis pelo fenômeno de tensão superficial

Fonte: Adaptado de (www.diariodeumquimicodigital.com)

Figura 3 - (A) Processo de micelização; (B) Representação gráfica de algumas propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante (a área hachurada corresponde à CMC)

Fonte: Adaptado de (BENITO et al., 1997); (ROSSI et al., 2006)

As emulsões são sistemas dispersivos que ocorrem quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato. As partículas da fase dispersa ou descontínua se encontram distribuídas no seio da fase dispersante ou contínua (Figura 4). Estes sistemas podem persistir por um período de tempo variável, com duração de segundos ou até anos. Alguns compostos surfactantes são responsáveis pela estabilização entre as fases, retardando a separação entre as duas fases distintas, agindo como emulsionantes (LYSSANT, 1974; DALTIM, 2011). A propriedade emulsificante dos surfactantes, segundo Lindner (2005), está relacionada com os tamanhos da cadeia hidrofóbica e a porção hidrofílica, sendo assim, nem todos os surfactantes apresentam capacidade emulsionante.

Figura 4 - Micrografia da emulsão preparada com a mistura dos óleos de urucum, café e melaleuca e a mistura dos tensoativos *Cetereath 5* e *Stereath 2*, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente (25 ± 2 °C)

Fonte: (MORAIS, 2006)

Devido a essas propriedades os surfactantes são responsáveis por características únicas garantindo diversas aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante (molhabilidade), solubilização e dispersão de fases, proteção anticorrosiva entre outras, como pode ser observado na Tabela 1 (NITSCHKE; PASTORE, 2002; DALTIM, 2011).

Tabela 1 - Principais aplicações industriais dos surfactantes sintéticos

Indústria	Aplicações
Têxtil	<p>Em processos de lavagem removem as ceras naturais que acompanham as fibras de algodão e lubrificantes impregnados durante os processos de fiação e tecelagem;</p> <p>No processo de fiação evitam a quebra dos fios formados, a repulsão eletrostática entre fios sintéticos, atuando como antiestéticos, além serem lubrificantes e reforçadores antes dos processos de alvejamento e tingimento;</p> <p>Na estamparia dispersam os pigmentos e corantes nas tintas, para o ajuste da alta viscosidade e para a penetração das tintas nas fibras dos tecidos;</p> <p>No acabamento são utilizados no processo de amaciamento e nas aplicações de emulsões de resinas ou silicone para aumentar a resistência e o brilho do tecido.</p>
Couros	<p>Na adição de preservantes são utilizados para a remoção de gorduras naturais, facilitando e tornando a inserção de substâncias preservantes mais eficientes;</p> <p>No tingimento e na aplicação de resinas que melhoram a aparência e a resistência do couro.</p>
Petrolífera	<p>Na perfuração de poços de petróleo, os surfactantes agem melhorando as propriedades reológicas da lama de perfuração, uma vez que se utiliza uma emulsão associada a suspensão de argila;</p> <p>Na extração do petróleo, as soluções ácidas, utilizadas no auxílio do processo de percolação do óleo pelas rochas, podem ser emulsionadas em querosene, evitando a corrosão de tubulações e equipamentos, tornando o processo menos drástico;</p> <p>No processo de refino do petróleo como fluidificantes de parcelas pesadas;</p> <p>Emulsionantes dos asfaltenos para a síntese de produtos utilizados na pavimentação de ruas;</p> <p>Aditivos de gasolina dispersante de fuligem.</p>
Agroquímica	<p>Emulsionante de ativos agroquímicos em produtos concentrados mantendo a homogeneidade;</p> <p>Agente anticristalização de ativos agroquímicos;</p> <p>Dispersante durante a diluição de géis;</p> <p>Aumento da molhabilidade proporcionando a formação de um filme homogêneo e fino nas folhas das plantas em que o produto foi aplicado.</p>
Alimentícia	<p>Estabilizantes na homogeneização de gorduras com água e de espumas alimentícias;</p> <p>Umectantes e dispersantes em processos de hidratação;</p> <p>Na panificação dispersando o fermento pela massa reduzindo e homogeneizando as bolhas de gás pelo pão melhorando o seu “crescimento” e a aparência.</p>

Continua...

... Continuação

Indústria	Aplicações
Celulose	Na desestabilização da espuma formada no processo de digestão da lignina; Na separação das tintas utilizadas durante a produção de papéis recicláveis;
Construção civil	Redutores da viscosidade em massas de concretos e de asfaltenos utilizados em pavimentação; Em formulações de impermeabilizantes utilizados em telhados, os surfactantes formam filmes hidrorrepelentes por adsorção, impedindo a migração da água por capilaridade; Na produção de cerâmicas.
Tintas	Auxiliam na dispersão, solubilização e emulsificação de óleos, resinas, pigmentos e aditivos reológicos e na umectação homogênea das superfícies a serem pintadas.
Mineração e Metalurgia	No processo de flotação e de <i>metalworking</i> .
Cosméticos	Em cosméticos têm as funções emulsionante, dispersante, lubrificante, estabilizante e auxiliam no ajuste da viscosidade das formulações; São responsáveis por levar os ingredientes ativos das formulações para o interior da pele, vencendo a camada de gordura que protege a pele; Retiram a gordura natural e sujidades de peles oleosas; Agem como hidratantes revertendo o ressecamento da pele; Atuam como detergentes e agentes espumantes.
Médica e veterinária	São responsáveis pelos processos de umectação, molhabilidade, emulsionamento, adsorção e solubilização nos organismos animais e vegetais; Na área clínica são utilizados como surfactantes pulmonares, umectante da monocamada córnea e bactericidas.

Fonte: Adaptado de (DALTIM, 2011)

Além das aplicações relatadas na Tabela 1, sabe-se que nos Estados Unidos, alguns surfactantes fluorados, denominados filmes aquosos formadores de espuma (AFFF), como por exemplo, os sais sulfonatos de perfluoralquila, são empregados como herbicidas e inseticidas. Esses produtos por conterem flúor na composição acabam sendo tóxicos, podendo causar danos ao meio ambiente.

2.1.2. Histórico: desenvolvimento e uso dos surfactantes sintéticos e a ascensão dos biossurfactantes na sociedade contemporânea

Analisando o histórico dos surfactantes sintéticos, pode-se observar que são compostos com pouco mais de 100 anos, porém extensamente utilizados pela sociedade. Esses produtos compõem várias formulações de cosméticos, produtos de higiene pessoal, limpeza, farmacêuticos e em alimentos (BORSATO; MOREIRA; GALÃO, 2004). Além dessas aplicações, os surfactantes sintéticos também são rotineiramente utilizados nas indústrias petrolíferas, nos processos de extração de petróleo e remediação de áreas contaminadas em acidentes (Tabela 1). Sendo assim, é fato consolidado que a história dessas substâncias acompanhou a evolução de vários setores industriais, porém, o uso indiscriminado dos surfactantes trouxe alguns danos ambientais ao mundo atual. Desta forma, propostas de substituição para esses produtos tornaram-se cada vez mais constantes fazendo-se com que o conceito e uso dos biossurfactantes, produtos ecologicamente corretos e tão eficientes quanto os surfactantes sintéticos, se destaquem no contexto atual.

O primeiro detergente do mundo foi sintetizado em 1890 pelo químico alemão A. Kraft, quando constatou que moléculas com pequenas cadeias hidrofóbicas ligadas ao álcool apresentavam um poder espumante e capacidade de remoção de gorduras. Em 1907 em uma indústria alemã, os químicos responsáveis pela produção de sabões adicionaram perborato, silicato e carbonato de sódio, como reforçadores em uma das formulações de sabão comum e ao produto resultante deram o nome de detergente PERSIL. Na mesma época, alguns óleos sulfonados oriundos do tratamento de óleos vegetais com ácido sulfúrico concentrado também foram produzidos e utilizados como produtos de limpeza. Durante a Primeira Guerra Mundial, ainda na Alemanha, foram desenvolvidos os primeiros surfactantes sintéticos de aplicação geral. Gunther e Hetzer introduziram no mercado o primeiro detergente comercial com uma ação efetiva, conhecido como NEKAL, porém não se popularizou como o esperado (BORSATO; MOREIRA; GALÃO, 2004).

No início da década de 1930, a sulfatação de alcoóis de cadeias longas se tornou comum e os produtos resultantes eram vendidos na forma salina. Na mesma época, foram desenvolvidos nos Estados Unidos os alquilaryl sulfonatos de cadeias longas. Ambos eram usados como agentes de limpeza, porém, não causaram um grande impacto no mercado de detergentes (PENTEADO; SEOUD; CARVALHO, 2006).

Por volta de 1945, os detergentes se tornaram mais populares no mercado mundial, principalmente os alquilbenzeno sulfonatos e começaram a competir de forma eficaz com os

sabões. Com a adição de tripolifosfato de sódio e outros reforçadores em muitas das formulações de detergentes, essas tornaram-se mais robustas. Problemas antes limitantes na produção de detergentes, como a disponibilidade de matérias-primas, foram superados. Novos surfactantes a base de olefinas curtas formados por propeno, tornaram-se disponíveis no mercado. Uma vez que o propeno é um co-produto da indústria petroquímica, garantiu o baixo custo desses materiais, e assim, permitiu substituir os ácidos graxos por radicais alquila sintéticos obtidos da polimerização do mesmo. Assim, surgiram os detergentes sintéticos substituintes dos sabões em lavadoras de roupas e para outras aplicações domésticas.

Na década de 1950, os detergentes sintéticos à base dos derivados do petróleo dominavam o mercado norte-americano. O desenvolvimento de novos processos de craqueamento de petróleo permitiu a fabricação de eteno como matéria-prima de polímeros, sendo possível a produção de óxido de eteno e dos tensoativos etoxilados em grande escala (DALTIM, 2011).

A partir dos anos 1960, foram observados os primeiros problemas ambientais ocasionados pelo uso dos detergentes a base de surfactantes sintéticos. Há relatos que naquela época já existiam lagos, rios e até lençóis freáticos contaminados com os efluentes de esgotos com elevados teores de alquilbenzeno sulfonatos e polímeros ramificados de propeno. Era visível a poluição das águas retiradas de poços próximos aos pontos de dejetos, pois esses apresentavam uma espuma estável e resistente. Tal problema ocorreu em virtude da baixa degradabilidade dos polímeros derivados de hidrocarbonetos utilizados na fabricação de tensoativos sintéticos. Em 1965, novas leis de proteção ambiental limitaram a utilização de polímeros de propeno ramificados na fabricação de tensoativos e as indústrias produtoras tiveram que se adaptar as novas matérias-primas com uma melhor degradação gerando produtos menos nocivos ao meio ambiente, como os polímeros lineares de propeno e o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) (ROBERTO, 2000; DALTIM, 2011).

Entre as décadas de 70 e 90, houve sofisticação dos produtos cosméticos e de higiene pessoal e, conseqüentemente, uma proliferação de formulações com o emprego de diferentes surfactantes sintéticos. Observou-se um aumento do uso de produtos específicos como sabonetes, xampus, sabões em pó, desinfetantes para casa e amaciantes para roupas. Os tensoativos catiônicos e anfóteros passaram a se destacar, constituindo formulações de detergentes e xampus de baixa irritabilidade de uso infantil, condicionadores, cremes para pentear e sabonetes líquidos (DALTIM, 2011).

Nas últimas décadas, em função dos grandes acidentes petrolíferos os surfactantes serviram como importantes ferramentas no processo de remediação. No *Kwait* em 1991, durante a Guerra do Golfo, tropas iraquianas abriram as válvulas de poços de petróleo e oleodutos ao se retirarem da batalha, derramando aproximadamente 1,3 milhão de toneladas de petróleo no Golfo Pérsico, sendo este considerado o maior vazamento de petróleo da história mundial. Mais recentemente, em 2010, uma explosão na plataforma *Deepwater Horizon – British Petroleum*, nos Estados Unidos, foi responsável pelo acidente, em que vazaram aproximadamente 4 milhões de barris de petróleo no Golfo do México. Nestas catástrofes ambientais os surfactantes foram aplicados visando contribuir no processo de remediação da área contaminada, uma vez que removem de forma significativa o petróleo, auxiliando na regeneração das áreas impactadas.

Um dos surfactantes sintéticos mais tradicionais utilizados nos últimos anos, o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS), está presente em várias formulações de detergentes, sabões e outros produtos de limpeza, além de ser usado em processos de remediação de áreas contaminadas por petróleo e derivados.

Estudos, baseados em projeções, apontam que no ano de 2010 foram produzidas cerca de 3,4 milhões de toneladas de LAS (PENTEADO; SEOUD; CARVALHO, 2006). Apesar de ser regulamentado por órgãos governamentais de proteção ambiental como biodegradável, sabe-se que este composto no meio aquático é responsável pela diminuição de oxigênio dissolvido e permeabilidade da luz, além de aumentar as concentrações de compostos xenobióticos potencialmente tóxicos, como as pofenilas bicloradas (PCB), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHA) e derivados do próprio LAS, estar associado à bioacumulação de cádmio, a interferir em processos biológicos, como o ciclo do nitrogênio, acarretando no massacre de animais em grande número (DA ROS et al., 1995; HAIGH, 1996; BRANDT et al., 2001).

Além dos prejuízos ambientais, para as indústrias, o processo produtivo deste composto é dispendioso, já que é obtido por síntese química a partir de derivados de petróleo, como compostos aromáticos e alcanos lineares, com elevado gasto energia, em torno de 61 GJ/tonelada de LAS, o que reflete no preço final do produto (STALMANS et al., 1995; DETEN, 2012).

Apelos por processos industriais e produtos sustentáveis fizeram com que a procura por substituintes aos tensoativos sintéticos de origem petroquímica aumentasse. Os biosurfactantes obtidos a partir de recursos renováveis e com características que os denominam como ecologicamente corretos são considerados a grande promessa para os detergentes do futuro

(MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; DALTIM, 2011). A Figura 5 ilustra a evolução dos estudos dos biossurfactantes em função das mais diversas formulações e processos em que podem ser empregados.

Figura 5 - Evolução do número de publicações sobre biossurfactantes nos últimos vinte anos

Fonte: Plataforma de busca *ScienceDirect*, (2016)

2.2. Biossurfactantes: conceito, classificação, propriedades gerais e aplicações

Biossurfactantes são compostos com estruturas anfipáticas obtidos a partir de fontes naturais como vegetais, animais e microrganismos. Apresentam propriedades tensoativa e/ou emulsificante, antimicrobiana e antitumoral, o que lhes conferem inúmeras aplicações (DESAI; BANAT, 1997; CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; NITSCHKE; PASTORE, 2002; FONTES et al., 2008). Durante muito tempo o conceito de biossurfactantes esteve restrito somente aos surfactantes microbianos, porém, mais recentemente Wim Soetaert, em palestra no *Workshop on biosurfactants - Berlim, 2014*, passou a dividir os biossurfactantes em compostos de primeira e segunda geração, de acordo com a origem dessas substâncias.

Os biossurfactantes de primeira geração ou “surfactantes verdes” são conceituados como compostos extraídos e purificados de matérias-primas vegetais e animais ou inteiramente produzidos a partir de recursos renováveis por meio de sínteses químicas. Como principais

exemplos, enquadram-se as saponinas, os ésteres de açúcares, os alquilpoliglicosídeos e as alcanolamidas. Já os biossurfactantes de segunda geração são compostos inteiramente produzidos a partir de recursos renováveis e por meio de um processo biológico (biocatálise ou fermentação), sendo exemplificados principalmente pelos surfactantes microbianos do tipo glicolípido e lipopeptídeo (ALBANO, 2014; SOETAERT, 2014).

As propriedades físico-químicas e as classificações dos biossurfactantes devem-se às suas características estruturais. De acordo com Bognollo (1999) e Banat (2000), nos biossurfactantes, observam-se porções hidrofóbicas constituídas por cadeias hidrocarbônicas com um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupamento hidroxila, fosfato, carboxilato, um carboidrato, um aminoácido ou um peptídeo. A maioria dos biossurfactantes são neutros ou aniônicos (apresentam grupos polares com carga negativa), variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. Baseando-se na natureza de seus grupamentos hidrofílicos, os biossurfactantes também são comumente classificados de acordo com sua composição química, como pode observado na Tabela 2 (DESAI; DESAI, 1993).

Apesar da maioria dos biossurfactantes relatados na literatura serem metabólitos microbianos associados, parcialmente ou não associados ao crescimento celular, Kappeli e Finnerty (1979) reportaram que algumas células microbianas, devido à elevada hidrofobicidade superficial, também podem ser consideradas por si só como surfactantes. Como exemplo, temos alguns microrganismos hidrocarbonoclásticos e espécies de *Cyanobacteria*, *Staphylococcus* e *Serratia*. Também é conhecido que algumas vesículas extracelulares apresentam elevada atividade surfactante sendo classificadas como biossurfactantes particulados.

Tabela 2 - Tipos de biossurfactantes e seus principais representantes

Tipo de biossurfactante	Principais representantes
Saponinas ou saponosídeos	Saponinas esteroidais Saponinas triterpênicas
Glicolípídeos	Ramnolípídeos
	Soforolípídeos
	Manosileritritol lipídeos (MEL)
	Celobiose lipídeos ou Ácido Ustilágico
	Xilolípídeos
	Trealolípídeos
	Micolatos
	Trealomicolatos
	Lipídeos de oligossacarídeos
	Polióis lipídeos

Continua...

...Continuação

Tipo de biossurfactante	Principais representantes
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	Ácidos graxos; Lipídeos neutros; Fosfolipídeos.
Surfactantes poliméricos	Emulsan
	Biodispersan
	Liposan
	Complexo carboidrato-lipídeo-proteína
Lipopeptídeos e lipoproteínas	Lipoheteropolissacarídeos
	Manoproteínas
	Manana-lipídeo
	Surfactina
	Iturina
	Serrawetina
	Subtilisina
	Cerelipina
	Gramicidina
	Viscosina
	Anfisina
	Tolaasina
Particulados	Siringomicina
	Peptídeo-lipídeos (lisina lipídeo e ornitina lipídeo)
	Vesículas de membrana, fímbrias e <i>whole cells</i> .

Fonte: Autoria própria

Além desses biossurfactantes relatados na Tabela 2, obtidos naturalmente ou por síntese química, outros podem ser obtidos por meio de transformações enzimáticas/químicas em uma estrutura preexistente, os chamados biossurfactantes semi-sintéticos ou modificados (RECKE et al., 2013). Tais mecanismos de modificação permitem não só a mudança estrutural da molécula como também das propriedades físico-químicas e biológicas. Lang e Wagner (1992) e Zinjard e Ghosh (2010) relataram a utilização de sistemas enzimáticos, tais como lipases e glicosidases, na modificação estrutural de moléculas biossurfactantes precursoras, carboidratos e lipídeos. Recentemente, Delbeke e colaboradores (2015) sintetizaram um sofrorolipídeo quaternário de amônio, como pode ser observado na Figura 6. A partir de uma sofrorolactona produzida por *Starmerella bombicola* foram realizadas reações orgânicas a fim de inserir um grupamento amina na molécula biossurfactante. O sofrorolipídeo modificado foi então testado contra bactérias patogênicas, mostrando-se um excelente antimicrobiano no tratamento de linhagens gram-positivas, com potencial maior que os sulfatos de gentamicina já utilizados nas antibioticoterapias padrões, revelando-se como uma grande promessa na área clínica.

Figura 6 - Estrutura química de um sofrorolípídeo quaternário de amônio obtido por modificação estrutural de uma sofrorolactona produzido por *Starmerella bombicola*

Fonte: (Delbeke et al., 2015)

A classificação dos biossurfactantes também pode ser dada de acordo com suas massas molares. Alguns autores comumente os classificam como compostos de alta massa molar (polissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas destes biopolímeros) ou baixa massa molar (glicolípídeos e lipopeptídeos) (RON; ROSENBERG, 2002).

Os biossurfactantes são de fundamental importância no cenário atual por serem considerados produtos ecologicamente corretos, devido à baixa/nula toxicidade e a elevada biodegradabilidade. Além disso, quando comparados aos surfactantes sintéticos são mais eficientes, por exibirem reduzidas atividades superficial e interfacial, serem tolerantes às elevadas temperaturas e extremos de pH e força iônica (COOPER; PADDOCK, 1984; HOROWITZ et al., 1990; MULLIGAN; GIBBS, 1993; CAMEOTRA; MAKAR, 1998; FLASZ et al., 1998; BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes são considerados moléculas versáteis devido a ampla possibilidade de aplicação industrial. Podem ser utilizados nas indústrias petrolífera, química, alimentícia, farmacêutica e na agricultura (VAN DYKE; LEE; TREVORS, 1991; NITSCHKE; PASTORE, 2002; NITSCHKE; COSTA, 2007; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009; GHARAEI-FATHABAD, 2011; CAMPOS et al., 2013; SILVA et al., 2015). Na Tabela 3, encontram-se de forma resumida as principais funções e aplicações dos biossurfactantes nos diversos setores industriais.

Tabela 3 - Principais propriedades e aplicações industriais dos biossurfactantes

Função	Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração e biorremediação
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação controlada de fármacos
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos e recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações e oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água e calcário-água
Agente fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes larvicida e mosquitocida	Controle de vetores de doenças tropicais negligenciadas
Agente de recuperação	Recuperação melhorada de petróleo (MEOR)
Estimuladores da imunidade animal e vegetal	Desenvolvimento de fármacos e formulações inoculantes
Agente antitumoral	Desenvolvimento de fármacos
Agente antimicrobiano	
Nanopartículas com potencial terapêutico	

Fonte: Adaptado de (BANAT, 2000); (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000); (NITSCHKE; PASTORE, 2002); (VATSA et al., 2010); (GANESH et al., 2010); (SAIKIA; BHARALI; KONWAR, 2013); (DWIVED et al., 2015); (SILVA et al., 2015)

Como pode ser observado na Tabela 3, os biossurfactantes possuem diversas aplicações, porém, ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Além disso, vários grupos de pesquisa vêm buscando um melhor entendimento das vias de produção bioquímica destes produtos e assim desenvolverem novas estratégias para incrementar a produção.

2.3. Por que os microrganismos produzem os biossurfactantes?

Apesar de serem compostos de extrema importância para a sociedade, aplicados em diversos setores industriais, os motivos pelos quais os microrganismos produzem esses compostos ainda são totalmente desconhecidos. Sabe-se que em muitos casos, os biossurfactantes apresentam funções fisiológicas como emulsificação, solubilização e transporte intracelular de compostos insolúveis em meio aquoso, liberação celular em biofilmes, atividade microbiana e *quorum sensing* (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A necessidade de alguns microrganismos emulsificarem, solubilizarem e transportarem para compartimentos intracelulares compostos insolúveis em meio aquoso, facilitando o consumo desses substratos para a geração de energia, já foi estudada de forma aprofundada por alguns autores. Hipóteses como as formuladas por Rosenberg et al. (1979) e Reddy et al. (1982), para a emulsificação e incorporação de gotas de óleo em escala micrométrica, e Kirschner e colaboradores (1980), para a pseudossolubilização de hidrocarbonetos, são aceitas até hoje como explicações para o metabolismo de compostos apolares por microrganismos. Esses autores se referiam a dois modos de interação de hidrocarbonetos com as células microbianas : (I) contato direto dos microrganismos com o substrato insolúvel (interação não mediada) ou (II) pelo contato através de um mediador (interação mediada).

Os estudos de Zhang e Miller (1992) e Patrícia e Jean-Claude (1999) corroboraram a favor da interação mediada, onde compostos biossurfactantes têm sido responsáveis por melhorar a biodegradação de hidrocarbonetos por mecanismos de dispersão de compostos imiscíveis em água (ZHANG; MILLER, 1992; PATRICIA; JEAN-CLAUDE, 1999). Conforme relatado nos trabalhos de Oberbremer, Muller-Hurtig e Wagner (1990) e Noordman et al. (2002), a adição de ramnolipídeos no solo aumentou a biodegradação de uma série de hidrocarbonetos. Assim, pôde-se concluir, que existe uma clara correlação entre a produção biossurfactantes e a utilização de hidrocarbonetos como fonte de carbono pelos microrganismos. No entanto, têm sido propostos diferentes modos de absorção microbiana para hidrocarbonetos, por vezes, mais do que um mecanismo absorptivo ocorre simultaneamente (GOSWAMI; SINGH, 1991).

O exemplo mais claro dos fenômenos discutidos acima foi retratado recentemente no trabalho de Cameotra e Singh (2009), onde a ação do biossurfactante provocou a dispersão do hexadecano em gotículas menores que 0,22 μm , aumentando a disponibilidade do hidrocarboneto para os organismos degradantes (*Pseudomonas aeruginosa* SSC2) e um posterior emulscionamento facilitando o contato entre o hidrocarboneto e as bactérias. Também

verificou-se que a absorção ocorreu sugerindo um mecanismo semelhante a uma pinocitose, fato não relatado anteriormente em sistemas bacterianos para a absorção de hidrocarboneto.

Na Figura 7A, pode-se observar que as células de *Pseudomonas aeruginosa* quando cultivadas em meio com glicose como única fonte de carbono, não apresentaram nenhuma mudança morfológica. Já as células cultivadas em meio de cultivo suplementado com o hidrocarboneto (Figura 7B) pareciam estar interligadas por uma “rede” formada por uma secreção extracelular. Essa secreção extracelular provavelmente pode ser um “caminho” pelo qual o hidrocarboneto pode ser transportado para a superfície celular para posterior absorção e também uma espécie de “local de ancoragem” para que as células utilizem o hidrocarboneto como nutriente.

Figura 7 - Micrografias eletrônicas de varredura de *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas em meios de cultivo suplementado com (A) 2 % de glicose e (B) 2 % de n-hexadecano

Fonte: (CAMEOTRA; SINGH, 2009)

Na Figura 8, observa-se um estudo ultraestrutural, onde micrografias de microscopia eletrônica de transmissão revelam células aderindo-se a gotículas do hidrocarboneto (A) e a internalização destas gotículas formando-se inclusões intracelulares (B, C, D e E). O mesmo não foi observado no cultivo em meio suplementado com glicose (F).

Figura 8 - Micrografias eletrônicas de transmissão de *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas em meios de cultivo suplementado com (A, B, C, D e E) 2 % do hidrocarboneto n-hexadecano e (F) 2 % de glicose

Fonte: (CAMEOTRA; SINGH, 2009)

A produção de biossurfactantes pelos microrganismos também pode ser considerada um mecanismo de regulação para a aderência e liberação celular em superfícies, durante um processo de sinalização/comunicação dependente da densidade populacional, o chamado *quorum sensing* (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006). A aderência e liberação celular podem ocorrer devido às propriedades superficiais (tensão superficial, entalpia superficial por unidade de área, composição da superfície, dentre outras.), das interfaces dos suportes e das membranas microbianas. Além disso, as propriedades microbiológicas e as características do meio circundante, tais como, temperatura, pH, força iônica e disponibilidade de nutrientes, também são determinantes no processo relatado (UBBINK; SCHAR-ZAMMARETTI, 2007).

Os biossurfactantes são importantes nos processos de aderência e liberação celular, pois os microrganismos podem utilizar as substâncias surfactantes da parede celular para regular as propriedades da superfície, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos *habitat* com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes com condições desfavoráveis (ROSENBERG; RON, 1999).

Os compostos biossurfactantes também são importantes para os microrganismos por apresentarem atividade antimicrobiana, tornando-se um mecanismo de defesa em um ambiente

de competição. Os lipopeptídeos e glicolipídeos são os principais biossurfactantes relatados com propriedades antimicrobianas (ARAÚJO; FREIRE; NITSCHKE; 2013). A ação antimicrobiana dos biossurfactantes deve-se pela interação desses compostos com os fosfolipídeos de cadeia curta encontrados na membrana plasmática ocasionando um aumento na permeabilidade membranar por meio de sua solubilização, ruptura e desestruturação (Figura 9) (BOUFFIOUX et al., 2007).

Figura 9 - Ação dos compostos biossurfactantes nas membranas celulares e seu efeito antimicrobiano

Fonte: (COWAN; TALARO, 2012)

Dentre os biossurfactantes com ação antimicrobiana, a classe dos lipopeptídeos é a mais relatada. As bactérias do gênero *Bacillus* são responsáveis pela produção dos lipopeptídeos surfactantes mais bem conhecidos (DAS; MUKHERJE; SEN, 2008; FERNANDES et al., 2007). Além da surfactina, este gênero também produz outros lipopeptídeos com as mesmas propriedades: fengicina, iturina, bacilomicinas e micosubtilinas (ARAÚJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Os glicolipídeos biossurfactantes também são relatados como potenciais antimicrobianos. Os ramnolipídeos produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* são intensamente relatados como antimicrobianos (DAS; MUKHERJE; SEN, 2008; VATSA et al.,

2010). Além desses, os glicolipídeos de origem leveduriforme, como os soforolipídios produzidos por *Candida bombicola*, os manosileritritol lipídeos (MEL-A e MEL-B) de *Candida antarctica* e os celobiose lipídeos de *Trichosporon porosum* (DAS; MUKHERJE; SEN, 2008; KULAKOVSKAYA et al., 2010) também apresentam efeito antimicrobiano.

Além da ação antimicrobiana contra bactérias e fungos, a atuação antiviral dos biossurfactantes também foi relatada por Uchida e colaboradores (1989) em testes com biossurfactantes do tipo succinil-trealose lipídeos produzidos por *Rhodococcus erythropolis* contra o vírus da herpes simples (*in vitro* DL₅₀ de 11 µg/mL) e *parainfluenza* (*in vitro* DL₅₀ de 33 µg/mL).

2.4. Produção biotecnológica de biossurfactantes utilizando subprodutos agroindustriais como alternativa sustentável

2.4.1. Utilização de subprodutos agroindustriais como matéria-prima em bioprocessos

Atualmente é grande o apelo pelo desenvolvimento sustentável, iniciado na década de 1970 e formalizado em 1987, com o Relatório *Brundtland* preparado pela Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, junto da posterior ascensão dos conceitos de Ecologia Industrial, Química Verde e de Biorrefinarias. Este fato, fez com que se priorizassem os processos biotecnológicos que utilizam subprodutos oriundos das atividades agrícolas e da agroindústria como matérias-primas. Devido à grande disponibilidade em quantidade, esses materiais despertaram a atenção de governantes, pesquisadores e indústrias, por criarem problemas ambientais e representarem perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição ambiental (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Com o avanço das pesquisas de caráter sustentável, quanto aos bioprocessos (fermentações e biocatálises), vários setores industriais, principalmente o alimentício, químico e farmacêutico, priorizaram utilizar materiais antes considerados subprodutos, como matérias-primas para a obtenção de produtos com alto valor agregado, os chamados *bio-based products*. A adoção desse tipo de matéria-prima se destaca não só pelo apelo ambiental, mas também por apresentarem um custo muito baixo, possibilitando uma boa relação custo/benefício quando comparado aos obtidos por sínteses químicas tradicionais, que utilizam matérias-primas caras, muitas delas derivadas de petroquímicos (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Além da agregação de valor aos subprodutos, são destacadas como vantagens dos bioprocessos com relação as tradicionais sínteses químicas: (I) a utilização de condições brandas de processo, pois as reações são realizadas por microrganismos e enzimas a uma temperatura próxima à ambiente, o que acarreta menor gasto energético; (II) pH do meio de cultivo ou reacional próximo à neutralidade; (III) a baixa carga de resíduos gerados durante o processo, além de apresentarem uma toxicidade baixa ou nula, não causando impactos ao meio ambiente; a (IV) regio e estereosseletividade das reações, principalmente nos processos biocatalíticos, resultando na produção de compostos enantiomericamente puros, não sendo necessária a utilização de métodos de resolução (separação) dispendiosos e (V) a possibilidade de realizar reações biológicas em meio sólido (fermentações ou biocatálises em estado sólido) (COMASSETO, 2010).

A utilização de subprodutos em processos biotecnológicos não é novidade para a sociedade. Apesar de somente agora os bioprocessos utilizando subprodutos agroindustriais terem recebido maior ênfase, esses já eram usados, principalmente em fermentações em estado sólido (FES), desde meados do século XVII. Sabe-se que na França, os produtores de *Agaricus bisporus* (*Champignon*) já cultivavam esses cogumelos sobre as “camas” utilizadas para estocagem dos frutos, composta de diversos tipos de palhas (arroz, trigo, aveia) misturadas com esterco de animais (aves, bovinos, equinos) (JESUS, 2011). Em 1896, Takamine produziu uma enzima digestiva, a takadiastase, em fermentação em estado sólido por *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo. Entre 1900 e 1920, observou-se a utilização de subprodutos, como substratos, na produção de enzimas microbianas e ácido kójico por FES (PANDEY et al., 2001).

No Brasil, o grande *boom* da Biotecnologia ocorreu na década de 1970. Diante da crise do petróleo que assolava o mundo, o país mostrou seu potencial na produção de etanol de 1ª geração (G1), com o Programa Nacional do Alcool (PROALCOOL), utilizando melaço de cana como principal matéria-prima na fermentação alcoólica. Porém, considerando que somente 1/3 da planta de cana-de-açúcar é utilizada na obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol e pelo fato de que esses materiais competem por terras cultiváveis com culturas destinadas à alimentação humana ou animal, aumentando assim a pressão sobre os preços dos alimentos e acelerando a degradação ambiental, passou-se a buscar tecnologias para obtenção do etanol a partir do bagaço resultante do processo de moagem (DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011). Dessa forma, foi concebida a idéia da utilização de bagaço e palha da cana dentre outros subprodutos lignocelulósicos na obtenção de açúcares

fermentescíveis para emprego em processos fermentativos. Os hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos oriundos dessas matérias-primas, com elevado teor glicídico, passaram a ser utilizados pelas pesquisas e indústrias biotecnológicas, principalmente na obtenção de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração (G2).

Nas décadas posteriores, a produção de outros metabólitos microbianos utilizando resíduos agrícolas e agroindustriais como fonte nutriente foi aprimorada. Sendo assim, diversos outros produtos puderam ser obtidos, tais como: alimentos enriquecidos proteicamente para a alimentação animal e humana, antibióticos, alcalóides, ácidos orgânicos (ácido cítrico, láctico, oxálico, fumárico e gálico), polióis e biopesticidas, dentre outros (PANDEY et al., 2001).

Os subprodutos oleaginosos, óleos e gorduras residuais, também se destacam como fontes de nutrientes em processos fermentativos. Geralmente são oriundos da indústria alimentícia e são vastamente empregados na produção de lipases por leveduras e fungos filamentosos (CASTANHA, 2012).

O glicerol residual da síntese de biodiesel também passou a se destacar nos últimos anos como potencial matéria-prima nos processos biotecnológicos. Na revisão de Rivaldi et al. (2008) pode-se observar alguns bioprodutos obtidos pela utilização do glicerol em bioprocessos, sendo os principais: 1,3 – propanodiol, ácidos orgânicos, etanol, poliidroxialcanoatos (PHA), ácido poliinsaturado ômega 3, enzimas, antibióticos e pigmentos.

Cita-se ainda os resíduos ricos em compostos nitrogenados extremamente importantes para os bioprocessos. As fontes de nitrogênio de baixo custo, comumente utilizadas em processos fermentativos são: milhocina, farelo de glúten de milho, farelo de amendoim, farelo de soja e resíduos de laticínios (VANDAMME, 2009). Os farelos de soja e arroz têm sido estudados e aplicados em vários bioprocessos, como produção de enzimas, biomassa microbiana, bioaromas, etanol de segunda geração e xilitol (CHAUD et al., 2009; ROSSI, 2011). A composição mineral desses grãos, além de suplementar os cultivos com nitrogênio orgânico faz destes extratos promissoras fontes de micronutrientes e fatores de crescimento. Tantos nos grãos de soja e arroz, quanto em seus extratos, encontram-se vitaminas (niacina, riboflavina, ácido pantotênico e tiamina) e aminoácidos (arginina, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina e valina) (MILLER; CHURCHILL, 1986). Dessa forma, esses extratos de farelo de soja e arroz podem servir como alternativas de baixo custo na substituição dos extratos de levedo enriquecidos em vários bioprocessos, uma vez que o preço do extrato de levedura pode chegar à R\$ 738,00/kg, enquanto o farelo de soja custa em torno de R\$ 1,27/kg e o de arroz R\$ 0,65/kg (SIGMA ALDRICH, 2016; CLIC MERCADO, 2016).

Dentre os subprodutos citados, nos últimos anos, os lignocelulósicos têm sido os que receberam maior destaque devido, principalmente, à necessidade do fortalecimento dos programas governamentais para o desenvolvimento dos biocombustíveis e, mais recentemente, a produção dos *bio based products* visando a consolidação das biorrefinarias lignocelulósicas.

2.4.2. A utilização de biomassas vegetais como matéria-prima nos bioprocessos: um olhar especial para os materiais lignocelulósicos

A valorização das biomassas vegetais residuais nos bioprocessos, principalmente as de origem lignocelulósica, dá-se por serem materiais ricos em carboidratos. Na constituição desses materiais, encontram-se de 35 a 50 % de celulose, um homopolímero linear composto por glicose e 20 a 35 % de hemicelulose, um heteropolímero composto, principalmente, por xilose e arabinose. Além da porção glicídica, encontra-se também, a lignina (10 – 25 %), uma macromolécula polifenólica (SANTOS et al., 2012). Esses compostos são comumente encontrados nas paredes celulares de vegetais, arranjados de forma que a celulose esteja cimentada pela hemicelulose e a lignina, conforme a representação esquemática na Figura 10.

Figura 10 - Estrutura da biomassa lignocelulósica

Fonte: Adaptado de (FERREIRA e colaboradores, 2011)

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina são variáveis de acordo com as partes, idades e as espécies vegetais (Tabela 4). O restante da biomassa é constituído, minoritariamente, por substâncias como proteínas, pectina, óleos, minerais, terpenos, alcalóides e vários pigmentos. Devido à rica composição orgânica, os materiais lignocelulósicos são aproveitados nos bioprocessos principalmente como fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, micronutrientes e fatores de crescimento de fundamental importância para a nutrição microbiana (NIGAM; GUPTA; ANTHWAL, 2009).

Tabela 4 - Composição química de biomassas lignocelulósicas

Biomassa lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Palha de cana-de-açúcar	40 – 44	30 – 32	22 – 25
Bagaço de cana-de-açúcar	32 – 48	19 – 24	23 – 32
Madeira dura	43 – 47	25 – 35	16 – 24
Madeira mole	40 – 44	25 – 29	25 – 31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38 – 40	28	7 – 21
Fibra de coco	36 – 43	0,15 – 0,25	41 – 45
Fibra de bananeira	60 – 65	6 – 8	5 – 10
Palha de cevada	31 – 45	27 – 38	14 – 19

Fonte: (CORTEZ, 2010)

No Brasil, atualmente, o agronegócio representa 22 – 25 % do produto interno bruto (PIB), segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016). O país é visto por todo o planeta como um “celeiro” agrícola, pois é um dos maiores produtores de grãos do mundo, sendo produzidos, majoritariamente, a soja, o milho e o trigo. Além disso, o Brasil se destaca também pela produção de cana-de-açúcar, sendo que na safra 2015/2016 foram colhidas aproximadamente 655 milhões de toneladas dessa gramínea, tornando-o recordista mundial da cultura (CONAB, 2016). As diversas atividades baseadas no beneficiamento dos produtos agrícolas geram diversos subprodutos como as cascas, os farelos, os bagaços e alguns efluentes que quando não tratados adequadamente levam a sérios problemas ambientais, principalmente os relativos ao descarte e à contaminação do meio ambiente (PANDEY, 2001). Apenas de bagaço de cana-de-açúcar, na safra 2015/2016, estima-se que foram produzidas 196 milhões de toneladas, sabe-se que parte, 157 milhões de toneladas,

foram utilizadas para geração de energia pelas próprias usinas, e o excedente armazenado nos pátios, correndo o risco de combustão espontânea, ou descartado em locais impróprios.

Uma das alternativas para a melhor utilização destes resíduos são os bioprocessos. O número de trabalhos em âmbito mundial, envolvendo os materiais lignocelulósicos em processos bioquímicos e microbiológicos aumentou de forma progressiva, em torno de 370 % na última década, como foi citado no relatório sobre a Química Verde no Brasil, desenvolvido pelo Centro de Gestão de Estudos Estratégicos (CGEE, 2010). O que impulsiona esta evolução é a ascensão do conceito de Biorrefinaria, os princípios pregados pela Química Verde e os avanços da Biotecnologia Microbiana, que possibilitaram a utilização destes subprodutos na síntese de vários produtos de maneira similar a uma refinaria de petróleo, onde microrganismos e enzimas são os principais agentes de biotransformação e fermentação (FERNANDO et al., 2006).

Como se sabe, os materiais lignocelulósicos e seus derivados podem ser usados em vários bioprocessos. Na Tabela 5, encontram-se alguns produtos obtidos pela utilização do bagaço de cana-de-açúcar em cultivos microbianos, já que este é o resíduo mais usado no cenário biotecnológico nacional.

Tabela 5 - Principais produtos obtidos por microrganismos cultivados em bagaço de cana-de-açúcar e seus hidrolisados por meio de fermentações em estado sólido ou submersas

Produto	Microrganismo	Referência
Etanol	<i>Scheffersomyces shehatae</i> CG8 - 8BY	MARTINIANO et al., 2013
	<i>Spathaspora arborarie</i> UFMG – HM 19.1	
	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	BETANCUR; PEREIRA Jr., 2010
	<i>Pachysolen tannophilus</i>	CHENG et al., 2008
	<i>Escherichia coli</i> KO 11	TAKAHASHI et al., 2000
Xilitol	Bactéria recombinante	KATZEN; FOWLER, 1994
	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	ROBERTO et al., 1991
		SILVA et al., 2014
		SANTOS et al., 2008
		CARVALHO et al., 2006
	<i>Candida guilliermondii</i>	CANETTIERI; SILVA; FELIPE, 2002
		ALVES et al., 1998
		FELIPE et al., 1996
		GURGEL et al., 1995

Continua...

...Continuação

Produto	Microrganismo	Referência
“Single Cell Protein” (SCP)	<i>Aspergillus niger</i>	ZAYED; MOSTAFA, 1992
	<i>Cellulomonas flavigena</i> e <i>Xanthomonas</i> sp.	RODRIGUEZ-VAZQUEZ e DIAZ CERVANTES, 1994
	<i>Candida tropicalis</i>	PESSOA; MANCILHA; SATO, 1996
	<i>Trichoderma reesei</i>	AIELLO et al., 1996
Micoproteína	<i>Neurospora sitophila</i>	MOO YOUNG; CHIST; VLACH, 1993
Lacase	<i>Flammulina velutipes</i>	PAL et al., 1995
	<i>Trametes versicolor</i>	
Celulases	<i>Penicillium echinulatum</i> 9AO2SI	CAMASSOLA; DILON, 2014
	<i>Piromyces</i> sp.	TEUNISSEN et al., 1992
	<i>Aspergillus niger</i>	RAY et al., 1993
	<i>Trichoderma reesei</i>	AIELLO et al., 1996
	Fungos da podridão branca	BRECCIA et al., 1997
	<i>Aspergillus ellipticus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	GUPTE; MADAMWAR, 1994
Xilanases	<i>Trichoderma harzianum</i>	ROUSSOS et al., 1992
	<i>Cellulomonas flavigena</i>	MAYORGA-REYES et al., 2002
	<i>Melanocarpus albomyces</i>	JAIN, 1995
	<i>Penicillium janthinellum</i>	MILAGRES; LACIS; PRADE, 1993
	<i>Piromyces</i> sp.	TEUNISSEN et al., 1992
Ácido Giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i>	RODRIGUES et al., 2009
	<i>Fusarium fujikuroi</i>	TOSMANI; FAJARDO; BARRIOS-GONZALEZ, 1997
	<i>Gibberella fujikuroi</i>	
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	ROJAN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2006
Ácido láctico	<i>Rhizopus oryzae</i>	SOCCOL et al., 1994
Bioplásticos (PHA e PHB)	<i>Ralstonia eutropha</i>	JIAN; HEIKO, 2008

Fonte: Adaptado de (NIGAM; GUPTA; ANTHWAL, 2009)

O bagaço de cana-de-açúcar é composto por 45 % de fibras, 50 % de umidade e 2 - 3 % de sólidos solúveis em água. A constituição química por grama de massa seca é composta por 45 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 20 % de lignina. Nos bioprocessos, pode-se utilizar tanto o bagaço *in natura* como os seus hidrolisados ricos em açúcares fermentescíveis como fontes de nutrientes (PANDEY et al., 2000). As frações celulósica e lignínica já são exploradas em vários processos industriais químicos, físicos e biológicos. Porém, a utilização da fração hemicelulósica ainda é restrita a obtenção de etanol de segunda geração e xitol. Vale ressaltar

que as pentoses obtidas a partir da hemicelulose apresentam grande potencial nos bioprocessos utilizados nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos.

As hemiceluloses são um grupo heterogêneo de polissacarídeos que compõem as paredes celulares de vegetais, garantindo uma estrutura reforçada. São formadas majoritariamente por pentoses arranjadas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4) em configuração equatorial e agrupadas em xiloglucanas, xilanas, mananas, glucomananas e β -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-glucanas, com teores variados de cada grupo de acordo com a espécie vegetal e o tipo celular (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). No bagaço de cana-de-açúcar, são responsáveis por até 25 % do complexo lignocelulósico, representando uma fonte de açúcares pentoses que podem ser utilizados em processos fermentativos industriais originando uma gama de produtos como biocombustíveis, vitaminas, polióis, dentre outros (PANDEY et al., 2000).

O aproveitamento da hemicelulose como substrato em bioprocessos pode ser realizada graças aos processos de hidrólise desse polissacarídeo, gerando açúcares fermentescíveis. Na literatura há relatos de uma variedade de metodologias para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar. As técnicas hidrolíticas ou pré-tratamentos utilizados baseiam-se na desestruturação seletiva da matriz reforçada que compõe os materiais lignocelulósicos. Com o rompimento da estrutura e a consequente acessibilidade à fração hemicelulósica, é possível hidrolisá-la e solubilizá-la, obtendo-se um hidrolisado rico em xilose, arabinose e glicose (PANDEY et al., 2000; LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; MOSIER et al., 2005; CHAMPAGNE, 2008; AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido utilizados para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, porém, deve-se salientar que a adoção de uma determinada técnica irá depender das propriedades físicas e químicas do material lignocelulósico (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). Além disso, a técnica escolhida deverá ser capaz de produzir elevados rendimentos em açúcares pentoses, não liberar quantidades significativas de compostos que atuam como inibidores do metabolismo microbiano (furanos e fenóis), não produzir elevados níveis de resíduos, serem simples e com um custo viável (LYND, 1996). Os métodos de pré-tratamentos utilizados atualmente são divididos em processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 - Principais tipos de processos de pré-tratamento e técnicas utilizadas

Tipo de pré-tratamento	Técnica
Físico	Moagem e trituração; Ultrassonicação; Moagem centrífuga; Extrusão.
Químico	Pré-tratamento com ácido mineral diluído; Pré-tratamento com mistura ácido-acetona; Pré-tratamento com líquido iônico; Pré-tratamento alcalino com permanganato de potássio; Organossolve; Cloretos metálicos.
Físico-Químico	Explosão a vapor; Pré-tratamento <i>hot water</i> ; Oxidação úmida; Explosão com gás carbônico super crítico; Pré-tratamento IHRW; Plasma; AFEX.
Biológico	Consórcio microbiano; Pré-tratamento com espécies fúngicas; Pré-tratamento enzimático.

Fonte: Adaptado de (RAVINDRAN; JAISMAL, 2015)

A hidrólise ácida tem sido a técnica de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar que mostrou maior eficiência, com maiores rendimentos na liberação de açúcares pentoses fermentescíveis, sendo assim a mais empregada (LAOPAIBOON et al., 2010). Faz-se necessária a utilização de soluções ácidas e aquecimento do sistema a altas temperaturas (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002), conforme descrito por Canilha et al. (2011), em que verificaram as condições para a hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e observaram que, naquela situação, o emprego de até 2 % de ácido sulfúrico, a 150 °C durante 30 minutos foi eficiente na liberação dos açúcares fermentescíveis. Porém, além da liberação dos açúcares de interesse, nota-se a presença de ácidos orgânicos (ácido fórmico e acético) e compostos fenólicos (aldeídos e acídicos), oriundos da degradação da própria biomassa. Nota-se também a formação de furanos (furfural e 5-hidroximetil-furfural), resultantes das reações de desidratação devido ao pH ácido e a elevada temperatura do meio reacional. Durante a fermentação, dependendo da concentração em que se encontram no meio de cultivo, estes compostos são tóxicos e agem como inibidores do crescimento microbiano e do metabolismo fermentativo (Figura 11) (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAALJ, 2005).

atividade da ATPase membranar é aumentada, exigindo um maior bombeamento de íons, exaurindo as reservas de ATP. Com um *déficit* energético, a célula passa a ter uma maior concentração de ácido dissociado no citoplasma, forma tóxica que pode levar à morte celular (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; 2000b; ADAMS; MOSS, 2008) (Figura 12). Em trabalhos com *Candida guilliermondii* FTI 20037 em meios semi-sintéticos para a produção de xilitol, onde variou-se a concentração de ácido acético presente, Felipe e colaboradores (1995), observaram que teores superiores a 3,0 g/L, ocasionaram efeitos negativos à célula e ao processo fermentativo. Porém, a presença desse ácido em concentrações menores que 1,0 g/L, não afetou a fermentação, já que a levedura mostrou-se capaz de assimilar todo o ácido.

Os compostos fenólicos, oriundos da desestruturação da lignina, encontrados no hidrolisado hemicelulósico de origem ácida são tóxicos aos microrganismos em bioprocessos. Os fenóis e derivados comumente encontrados nos hidrolisados lignocelulósicos são siringaldeído, ácido sirínico, 4-hidroxibenzaldeído, ácido gentístico, ácido protocatecóico, vanilina, ácido vanilínico e o ácido ferúlico. A toxicidade desses compostos às células microbianas é dependente da massa molar, onde os fenólicos de menor massa são considerados mais tóxicos (ROSSEL, 2006).

Os fenólicos são prejudiciais às células pois podem causar a desestruturação da membrana plasmática afetando sua habilidade de barreira seletiva, a inativação de matrizes enzimáticas fundamentais para o funcionamento celular e a destruição ou inativação do material genético (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; 2000b) (Figura 12). Os malefícios causados pelos fenóis às células foram comprovados por Villa (1998) em cultivos com *C. guilliermondii* em meio semi-sintético com fenol numa concentração de 0,1 g/L, onde observaram a redução drástica da produtividade de xilitol.

Os furanos encontrados com frequência no hidrolisado ácido hemicelulósico são o furfural e o 5-hidroximetilfurfural, oriundos respectivamente, das reações de desidratação de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose e manose). Esses compostos são tóxicos para as células, pois, atuam como inibidores das enzimas álcool desidrogenase (ADH), aldeído desidrogenase (ALDH) e piruvato desidrogenase (PDH), na desestruturação da parede celular e moléculas de DNA, na inibição das sínteses de ácidos nucleicos e proteínas e no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) que atuam como radicais livres danificando as mitocôndrias das células leveduriformes (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; KHAN; HADI, 1994; LIU, 2011; MODIG; LIDEN; TAHERZADEH, 2002; ALLEN et al., 2010). Além desses malefícios, foram reportados casos de desequilíbrios redox celulares ocasionados por reações

de NAD(P)H e compostos reduzidos derivados dos furanos, tais como 2-furanometanol (FM) e furano-2,5-dimetanol (FDM) (PALMQVIST et al., 1999; LIU, 2011) (Figura 12).

Em estudos com furanos, furfural e 5-hidroximetilfurfural, foi constatada a inibição do crescimento de *C. guilliermondii* pela presença de diferentes concentrações (1,0; 1,5 e 2,0 g/L) destes compostos nos cultivos. A presença deles inibiu em até 40 % o crescimento microbiano, por atuarem nas atividades das desidrogenases. Porém, deve-se levar em conta, que os efeitos inibitórios de furanos são variáveis conforme a espécie ou linhagem microbiana estudada (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996).

Figura 12 - Representação esquemática do mecanismo de inibição de ácidos fracos, derivados furânicos e compostos fenólicos em *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: Adaptado de HASUNUMA; KONDO, 2012

Devido à presença dos compostos inibidores do crescimento microbiano no hidrolisado, antes do processo fermentativo ainda é necessária a remoção destes, utilizando os processos de destoxificação. A técnica de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico mais comum é o

emprego combinado de ácidos e bases para o ajuste do pH, onde ocorre a precipitação seletiva de alguns compostos, e a posterior aplicação de carvão ativado para a adsorção de alguns inibidores ricos em elétrons π , como por exemplo, os fenóis (ALVES et al., 1998; MARTÍNEZ et al., 2001; GINORIS, 2001; MARTON, 2002, VILLARREAL, 2005; GUILARDUCI et al., 2006).

2.4.3. Mercado e utilização de subprodutos industriais na produção de biossurfactantes

Devido ao apelo sustentável e as propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes ou superiores aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes se encontram num mercado em pleno desenvolvimento, com várias empresas investindo nas mais variadas aplicações, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Principais empresas produtoras de biossurfactantes no mundo e principais aplicações

Empresa	Localização	Produtos	Segmentos Industriais
<i>TeeGene Biotech</i>	Reino Unido	Ramnolipídeos Lipopeptídeos	Indústria farmacêutica;
<i>AGAE Technologies LLC</i>	Estados Unidos	Ramnolipídeos com alto grau de pureza (90, 95 e 98 %)	Indústria farmacêutica; Indústria petrolífera.
<i>Jeneil Biosurfactant Co. LLC</i>	Estados Unidos	Ramnolipídeos	Indústria química; Indústria petrolífera.
<i>Paradigm Biomedical Inc.</i>	Estados Unidos	Ramnolipídeos (Zonix/Reco)	Indústria farmacêutica.
<i>Rhamnolipids Companies, Inc.</i>	Estados Unidos	Ramnolipídeos	Indústria farmacêutica; Indústria química; Indústria petrolífera; Indústria de alimentos; Agricultura.
<i>Fraunhofer IGB</i>	Alemanha	Glicolipídeos (soforolipídeos, celobiose-lipídeos e manosileritritol-lipídeos)	Indústria química; Indústria farmacêutica.
<i>Cognis Cares Chemicals</i>	China, Alemanha Estados Unidos	Alquilpoliglicosídeo (APG [®]), <i>Plantcare</i> 1200 GLY e <i>Rheocare</i> TTA	Indústria química; Indústria farmacêutica; Na agricultura.
<i>Saraya Co. Ltd.</i>	Japão	Soforolipídeos (Sophoron [®])	Indústria farmacêutica; Indústria química.

Continua...

...Continuação

Empresa	Localização	Produtos	Aplicações
<i>Ecover Belgium</i>	Bélgica	Soforolipídeos	Indústria farmacêutica; Indústria química; Indústria petrolífera; Agricultura.
<i>Groupe Soliance</i>	França	Soforolipídeos	Indústria farmacêutica.
<i>MG Intobio Co. Ltd.</i>	Coréia do Sul	Soforolipídeos (Sopholine)	Indústria farmacêutica.
<i>Synthesize LLC.</i>	Estados Unidos	Soforolipídeos	Indústria química; Indústria farmacêutica; Indústria de alimentos.
<i>Allied Carbon Solutions (ACS) Ltd.</i>	Japão	Soforolipídeos	Indústria química; Agricultura.
<i>Henkel</i>	Alemanha	Glicolipídeos (Soforolipídeos, Ranolipídeos, Manosileritritol-lipídeos)	Indústria química; Indústria farmacêutica.
<i>Lion Corporation</i>	Estados Unidos	Metil ester sulfonatos	Indústria química.
<i>Lipo Chemicals</i>	Estados Unidos	Lipomulse Lux	Indústria química; Indústria farmacêutica.
<i>Kaneka Co.</i>	Japão	Soforolipídeos	Indústria farmacêutica.
<i>Ecochem Ltd.</i>	Canadá	Consórcio de biossurfactantes (EC-601, EC-1800, EC-2100W)	Indústria petrolífera; Indústria química.

Fonte: Adaptado de RANDHAWA; RAHMAN, (2014)

Os países desenvolvidos, como os europeus e norte americanos, são responsáveis por 75 – 80 % do consumo global de biossurfactantes, enquanto os países emergentes e da Ásia-Pacífico, 20 – 25 %. Na Figura 13, há um dimensionamento dos principais segmentos comerciais em que esses produtos são aplicados no mundo (*Grand View Research*, 2014).

Figura 13 - Participação dos biossurfactantes nos principais segmentos industriais em que são aplicados no mercado mundial

*Como aplicações institucionais entende-se o uso de biossurfactantes por governos em processos de biorremediação

Fonte: Adaptado de *Grand View Research*, (2014)

De acordo com dados dos últimos relatórios da *Transparency Market Research* (2012) e *Grand View Research* (2014), foi registrada uma produção média global de 344 mil toneladas de biossurfactantes e uma arrecadação de aproximadamente 1,7 bilhões de dólares entre 2011 e 2013. Há previsão que até 2020 ocorra um aumento de 4,3 % na produção atingindo 462 mil toneladas e 2,2 bilhões de dólares arrecadados.

Apesar do mercado em expansão, a produção de biossurfactantes ainda é considerada baixa, pois os custos, quando comparados aos surfactantes sintéticos, podem ser iguais ou superiores, devido aos substratos utilizados e, além disso, há um problema relacionado com a biossíntese da maioria dos biossurfactantes ser por bactérias patogênicas (SHEPHERD et al., 1995; SEKHON, 2012). Diante desses problemas, a utilização de subprodutos industriais e leveduras como agentes fermentadores nos bioprocessos pode ser alternativa viável e rentável.

Em recentes artigos de revisão Fontes et al. (2008) e Makkar e colaboradores (2011) relataram a importância da escolha da fonte de carbono e microrganismo para um melhor rendimento no processo fermentativo de produção dos biossurfactantes. Também ressaltaram a utilização de fontes de nutrientes renováveis e mais baratas, tendência na indústria para a redução dos custos dos bioprocessos.

A influência das fontes de carbono e dos microrganismos escolhidos na produção de biossurfactantes ficou evidente nos trabalhos de Zinjard e Pant (2002), que cultivaram *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, uma levedura oleaginosa, em meios semi-sintéticos contendo glicose,

glicerol, acetato de sódio e álcool, como substratos, não obtendo sucesso. Porém, em meios suplementados com óleo cru e alcanos (C₁₂ – C₁₈) detectou-se a presença de biotensoativos. Estes dados corroboraram com os experimentos realizados por Kim e Rehm, (1982). Como exemplificado, deve haver uma compatibilidade entre o metabolismo do(s) microrganismo(s) e o(s) substrato(s) utilizado(s). Além da compatibilidade, o uso de diferentes fontes de carbono no cultivo pode alterar a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, consequentemente, suas propriedades físico-químicas e biológicas (COOPER, 1986; FONTES et al., 2008).

Atualmente, é crescente o número de pesquisas que utilizam resíduos agroindustriais e leveduras na produção de compostos biotensoativos, como pode ser observado na Tabela 8. O uso dos subprodutos é justificável pelo contexto de processos sustentáveis em que o mundo se encontra e a redução dos custos de produção, como já discutido anteriormente. Já as leveduras, têm sido cada vez mais utilizadas como agentes fermentadores, na produção desses metabólitos, apesar de não serem tão boas secretoras de biossurfactantes, quando comparadas às bactérias. A grande vantagem das leveduras na produção dos biossurfactantes reside no *status* GRAS (*Generally Regarded As Safe*) que muitas delas apresentam, eliminando riscos de toxicidade e patogenicidade e permitindo aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, sem restrições (BARTH, 1997; FONTES et al., 2008). Além disso, leveduras possuem estruturas celulares mais resistentes aos biossurfactantes secretados no meio de cultivo do que as bactérias, fazendo desse fato outro atrativo a produção industrial desses metabólitos (MONTEIRO et. al., 2009).

Entre as leveduras mais conhecidas na produção dos biossurfactantes, verifica-se as do gênero *Candida*, *Starmerella* e *Pseudozyma*. Porém, na literatura encontram-se relatos de produção pelos gêneros *Rhodotorula*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Aureobasidium*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Cryptococcus*, *Rhizopus*, *Yarrowia* e *Trichosporon* (CHRISTOLPHI; IVSHINA, 2002; BEOPOULOS; CHARDOT; NICAUD, 2009). Deve-se salientar que recentemente as leveduras descritas como lipases positivas e oleaginosas (acumuladoras de lipídeos intracelulares) destacaram-se como melhores produtoras de biossurfactantes.

Tabela 8 - Alguns estudos da produção de biossurfactantes por leveduras utilizando resíduos industriais

Microrganismo	Fonte de Carbono	Biossurfactante produzido	Referência
<i>Candida bombicola</i>	Gordura animal e glicose	Glicolipídeos (soforolipídeos)	DESHPANDE; DANIELS, 1995
<i>Candida antarctica</i>	Hidrocarbonetos residuais de refinaria de petróleo	Glicolipídeos	BEDNARSKI et al., 2004
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Óleo de milho e mel	Glicolipídeos (soforolipídeos)	PEKIN; VARDAR-SUKAN, 2005
<i>Pseudozyma antarctica</i>	Glicerol residual	Glicolipídeos	MORITA et al., 2007
<i>Candida lipolytica</i>	Resíduos de indústrias de óleos vegetais	Complexo proteína-carboidrato-lipídeo	RUFINO et al., 2007
<i>Candida bombicola</i>	Óleo residual de restaurantes	Glicolipídeos (soforolipídeos)	SHAH; JURJEVIC; BADIA, 2007
<i>Candida bombicola</i>	Melaço de soja	Glicolipídeos (soforolipídeos)	SOLAIMAN et al., 2007
<i>Candida lipolytica</i>	Resíduos de indústrias de óleo de soja	Não identificado	RUFINO et al., 2008
<i>Candida sphaerica</i> UCP0995	Óleo residual de amendoim	Não identificado	SOBRINHO et al., 2008
<i>Scheffersomyces anomala</i> PY1	Óleo soja	Glicolipídeos (soforolipídeos)	THANIYAVARN et al., 2008
<i>Candida</i> sp.	Óleo residual de amendoim	Glicolipídeos	COIMBRA et al., 2009
<i>Candida bombicola</i>	Melaço de cana e óleo de soja	Glicolipídeos (soforolipídeos)	DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009
<i>Trichosporon montevidense</i> CLOA 72	Óleo de girassol	Glicolipídeos	MONTEIRO et al., 2009
<i>Candia bombicola</i>	Soro de leite desproteínizado e glicose	Glicolipídeos (soforolipídeos)	DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010
<i>Candida glabrata</i> UCP1002	Resíduos de indústrias de óleos vegetais	Não identificado	GUSMÃO et al., 2010

Fonte: Autoria própria

Até o presente momento, de acordo com a literatura consultada, somente Portilla-Rivera et al. (2007) relataram a produção de biossurfactantes utilizando o hidrolisado hemicelulósico da biomassa vegetal, porém o agente fermentador foi *Lactobacillus* sp., uma bactéria. Recentemente, Faria et al. (2014) e Faria et al. (2015) relataram a produção de biossurfactantes do tipo MEL por *Pseudozyma* em meios semi-sintéticos utilizando xilose, arabinose, mistura

xilose/glicose e xilana purificada como fontes de carbono. Sendo assim, é possível afirmar que ainda não há dados na literatura que apresentam a utilização de hidrolisado hemicelulósico proveniente do bagaço de cana-de-açúcar por leveduras para a produção de biossurfactantes. Estudos nesse sentido são importantes de serem desenvolvidos, pois, incentivam a adoção de matérias-primas mais baratas nos bioprocessos, além de implicarem diretamente na consolidação das biorrefinarias lignocelulósicas, propondo mais um modelo de produto de alto valor agregado.

2.5. Mecanismos de biossíntese de biossurfactantes por leveduras

Na produção de biossurfactantes por leveduras têm-se principalmente a biossíntese de glicolipídeos, complexos carboidrato-proteína-lipídeo ou surfactantes poliméricos, visto que estas vias metabólicas microbianas, principalmente em eucariotos, já são bem esclarecidas. Devido a isso, no presente trabalho, somente as vias biossintéticas de glicídios e lipídeos componentes dos biossurfactantes serão abordadas.

As vias metabólicas utilizadas pelas leveduras para a produção de biossurfactantes são variadas, pois dependem fundamentalmente da natureza da(s) fonte(s) de carbono utilizada(s) no meio de cultivo. Por exemplo, quando se utiliza carboidrato como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de glicolipídeo, o fluxo de carbono é regulado de tal forma para que ambas as vias, lipo e glicogênicas, sejam especialmente supridas no metabolismo microbiano. Isto ocorre já que as moléculas de biossurfactantes, no caso, os glicolipídeos, apresentam estrutura dual, formada por açúcares e lipídeos (FONTES et al., 2008).

Para melhor rendimento na biossíntese de biossurfactantes é comum combinar duas fontes de carbono com diferentes polaridades nos meios de cultivo, assim, uma fração do substrato polar é utilizada primeiramente pelo microrganismo para o crescimento e manutenção celular e, posteriormente, na síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto que o substrato apolar é utilizado exclusivamente para a produção da porção apolar do biossurfactante (WEBER; DOGE; HAUFÉ, 1992).

No catabolismo de fontes de carbono polares, como carboidratos (glicose e pentoses), glicerol ou outros, são gerados gliceraldeído-3-fosfato e glicose-6-fosfato, metabólitos chaves, pois, atuam também como precursores na via gliconeogênica dos carboidratos componentes da porção polar do biossurfactante. Na gliconeogênese, o processo é bastante semelhante ao

inverso da via glicolítica, visto que as reações que levam piruvato à glicose-6-fosfato são essencialmente inversas às da glicólise, com exceção de duas reações irreversíveis, a conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato e a hidrólise de frutose-1,6-difosfato a frutose-6-fosfato, que exigem um contorno e são catalisadas, respectivamente, pelas enzimas piruvato carboxilase e hexose-difosfatase (Figura 14). Porém, estas mesmas fontes de carbono, após seu catabolismo, também produzem metabólitos intermediários importantes na síntese dos componentes da porção apolar, lipídica ou hidrocarbônica, do biosurfactante.

Os carboidratos e/ou glicerol, após as oxidações que ocorrem nas vias glicolítica ou das pentoses monofosfatadas, produzem o piruvato. Por meio de uma reação de descarboxilação oxidativa, o piruvato é convertido em acetil-CoA, metabólito chave, pois é produto de degradação e atua nas sínteses de ácidos graxos. O acetil-CoA une-se ao oxaloacetato, como estratégia de transporte pelos compartimentos intracelulares (membranas da mitocôndria). No citosol, o acetil-CoA é regenerado, e posteriormente, reagindo com ânions bicarbonato, forma o malonil-CoA, outro metabólito chave na síntese de ácidos graxos constituintes dos lipídeos (Figura 15) (FONTES et al., 2008).

Figura 14 - Esquema simplificado da Gliconeogênese – percurso central da síntese de carboidratos a partir de metabólitos intermediários do catabolismo de carboidratos e lipídeos

Fonte: Autoria própria

Figura 15 - Esquema simplificado da lipogênese em células eucarióticas – síntese de ácidos graxos a partir de metabólitos intermediários do catabolismo de carboidratos e lipídeos

Fonte: Autoria própria

No catabolismo de fontes de carbono apolares, como triacilglicerídeos, também são gerados metabólitos intermediários utilizados pelo microrganismo nas vias lipo e gliconeogênicas, para a síntese tanto da parte polar, glicídica, do biossurfactante, como para a parte apolar, lipídica. Para a produção dos açúcares a via gliconeogênica é ativada, e as moléculas de acetil-CoA ou propionil-CoA provenientes da β -oxidação dos ácidos graxos, constituintes dos lipídeos, tornam-se os metabólitos chaves da via biossintética (FONTES et al., 2008). Na lipogênese, as moléculas de acetil-CoA ou propionil-CoA também serão utilizadas como precursores da síntese de ácidos graxos através dos mecanismos descritos anteriormente.

Na Figura 16 encontra-se um esquema simplificado da integração entre as vias catabólicas das fontes de carbono (carboidratos e lipídeos) e as anabólicas de biossurfactantes em leveduras.

Figura 16 - Esquema simplificado da integração metabólica mostrando o metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biosurfactante a partir da utilização de carboidratos como substratos

Fonte: Adaptado de FONTES et al., 2008

É válido salientar que os substratos hidrofóbicos são indutores da biossíntese de biosurfactantes, já que a adição destes ao meio de cultivo estimula a produção, sendo utilizados como estratégia na produção destes compostos e sendo considerado como uma forma de regulação da biossíntese (DESAI; DESAI, 1993). Tulloch e colaboradores (1963) observaram que a adição de ácidos graxos de cadeias longas, hidrocarbonetos ou glicerídeos nos cultivos de *Torulopsis magnoliae* aumentou a produção de trealose-lipídeos. Em estudos com *Candida* spp., Fukui e Tanaka (1981) e Cirigliano e Carman (1984) observaram que a presença de n-alcenos no meio fez com que se aumentasse a secreção de biosurfactantes, mas o mesmo não foi notado em experimentos onde os meios continham apenas carboidratos como fontes de carbono.

As fontes de nitrogênio também desempenham papel de destaque na biossíntese de biosurfactantes por leveduras, pois são essenciais para a síntese de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas que regem todo o metabolismo microbiano (FONTES et al., 2008).

Porém, pouco se sabe sobre o metabolismo de nitrogênio por leveduras na produção de biossurfactantes.

Em estudos sobre a assimilação de compostos nitrogenados em fermentação alcoólica, pôde-se observar que apesar das leveduras possuírem um rápido sistema de transporte transmembranas para peptídeos (a melhor assimilação dá-se até tripeptídeos), este ainda é menos significativo que o dos aminoácidos. Outro fato importante, é que os aminoácidos não são diretamente incorporados pelas células leveduriformes, necessitando sofrer transaminação para serem absorvidos (CRUZ, 2007). Somente o teor de lipídeos no meio de cultivo influencia a velocidade de absorção, conforme constatado por Anderson et al. (2002).

Ainda sobre a absorção de aminoácidos, Jones e Pierce (1964), revelaram que este fenômeno se dá de uma maneira ordenada, seguindo a seguinte classificação:

- **Grupo I:** arginina, lisina, serina, treonina, glutamina, asparagina, ácidos glutâmico e aspártico;
- **Grupo II:** valina, metionina, isoleucina, leucina e histidina;
- **Grupo III:** glicina, alanina, tirosina, fenilalanina, triptofano;
- **Grupo IV:** prolina.

Na produção de biossurfactantes sabe-se que essa fonte macronutriente é utilizada estrategicamente como fator limitante do bioprocessamento e de regulação da biossíntese, pois segundo Albrecht et al. (1996), esta condição causa um declínio na atividade da enzima isocitrato desidrogenase, responsável pela oxidação do isocitrato a α -cetoglutarato no ciclo de Krebs. Isto desencadeia acúmulo de isocitrato e, conseqüentemente, citrato nas mitocôndrias, ambos são transportados até o citosol, onde o citrato é clivado pela citrato sintase, originando acetil-CoA, que é o metabólito precursor da síntese de ácidos graxos, como visto anteriormente, e assim, aumentando a produção do biossurfactante.

Quanto a suplementação mineral, a adição destes micronutrientes nos cultivos para a obtenção de biossurfactantes, geralmente cátions divalentes, nos meios de cultivo, favorece a biossíntese, por serem cofatores de várias reações enzimáticas (FONTES, 2008).

Assim, pode-se constatar que a produção biotecnológica de biossurfactantes é regulada por fatores nutricionais, ambientais e intrínsecos de cada microrganismo. O presente trabalho apresenta-se como inovador de acordo com o contexto de sustentabilidade consolidando a obtenção de um produto nobre no conceito de biorrefinaria.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

Selecionar leveduras capazes de produzir biossurfactantes em meios de cultivo suplementados com hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, estudando a produção, a caracterização física, química e biológica do composto produzido pela levedura selecionada.

3.2. Específicos:

- Selecionar leveduras potenciais para a produção de biossurfactantes em meios de cultivo suplementados com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar;
- Verificar as propriedades emulsificantes e de superfície ativa dos biossurfactantes produzidos utilizando testes de índice de emulsificação, atividade e estabilidade emulsificante e colapso da gota;
- Determinar o tipo de biossurfactante produzido pelas leveduras em meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico e xilose como única fonte de carbono;
- Testar o potencial larvicida frente a *Aedes aegypti* dos biossurfactantes produzidos por algumas leveduras em meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico;
- Selecionar a melhor levedura produtora de biossurfactante em meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e caracterizar físico-química e estruturalmente o composto produzido;
- Otimizar a produção de biossurfactantes pela levedura selecionada em meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar por planejamentos fatoriais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em três etapas, conforme pode ser observado na Figura 17, a qual descreve de forma simplificada todas as principais atividades envolvidas.

Figura 17 - Fluxograma das etapas envolvidas no presente trabalho

Fonte: Autoria própria

1ª ETAPA

4.1. Obtenção e concentração do hidrolisado hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado utilizado no presente trabalho foi gentilmente cedido pelas alunas de doutorado Kelly Dussan Medina e Adrina Dillon. A hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em um reator de aço inox (AISI 316) com volume útil de 350 L, aquecido indiretamente por resistência elétrica por meio de uma camisa de óleo. O reator foi operado em regime descontínuo, empregando-se as seguintes condições de hidrólise: uma proporção entre massa seca de bagaço de cana de açúcar e ácido sulfúrico concentrado (98 %) de 1:10 (100 mg de ácido : 1 g de bagaço), temperatura de 121 °C, tempo de reação de 10 minutos, agitação de 50 rpm e pressão de 180 kPa.

Após a hidrólise, os resíduos sólidos constituídos de celulignina foram separados do líquido por filtração e o hidrolisado hemicelulósico foi transferido e armazenado em bombonas plásticas de 50 L em câmara refrigerada a 4 °C.

O hidrolisado foi concentrado em um concentrador à vácuo (SPENCER SCIENTIFIC) de 28 L de capacidade, a 70 °C e operado de forma descontínua até uma redução do volume a 20 % do volume inicial, e por fim, armazenado em câmara refrigerada a 4 °C.

4.2. Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico

O hidrolisado concentrado foi submetido ao processo de destoxificação química, conforme proposto por Alves e colaboradores (1998), para a remoção de compostos que podem inibir o crescimento microbiano e afetar o processo fermentativo, quando este for utilizado como fonte nutricional. Em um primeiro momento, o pH do hidrolisado foi elevado para 7,0 com a adição gradual de óxido de cálcio, e em seguida, reduzido para pH 5,5, com ácido fosfórico concentrado. Posteriormente, foi adicionado ao hidrolisado 2,5 % (m/V) de carvão ativado e este foi incubado em agitador orbital a 30 °C por 60 minutos para a adsorção de compostos inibidores. Entre as etapas de alteração do pH e a adsorção do carvão ativado, o hidrolisado foi filtrado a vácuo, com o auxílio de uma bomba (TECNAL TE-0581), para a remoção dos precipitados formados e do carvão.

4.3. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar

As concentrações dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), furanos (furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido furóico), saponinas e compostos fenólicos totais presentes no hidrolisado hemicelulósico, antes e após o processo de destoxificação, foram quantificadas, respectivamente, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Cromatógrafo AGILENT TECHNOLOGY 1200 SERIES) e espectrofotometria UV-Vis (Espectrofotômetro BIOSPECTRO 200), após diluições prévias das amostras.

Para a determinação de açúcares, as amostras foram previamente filtradas em uma coluna Sep Pack C18 (WATERS C18 CLASSIC) para a retirada de impurezas e células. As análises foram realizadas em HPLC equipado com uma coluna aminex HPX-87H (BIO-RAD) (300 x 7,8 mm), a 45 °C, utilizando-se uma solução de ácido sulfúrico 0,01N como eluente, um fluxo de 0,6 mL/min e detecção por índice de refração (RID 6A). Foram injetados 20 µL de amostras.

Na determinação dos furanos, as amostras foram filtradas em uma membrana de 0,22 µm (MILLIPORE). As análises foram realizadas em HPLC equipado com uma coluna zorbax eclipse plus C18 (4,6 x 100 mm) (AGILENT), a temperatura ambiente e uma mistura de 11 % acetonitrila : 88 % água : 0,1 % ácido acético como eluente, com um fluxo de 0,8 mL/min e detecção por módulo de análise em comprimento de onda ultravioleta (276 nm). Foram injetados 20 µL de amostras.

Para a determinação de compostos fenólicos e saponinas totais, utilizou-se os métodos espectrofotométricos, respectivamente descritos por Singleton e Rossi (1965) e Vigo e colaboradores (2003).

A determinação do pH e a condutividade do hidrolisado, antes e após a destoxificação, foi realizada por potenciometria e condutimetria, em um potenciômetro (GEHAKA CG 1800).

Para a detecção da presença de possíveis xilo-oligômeros no hidrolisado hemicelulósico foi realizada uma cromatografia em camada delgada (TLC), de acordo com o protocolo de Puchart e Biely (2008). Utilizou-se placas de sílica gel 60 F254 (Merck) empregando como solvente uma mistura de acetato de etila:ácido acético:propanol:ácido fórmico:água (25:10:5:1:15) de acordo com o procedimento de Puchart e Biely (2008). As amostras e padrões foram colocados a 1 cm da parte inferior da placa através de aplicações de 1,0 µL. Uma cuba com tampa foi utilizada para acondicionar o solvente e a placa e a placa foi colocada na posição

vertical. A revelação das amostras foi realizada pela aplicação de uma solução reveladora (dissolvendo-se 1,8 g diidrocloreto de N-(1-Naftil)-etilenodiamina em 200 mL de etanol e, sob agitação constante, foi adicionado lentamente 20 mL de ácido sulfúrico concentrado) e seca em estufa a 100°C por aproximadamente 5 min.

Todas as análises para a caracterização dos hidrolisados foram realizadas em triplicada.

4.4. Microrganismos

Das 30 leveduras selvagens pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (EEL/USP) usadas nas seleções, algumas foram gentilmente cedidas pelos Prof. Dr. Carlos A. Rosa (UFMG) e Prof. Dr. Fernando Pagnocca (UNESP – Campus Rio Claro). Estas estirpes foram isoladas de troncos de madeira em decomposição, exoesqueletos e intestino de insetos, em formigueiros e outros diversos ecossistemas do território nacional. Enquanto outras leveduras foram obtidas através de bancos internacionais de microrganismos como a ATCC (*American Type Culture Collection*), NRLL (*Northern Regional Research Laboratory*) e CCTCC (*China Center for Type Culture Collection*).

Na Tabela 9 encontram-se relacionadas às espécies e linhagens que compõem a coleção de microrganismos do Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (EEL/USP).

Tabela 9 - Relação de leveduras e códigos utilizados para a identificação

Espécie	Linhagem	Código
<i>Candida shehatae</i>	22-BR-2AY	SSS01
<i>Trichosporon mucoides</i>	CLM 21.1	SSS02
<i>Trichosporon mucoides</i>	CLM 41.1b	SSS03
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	CLM 51.2a	SSS04
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	Y1'b	SSS05
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CCTCC M 206098	SSS06
<i>Spathaspora xylofermentans</i>	UFMG-HMD-25.1	SSS07
<i>Issatchenkia orientalis</i>		SSS08
<i>Candida shehatae</i>	CGB-8BY	SSS09
<i>Scheffersomyces ofunaensis</i>	R.C.2	SSS10
<i>Trichosporon mucoides</i>	CLM 42.4	SSS11
<i>Candida guilliermondii</i>	FT20037	SSS12
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	UFMG-HM-52.2	SSS13
<i>Spathaspora arborarie</i>	UFMG-HM-19.1A	SSS14
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	UFMG-HM-60.1b	SSS15
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	Y1'a	SSS16
<i>Candida shehatae</i>	PT1-1BASP	SSS17
<i>Scheffersomyces illinoensis</i>	UFMG-IMH-43.2	SSS18

Continua...

...Continuação		
<i>Issatchenkia occidentalis</i> sp.		SSS19
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	CCTCC M 206097	SSS20
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	M1	SSS21
<i>Spathaspora roraimanensis</i>	UFMG-XMD-23.2	SSS22
<i>Spathaspora suhii</i>	UFMG-HMD-16.3	SSS23
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		SSS24
<i>Spathaspora brasiliensis</i>	UFMG-HMD-19.3	SSS25
<i>Spathaspora suhii</i>	UFMG-XMD-16.2	SSS26
<i>Candida shehatae</i>	BR6-2AI	SSS27
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	NRRL-Y7124	SSS28
<i>Trichosporon mucoides</i>	CLM 48.1b	SSS29
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	Y3'	SSS30

Fonte: Autoria própria

4.5. Manutenção dos microrganismos

As cepas foram mantidas em meio YMA (Yeast Malt Agar) sólido (contendo g/L: 3 extrato de levedura, 3 extrato de malte, 5 peptona, 10 glicose e 10 ágar) foram repicadas e incubadas por 48 horas em estufa bacteriológica (FANEM 502) a 30 ± 2 °C. A pureza dos isolados foi verificada de forma visual para a detecção de contaminação por fungos filamentosos e microscópica, por testes de coloração de GRAM (CECCATO-ANTONINI, 2010), para a detecção de possível contaminação por bactérias.

4.6. Seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes em meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não-destoxificado (HND) e destoxificado (HD) e em meio sintético contendo xilose (SX)

4.6.1. Preparo dos meios de cultivo e fermentação

Para a produção de biossurfactantes pelas leveduras nos meios de cultivos HND, HD e SX utilizou-se o meio basal proposto por Kitamoto (1990) com modificações (contendo g/L: 40 xilose, 2 fosfato monobásico de potássio, 11 nitrato de amônio e 2 sulfato de magnésio heptahidratado). As fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes foram autoclavadas a 111 °C, 0,5 atm por 15 minutos e separadamente, para que não ocorresse reação de *Maillard* e precipitações, tornando os nutrientes indisponíveis para o consumo dos microrganismos. Após

o resfriamento, foram misturadas nas proporções ideais e o pH ajustado para 5,0 – 5,6 de forma asséptica.

Para as fermentações foram utilizados frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio, mantendo a relação de 20 % ar/meio no recipiente. Para o preparo do pré-inóculo, os microrganismos foram transferidos das placas de manutenção para frascos Erlenmeyers com o meio SX com o auxílio de uma alça de platina e incubados em agitador orbital (QUIMIS Q816M20) a 200 rpm e 30 °C por aproximadamente 68 horas.

Posteriormente, os cultivos foram interrompidos e centrifugados (Centrífuga clínica SPENCER com ângulo fixo), de forma asséptica, a 3000 rpm para separação da biomassa e o caldo de fermentação. Os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em solução salina fisiológica de NaCl 0,9 % (m/V). Após diluições adequadas, o inóculo foi ajustado com o auxílio de uma escala *Mc Farland* modificada para leveduras (LEVI, 2003), inoculando-se aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células/mL nos frascos Erlenmeyer com os meios SX, HND e HD. As fermentações foram realizadas em agitador orbital a 200 rpm e 30 °C por aproximadamente 68 horas. Todas as fermentações foram realizadas em triplicata e com um conjunto de 3 controles negativos (meio de cultivo não-inoculado).

Transcorrido o tempo de incubação, as fermentações foram interrompidas e centrifugadas a uma rotação de 3000 rpm por 10 min, separando-se assim, os sobrenadantes utilizados nos testes de colapso da gota, índice de emulsificação (I.E.) e estabilidade emulsificante (E.E.) para verificar a produção e as características tensoativas e emulsificantes dos biossurfactantes produzidos.

4.6.2. Teste do colapso da gota (C.G.)

No teste do colapso da gota, cerca de 300 µL de sobrenadante obtido de cada amostra foram inoculados separadamente em "poços" (com 5 cm de diâmetro) de placas plásticas, previamente preenchidos com 5,0 mL de água e 10 µL de óleo residual de motor automotivo, em temperatura ambiente. Após 10 minutos de reação o resultado foi determinado visualmente. Quando houve o espalhamento ou “colapso” da gota de óleo, pode-se visualizar a desintegração do halo escuro formado pelo óleo e o resultado foi considerado positivo. Os controles positivos foram preparados utilizando-se soluções de detergente comercial a base de alquilbenzeno sulfônico linear e lauril éter 1% e dodecil sulfato de sódio (SDS) 1 %, com diluições de 10^{-2} e 10^{-3} . Os controles negativos foram água e o próprio meio de cultivo não-inoculado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.3. Teste de atividade β -hemolítica (A.H.)

Para a determinação da atividade tensoativa, as leveduras também foram cultivadas em meio SX suplementado com ágar-sangue. Nas placas de Petri com o meio para a reação de β -hemólise foram inoculados 20 μ L de células das leveduras ressuspendidas em solução salina estéril. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 30 °C por 72 horas. Nos testes positivos para a atividade hemolítica, sugerindo a presença de biossurfactantes, observou-se a presença de halo amarronzado. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.6.4. Determinação do índice de emulsificação (I.E.)

A determinação do índice de emulsificação nos sobrenadantes foi realizada de acordo com uma adaptação da metodologia descrita por Chen e colaboradores (2007), onde 1,0 mL do sobrenadante foi misturado com 1,0 mL de querosene e submetido a agitação de 9000 rpm em vórtex (PHOENIX AP56) por 1 minuto. O I.E. foi expresso em porcentagem (%) entre a razão da altura da camada emulsiva pela altura total da coluna do líquido de acordo com a Equação:

$$\text{I. E.} = \frac{\text{altura da camada emulsificada}}{\text{altura total do líquido}} \times 100\%$$

4.6.5. Determinação da estabilidade emulsificante (E.E.)

A estabilidade das emulsões foi avaliada por meio da repetição do cálculo do índice de emulsificação (I.E.) (item 4.6.4) em diferentes tempos para verificar se houve perda da estabilidade emulsificante dos biossurfactantes. Os tempos para a reavaliação do I.E. para os cálculos de estabilidade foram de 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a primeira medição. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.6. Caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras nos meios SX e HD e quantificação dos biossurfactantes do tipo glicolípídeo

Para a caracterização dos biossurfactantes presentes nos sobrenadantes, utilizou-se a metodologia proposta por Pinzon e colaboradores (2009) para a detecção de glicolípídeos. O sobrenadante teve seu pH ajustado até aproximadamente 8,0 e cerca de 1 mL do mesmo foi submetido a uma extração com 4 mL clorofórmio, 15 μ L de tampão borato (50 mmol/L) e 200 μ L de solução de azul de metileno (1,0 g/L). A fase orgânica foi coletada e a presença de coloração azul confirmou a presença de biossurfactantes do tipo glicolípídeo. Os testes foram realizados em duplicata.

Posteriormente, para a extração dos glicolípídeos biossurfactantes, seguiu-se o protocolo proposto por Kuiper et al. (2004) e Smyth et al. (2010a, 2010b), onde aproximadamente 3 mL dos sobrenadantes de cada fermentação foram separados, acidificados com uma solução de ácido clorídrico pH 2,0, e mantidos sob refrigeração a 4 °C por aproximadamente 12 horas.

Ao sobrenadante acidificado adicionou-se 9 mL de acetato de etila (em 3 séries de 3,0 mL) agitando-se vigorosamente em funil de separação e descartando-se a fase aquosa. Para a quantificação dos glicolípídeos, a fase orgânica foi evaporada a 50 °C em rotaevaporador e, então, o extrato bruto, foi solubilizado em 3 mL de tampão fosfato 0,01 mol/L - pH 7,0.

Após a diluição adequada de cada amostra, o teor de glicolípídeos biossurfactantes produzidos por cada cepa foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico para a quantificação de açúcares totais (DUBOIS; GILES; HAMILTON, 1956). A curva padrão do método foi realizada com padrão de glicose. Foram preparados controles para se descontar a influência dos meios não-inoculados nas reações de fenol-ácido sulfúrico.

Durante o processo de extração, alguns biossurfactantes cristalizaram sendo então submetidos a análises químicas espectrofotométricas, cromatográficas, espectroscópicas e de difração de raios X a fim de verificar a pureza e a natureza desses cristais.

Nos cristais foram realizados os testes para detecção de açúcares totais (DUBOIS et al., 1956), redutores (MILLER, 1959), lipídeos totais (IZARD; LIMBERGER, 2003) e proteínas totais (BRADFORD, 1976).

Para as cromatografias de camada delgada (TLC), cerca de 10 mg dos cristais foram dissolvidos em 5,0 mL de acetato de etila. Nas corridas cromatográficas utilizou-se placas de sílica gel 60 F254 e o sistema de solvente hexano:acetato de etila (7:3, V/V) (KUIPER et al., 2004; SMYTH et al., 2010a; 2010b). Foram aplicados 2,0 μ L da solução de cristais nas placas

e essas submetidas ao sistema solvente numa cuba de vidro tampada e em capela de exaustão. Após o fim da corrida cromatográfica, as placas foram secas a temperatura ambiente e impregnadas com o reagente ácido de p-anisaldeído sulfúrico (uma mistura de 0,5 mL de p-anisaldeído, 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 9,0 mL de etanol absoluto). As placas foram incubadas em estufa à 100 °C por 15 – 20 min até o aparecimento de *spots* rosados/avermelhados indicativos da presença de glicolipídeos.

Nas análises de espectroscopia na região do infravermelho (PERKIN ELMER – SPECTUM) os cristais foram secos em estufa a 40 °C por 24 horas e cerca de 10 mg dos mesmos foram incorporados ao brometo de potássio grau espectroscópico utilizando mecanismo de alta pressão para produção de pastilhas. As amostras foram analisadas entre 500 – 4000 cm^{-1} e com uma varredura de 40X.

A difração de raios X foi realizada nos cristais secos e pulverizados. Utilizou-se um difratômetro de raios X (PANanalytical – EMPYREAN) com radiação CuK – α e medidas no intervalo angular (2θ) de 10 – 80 °, com um passo de 0,02 ° e tempo de contagem de 20 seg.

A hidrólise e identificação da fração glicídica dos cristais foi realizada de acordo com a metodologia de Morita et al. (2009). Cerca de 10 mg dos cristais foram submetidos a uma hidrólise ácida em meio metanólico, a temperatura ambiente por 12 horas. A reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL de água deionizada. O pH foi então ajustado a 7,0 com a adição de solução de bicarbonato de sódio. O hidrolisado teve então seu conteúdo glicídico analisado por HPLC conforme o item 4.3.

4.7. Testes para a avaliação do potencial larvicida contra *Aedes aegypti* de alguns biossurfactantes produzidos pelas leveduras em meio HD

Para os testes de avaliação do potencial larvicida dos biossurfactantes produzidos em meio HD, foram selecionados aleatoriamente os compostos produzidos pelas leveduras SSS1, SSS5, SSS6, SSS13, SSS18, SSS28 e SSS29. O extrato bruto obtido após a extração, conforme detalhado no item 4.6.6 foi filtrado em membranas de 0,2 μm (MILLIPORE) para evitar a contaminação bacteriana durante os testes.

Os testes com as larvas foram realizados no laboratório de entomologia na Universidade Estadual Paulista (Campus Rio Claro) sob a coordenação do Prof. Dr. Cláudio Von Zuben e do doutorando Vinicius Luiz da Silva. Os exemplares de *A. aegypti* foram cedidos pelo Centro de

Controle de Zoonoses da cidade de Santa Bárbara D'Oeste, São Paulo, Brasil, ainda em estágio larval. As larvas no 3º estágio de desenvolvimento emergiram após aproximadamente 3 – 4 dias da postura dos ovos e eram então alimentadas com ração para peixes.

Os testes a fim de verificar o potencial larvicida dos glicolípídeos frente a *A. aegypti* foram realizados em frascos de 50 mL com 20 mL da solução a ser avaliada. Os frascos foram tampados com tampas de rosca furadas permitindo a passagem de ar para os mesmos. Tais reservatórios receberam 10 larvas cada um e os ensaios foram realizados em duplicata. As soluções avaliadas foram os controles (água mineral e meio de cultivo não-inoculado) e o biossurfactante glicolípídico semi-purificado numa concentração de 1000 mg/L. Durante os testes, os frascos contendo as larvas foram mantidos em uma câmara climatizada à 27 ± 2 °C, com um fotoperíodo de 12 horas. A cada 24 horas foram realizadas contagens dos indivíduos ainda vivos.

O biossurfactante que exibiu melhor efeito larvicida teve sua eficiência testada novamente, porém, utilizando concentrações de 1000, 800, 400, 200, 100 mg/L. As condições experimentais foram as mesmas relatadas anteriormente. Após o experimento, com os dados do número de larvas vivas em cada concentração estimou-se a concentração letal do biossurfactante sob as larvas.

As larvas mortas, ainda úmidas, foram submetidas a microscopia óptica (microscópio binocular LABO com câmera digital acoplada) para a verificação da morfologia.

2ª ETAPA

4.8. Estudo cinético da produção de biossurfactante pela levedura *Trichosporon mucoides* CLM 42.4 (SSS11) em meio HD

O estudo cinético da produção do biossurfactante pela levedura SSS11 foi realizado em meio HD. O preparo do meio de cultivo e o pré-inóculo foram realizados conforme relatado no item 4.6.1. Nas fermentações foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 1 L com 200 mL de meio HD, mantendo a relação de 20 % meio/ar e inoculou-se aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células/mL de acordo com a escala *Mc Farland*. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 200 rpm e 30 °C por 144 horas. Todas as fermentações foram realizadas em triplicata e com um conjunto de 3 controles negativos (meio de cultivo não-inoculado). Foram retiradas alíquotas de 2,0 mL nos tempos de 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas.

As alíquotas coletadas foram centrifugadas a uma rotação de 3000 rpm por 10 min, separando-se os sobrenadantes e a biomassa.

Nos sobrenadantes foram analisados:

- a concentração de xilose e glicose residuais por HPLC (item 4.3);
- a concentração de biossurfactante (item 4.6.6);
- o I.E.₂₄ (item 4.6.4);
- a atividade emulsificante (A.E.) foi realizada de acordo com a metodologia modificada de Kim e colaboradores (2000), onde aproximadamente 1 mL do sobrenadante foi misturado a 1,0 mL de querosene em tubos de ensaio e agitados por 1 min, em vórtex, a 9000 rpm. A atividade emulsificante (A.E.) foi definida como a quantidade de biossurfactante necessária para aumentar a absorbância em 1 unidade emulsificante (U.E.) a 610 nm, quando comparado ao branco (JOHNSON et al., 1992). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.
- a tensão superficial (TS) pelo método da gota pendente utilizando-se 200 µL de amostra, um tensiômetro digital (*Kruss FM40 – Easy Drop*) e o software *DropShape analysis*;

Na biomassa celular analisou-se:

- o número de células totais de acordo com a escala *Mc Farland*;
- a massa celular por gravimetria, onde aproximadamente 2,0 mL da suspensão celular foi depositada em cadinhos de porcelana previamente tarados e secos em estufa a 105 °C por 24 horas. Posteriormente os cadinhos foram pesados em balança analítica (GEHAKA AG200);
- a hidrofobicidade da superfície celular foi por meio do teste MATS (microbial adhesion to solvents) utilizando clorofórmio como solvente apolar. As células retiradas em 72 horas de fermentação foram ressuspensas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) de modo que a medida de absorvância a 570 nm (A_0) fosse de aproximadamente 0,7. Essa suspensão celular (3,0 mL) foi adicionada a um tubo de vidro contendo 0,5 mL de solvente apolar e, em seguida, o tubo agitado em vortex por 50 segundos. Após 10 minutos, determinou-se a absorvância da fase aquosa a 570 nm (A). A porcentagem de hidrofobicidade foi determinada pela razão entre as absorvâncias inicial e final na fase aquosa.

Todos os testes e análises foram realizados em triplicata.

4.9. Caracterização físico-química e estrutural do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD

Na caracterização físico-química do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 foram realizados testes para a avaliação das propriedades emulsificantes com o sobrenadante da fermentação em meio HD frente a solventes orgânicos e óleos vegetais (querosene, óleo lubrificante, hexano, ciclohexano, toluol, fenol, acetato de etila e óleos de soja, girassol e canola). Os testes de I.E.₂₄ e A.E. foram realizados conforme os procedimentos relatados nos itens 4.6.5 e 4.8.

Foram feitos ainda testes de caracterização da emulsão formada entre o biossurfactante e o querosene em diferentes condições físico-químicas (temperatura, concentração de NaCl e pH) e seus efeitos mensurados por meio do I.E.₂₄ e a A.E. O efeito da temperatura foi avaliado com o resfriamento da emulsão formada entre o sobrenadante e o querosene a 4 °C e o aquecimento em banho termostático (LINDBERG BLUE M THERSCIENTIFIC) a 30, 40, 50, 60, 70, 90 e 100 °C por 15 minutos. Nos testes para verificar o efeito da salinidade adicionaram-se concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 % (m/V) do sal no sobrenadante, emulsionados com querosene. A influência do pH sobre as emulsões foi verificada por meio do emulscionamento do sobrenadante em pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12 com a adição de ácido ou base concentrada. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para a caracterização estrutural do biossurfactante produzido pela levedura SSS11, o extrato bruto obtido conforme detalhado no item 4.7.7 foi submetido a uma extração em fase sólida de acordo com o protocolo de Smyth et al. (2010a). O cartucho de sílica (STRATA – 1 g) foi condicionado com clorofórmio e o extrato com o biossurfactante foi aplicado. A eluição do biossurfactante glicolipídico foi feita com uma mistura de clorofórmio-metanol (50:50, V/V). Por fim, o biossurfactante glicolipídico purificado foi submetido a uma rotaevaporação a 50 °C para a eliminação do solvente e seco em estufa à 30 °C. A análise por espectroscopia de infravermelho do biossurfactante purificado foi realizada conforme o item 4.6.8. A espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C (VARIAN – MERCURY 300 MHz) foi feita com o biossurfactante dissolvido em clorofórmio deuterado.

3ª ETAPA

4.10. Otimização da produção de biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD: um estudo nutricional para a formulação de meios de cultivo

Para a otimização da produção do biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD também foram utilizados na suplementação dos meios, os extratos de farelo de soja (EFS) e

arroz (EFA). Para a obtenção do EFS e EFA foram preparadas suspensões de 200 g/L, autoclavadas a 1,0 atm e 121 °C por 20 min. Posteriormente, os extratos foram resfriados em temperatura ambiente e centrifugados, a 4000 rpm por 15 min, para a retirada dos sólidos.

Os extratos foram caracterizados quanto a concentração de carboidratos totais e redutores, lipídeos, proteínas, compostos fenólicos e saponinas totais, pH e condutividade conforme os itens 4.3 e 4.6.8.

A caracterização dos açúcares (xilose, glicose, sacarose, maltose e galactose) presentes nos extratos foi realizada em HPLC (AGILENT TECHNOLOGY 1200 SERIES). As amostras foram previamente diluídas e filtradas em Sep Pack C18 (WATERS C18 CLASSIC). Empregou-se uma coluna aminex HPX-87P (300 x 7,8 mm) (BIO-RAD), a 85 °C, utilizando-se água ultrapura como eluente, com um fluxo de 0,6 mL/min e detecção por índice de refração (RID 6A).

As concentrações dos furanos e alguns compostos fenólicos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido furóico, vanilina, siringaldeído, álcool vanilil e os ácidos vanilínico, siríngico, p-cumárico, ferúlico e gálico) presentes nos extratos foram determinadas por HPLC de acordo com o item 4.3.

As densidades dos extratos foram determinadas em temperatura ambiente com o auxílio de um picnometro de 50 mL.

O processo de otimização da produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 em meio HD, baseou-se, essencialmente, no estudo de fatores nutricionais para a composição de um meio de cultivo economicamente viável e com um biossurfactante com características físico-químicas desejáveis para futura aplicação industrial. A estratégia de otimização utilizou em um primeiro momento experimentos de seleção de fatores nutricionais por meio de um planejamento fatorial de *Plackett Burman* (PB) com 12 ensaios e 3 repetições do ponto central (totalizando 15 ensaios) onde as respostas foram expressas em termos de I.E.²⁴ e tensão superficial (TS). A Tabela 10 apresenta o delineamento do planejamento fatorial PB com os fatores decodificados e codificados.

Tabela 10 - Delineamento do planejamento fatorial PB com 12 ensaios e 3 repetições do ponto central (totalizando 15 ensaios) para seleção dos fatores nutricionais para a análise da produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 em meio HD

Ensaios	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁
1	6,40 (+)	0,00 (-)	1,50 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	4,00 (+)	5,00 (+)	(+)	(-)	(+)
2	6,40 (+)	10,0 (+)	0,00 (-)	5,00 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	5,00 (+)	(+)	(+)	(-)
3	0,00 (-)	10,0 (+)	1,50 (+)	0,00 (-)	2,00 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	(+)	(+)	(+)
4	6,40 (+)	0,00 (-)	1,50 (+)	5,00 (+)	0,00 (-)	4,00 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	(-)	(+)	(+)
5	6,40 (+)	10,0 (+)	0,00 (-)	5,00 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	4,00 (+)	0,00 (-)	(-)	(-)	(+)
6	6,40 (+)	10,0 (+)	1,50 (+)	0,00 (-)	2,00 (+)	4,00 (+)	0,00 (-)	5,00 (+)	(-)	(-)	(-)
7	0,00 (-)	10,0 (+)	1,50 (+)	5,00 (+)	0,00 (-)	4,00 (+)	4,00 (+)	0,00 (-)	(+)	(-)	(-)
8	0,00 (-)	0,00 (-)	1,50 (+)	5,00 (+)	2,00 (+)	0,00 (-)	4,00 (+)	5,00 (+)	(-)	(+)	(-)
9	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	5,00 (+)	2,00 (+)	4,00 (+)	0,00 (-)	5,00 (+)	(+)	(-)	(+)
10	6,40 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	2,00 (+)	4,00 (+)	4,00 (+)	0,00 (-)	(+)	(+)	(-)
11	0,00 (-)	10,0 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	4,00 (+)	4,00 (+)	5,00 (+)	(-)	(+)	(+)
12	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	(-)	(-)	(-)
13	3,20 (0)	5,00 (0)	0,75 (0)	2,50 (0)	1,00 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	2,50 (0)	(0)	(0)	(0)
14	3,20 (0)	5,00 (0)	0,75 (0)	2,50 (0)	1,00 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	2,50 (0)	(0)	(0)	(0)
15	3,20 (0)	5,00 (0)	0,75 (0)	2,50 (0)	1,00 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	2,50 (0)	(0)	(0)	(0)

X₁ - peptona bacteriológica (g/L); X₂ – extrato de levedura (g/L); X₃ – uréia (g/L); X₄ – sulfato de amônio (g/L); X₅ – nitrato de sódio (g/L); X₆ – extrato de farelo de arroz (EFA) (%); X₇ – extrato de farelo de soja (EFS) (%); X₈ – óleo de soja (baseado no teor de gorduras totais) (g/L); X₉, X₁₀ e X₁₁ – fatores inertes; (-) – níveis inferiores; (+) – níveis superiores

Fonte: Autoria própria

Após a análise do planejamento de PB onde foram selecionadas as variáveis nutricionais significativas para a produção do biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD, foi realizado um planejamento fatorial composto central rotacional (DCCR) do tipo 2⁴, incluindo 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central. A Tabela 11 apresenta o delineamento do planejamento fatorial DCCR com os fatores decodificados e codificados.

Tabela 11 - Delineamento do planejamento DCCR do tipo 2^4 com 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central para a análise da produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 em meio HD

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	7,50 (-)	7,50 (-)	4,00 (-)	4,00 (-)
2	12,50 (+)	7,50 (-)	4,00 (-)	4,00 (-)
3	7,50 (-)	12,50 (+)	4,00 (-)	4,00 (-)
4	12,50 (+)	12,50 (+)	4,00 (-)	4,00 (-)
5	7,50 (-)	7,50 (-)	8,00 (+)	4,00 (-)
6	12,50 (+)	7,50 (-)	8,00 (+)	4,00 (-)
7	7,50 (-)	12,50 (+)	8,00 (+)	4,00 (-)
8	12,50 (+)	12,50 (+)	8,00 (+)	4,00 (-)
9	7,50 (-)	7,50 (-)	4,00 (-)	8,00 (+)
10	12,50 (+)	7,50 (-)	4,00 (-)	8,00 (+)
11	7,50 (-)	12,50 (+)	4,00 (-)	8,00 (+)
12	12,50 (+)	12,50 (+)	4,00 (-)	8,00 (+)
13	7,50 (-)	7,50 (-)	8,00 (+)	8,00 (+)
14	12,50 (+)	7,50 (-)	8,00 (+)	8,00 (+)
15	7,50 (-)	12,50 (+)	8,00 (+)	8,00 (+)
16	12,50 (+)	12,50 (+)	8,00 (+)	8,00 (+)
17	5,00 (-2)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)
18	15,00 (+2)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)
19	10,00 (0)	5,00 (-2)	6,00 (0)	6,00 (0)
20	10,00 (0)	15,00 (+2)	6,00 (0)	6,00 (0)
21	10,00 (0)	10,00 (0)	2,00 (-2)	6,00 (0)
22	10,00 (0)	10,00 (0)	10,00 (+2)	6,00 (0)
23	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	2,00 (-2)
24	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	10,00 (+2)
25	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)
26	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)
27	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)

X₁ – sulfato de amônio (g/L); X₂ – extrato de levedura (g/L); X₃ – extrato de farelo de soja (%); X₄ – óleo de soja (baseado no teor de lipídeos totais); (-) – níveis inferiores; (+) – níveis superiores

Fonte: Autoria própria

As fermentações dos planejamentos fatoriais foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultivo. Todos os constituintes dos meios foram autoclavados separadamente para evitar reação de *Maillard* ou precipitações indesejadas. A concentração de xilose do hidrolisado foi ajustada para 40 g/L e o pH em 5,5, sendo estes valores fixados em todos os experimentos. Foram inoculadas aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células/mL. Os cultivos foram incubados em agitador orbital a 200 rpm e 30 °C por aproximadamente 68 horas.

Transcorrido o tempo de incubação, as fermentações foram interrompidas e centrifugadas a uma rotação de 3000 rpm por 10 min, separando-se assim, os sobrenadantes utilizados nos testes de I.E.₂₄ e TS.

Para a análise estatística dos experimentos utilizou-se os softwares *Design Expert* 6.0 (DX 6) e *Statistica* 7.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado físico-quimicamente quanto aos seus principais componentes. A Tabela 12 apresenta os resultados de alguns parâmetros físico-químicos e das concentrações dos principais componentes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado não-destoxificado e destoxificado.

Tabela 12 - Composição físico-química dos hidrolisados hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado* não-destoxificado e destoxificado

Componentes	Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar	
	Concentrado e não-destoxificado	Concentrado e destoxificado
pH	0,820	5,530
Condutividade	35,09 ± 2,31	15,23 ± 1,52
Xilose (g/L)	60,978 ± 0,220	58,764 ± 1,076
Arabinose (g/L)	3,121 ± 0,074	4,300 ± 0,053
Glicose (g/L)	3,858 ± 0,039	3,677 ± 0,076
Ácido Acético (g/L)	2,420 ± 0,033	ND*
Furanos (furfural, ácido furóico e 5-hidroximetilfurfural) (mg/L)	84,632 ± 0,003	0,123 ± 0,000
Fenóis totais (mg/L)	0,157	0,047
Saponinas (g/L)	ND**	ND**

*o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar foi concentrado aproximadamente 5X

**ND: não detectado

Fonte: Autoria própria

O pré-tratamento ácido aplicado no bagaço de cana-de-açúcar combinado com o aquecimento, visou despolimerizar a fração hemicelulósica (HENDRICKS; ZEEMAN, 2009). Observando os dados da Tabela 1, pode-se afirmar que a hidrólise teve um desempenho satisfatório, despolimerizando a hemicelulose presente no bagaço, solubilizando e fracionando seletivamente os monossacarídeos que a compõe. Os dados das análises cromatográficas mostraram que a xilose é o monossacarídeo em maior concentração nesses hidrolisados.

Também foram encontrados, porém, em menores concentrações, os monossacarídeos arabinose e glicose, já que a hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar tem em sua constituição polissacarídeos como a xiloglucana (GÍRIO et al., 2010). Na literatura, trabalhos como o de Fonseca (2009) e Chaud (2010), obtiveram resultados similares aos relatados no presente estudo, o que comprova a eficiência do processo e corrobora com a exploração dessa biomassa para pesquisas de desenvolvimento de biorrefinarias lignocelulósicas que visem aproveitar a fração hemicelulósica desse material para a obtenção de importantes *bio-based products* e *commodities*.

A TLC foi realizada para a detecção de xilo-oligossacarídeos nos hidrolisados hemicelulósicos. Não foram encontrados xilo-oligossacarídeos nos hidrolisados utilizados no presente estudo, uma vez que não foi notada a presença de *spots* abaixo dos encontrados para os padrões de xilose. A análise cromatográfica foi feita, uma vez que o processo de hidrólise da hemicelulose é parcial, não atingindo 100 % de rendimento. Assim, oligômeros presentes podem ser extraídos junto com os biossurfactantes, quando se utiliza solventes de polaridade intermediária, como o acetato de etila, ocasionando falsos positivos nas análises (QING et al., 2013).

As concentrações de ácido acético, furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) e fenóis totais nos hidrolisados hemicelulósicos também foram analisadas no presente estudo. Esses compostos influenciam negativamente o desempenho de alguns processos fermentativos, sendo considerados inibidores do crescimento microbiano devido a toxicidade que podem exibir. É interessante salientar, que essas quantidades são variáveis, pois dependem do material lignocelulósico e das condições físico-químicas do processo de pré-tratamento adotado (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; DELGENES; MOLETA; NAVARRO, 1996; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL 2000a; 2000b).

As concentrações de furanos a partir de 1 g/L, ácido acético 5 g/L e fenólicos a partir de 1 g/L, presentes em meios de cultivo nos mais variados bioprocessos podem afetar drasticamente a viabilidade celular e produtividade das fermentações (VILLA, 1998; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; 2000b; SILVA; CHANDEL, 2014). No presente trabalho, as concentrações desses compostos no hidrolisado não-destoxificado são inferiores aos níveis relatados como inibidores do crescimento e tóxicos. Além disso, podem ser considerados como indicadores de que as condições de hidrólise empregadas mostraram-se eficientes e favoráveis na solubilização dos açúcares contidos na fração hemicelulósica, ao mesmo tempo que ocasionou uma reduzida decomposição glicídica e da fração lignínica.

Quanto ao método de destoxificação empregado, pode-se verificar que o mesmo proporcionou a redução de 100 % do ácido acético, 99,850 % dos furanos e 70,060 % dos compostos fenólicos. Já as concentrações de açúcares não variaram de forma significativa com o processo de destoxificação, sendo observado um decréscimo na concentração de xilose em torno de 3 %. Resultados semelhantes foram relatados por Sarrouh (2009), Chaud (2010) e Ferreira (2010) em trabalhos com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Ainda quanto à destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, foi observada também uma perda de até 36 % do volume inicial, corroborando com os dados obtidos por Sarrouh (2009).

5.2. Seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes: avaliação do potencial emulsificante e tensoativo

Após a caracterização físico-química dos hidrolisados hemicelulósicos não-destoxificado e destoxificado, estes foram utilizados na preparação dos meios de cultivo utilizados nos experimentos de seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes.

A Tabela 13 apresenta os resultados da seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes em meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico concentrado não-destoxificado (meio HND) e destoxificado (meio HD) e em meio sintético suplementado com xilose (meio SX) como única fonte de carbono. Durante os experimentos de seleção foram avaliados parâmetros característicos das substâncias biossurfactantes, como o efeito emulsificante, por meio do índice e estabilidade emulsificante e tensoatividade, com o teste do colapso da gota.

Tabela 13 - Resultados da seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes nos meios SX, HND e HD baseando-se na avaliação das propriedades emulsificantes e tensoativas

Código das leveduras	Meio SX				Meio HND			Meio HD		
	A.H.	I.E. ₂₄ (%)	I.E. ₁₄₄ (%)	C.G.	I.E. ₂₄ (%)	I.E. ₁₄₄ (%)	C.G.	I.E. ₂₄ (%)	I.E. ₁₄₄ (%)	C.G.
SSS1	+	44,0 ± 0,0	44,0 ± 0,0	+++	27,7 ± 3,7	0,0 ± 0,0	---	46,7 ± 9,4	46,7 ± 9,4	+--
SSS2	+	20,0 ± 7,1	20,0 ± 7,1	+++	25,7 ± 1,9	0,0 ± 0,0	+--	50,0 ± 10,1	50,0 ± 10,1	+++
SSS3	+	50,0 ± 0,0	50,0 ± 0,0	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	++-	65,5 ± 1,7	65,5 ± 1,7	++-
SSS4	++	27,5 ± 3,5	27,5 ± 3,5	+++	24,6 ± 2,4	27,4 ± 1,6	+++	53,6 ± 10,2	53,6 ± 10,2	---
SSS5	-	25,0 ± 0,0	25,0 ± 0,0	+++	47,7 ± 6,9	28,3 ± 4,7	---	55,5 ± 2,3	55,5 ± 2,3	+++
SSS6	-	47,5 ± 3,5	47,5 ± 3,5	+++	45,1 ± 10,7	26,8 ± 4,5	+++	56,7 ± 4,7	56,7 ± 4,7	++-
SSS7	++	35,0 ± 7,1	35,0 ± 7,1	+++	47,5 ± 3,5	43,8 ± 1,7	-++	55,0 ± 7,1	55,0 ± 7,1	---
SSS8	+	22,5 ± 3,5	22,5 ± 3,5	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---
SSS9	+	35,0 ± 0,0	35,0 ± 0,0	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---	38,1 ± 6,7	38,1 ± 6,7	+++
SSS10	-	70,0 ± 0,0	70,0 ± 0,0	+++	45,9 ± 1,3	0,0 ± 0,0	+--	43,3 ± 4,7	43,3 ± 4,7	---
SSS11	+	50,0 ± 0,0	50,0 ± 0,0	+++	59,6 ± 4,7	52,0 ± 2,9	--+	70,3 ± 1,4	70,3 ± 3,6	--+
SSS12	+	60,0 ± 0,0	60,0 ± 0,0	++-	54,5 ± 0,7	53,3 ± 1,1	-++	69,0 ± 3,4	69,0 ± 3,4	+++
SSS13	-	55,0 ± 0,0	55,0 ± 0,0	+++	31,8 ± 4,5	0,0 ± 0,0	+++	50,0 ± 0,0	50,0 ± 0,0	+++
SSS14	+	47,5 ± 3,5	47,5 ± 3,5	+++	22,0 ± 4,2	19,3 ± 5,0	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	+++
SSS15	+	35,0 ± 7,1	35,0 ± 7,1	+++	20,4 ± 4,6	0,0 ± 0,0	+--	53,8 ± 10,9	53,8 ± 10,9	-++
SSS16	+	30,0 ± 0,0	30,0 ± 0,0	+++	28,0 ± 4,2	23,2 ± 4,5	---	43,3 ± 4,7	43,3 ± 4,7	++-
SSS17	+	50,0 ± 0,0	50,0 ± 0,0	+++	36,0 ± 4,9	29,6 ± 0,5	+++	53,3 ± 9,4	53,3 ± 9,4	+++
SSS18	+	67,5 ± 3,5	67,5 ± 3,5	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---	56,7 ± 4,7	56,7 ± 4,7	---
SSS19	++	52,5 ± 3,5	52,5 ± 3,5	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	+--	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	++-
SSS20	+	52,5 ± 3,5	52,5 ± 3,5	+++	50,0 ± 7,1	50,0 ± 7,1	+++	56,7 ± 4,7	56,7 ± 4,7	++-
SSS21	-	35,0 ± 7,1	35,0 ± 7,1	+++	40,8 ± 8,2	25,3 ± 5,7	-++	44,8 ± 2,7	44,8 ± 2,7	---
SSS22	+	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	+--	44,8 ± 2,7	44,8 ± 2,7	+--
SSS23	++	47,5 ± 3,5	47,5 ± 3,5	+++	33,5 ± 7,0	30,2 ± 2,9	+--	44,2 ± 3,5	44,2 ± 3,5	+++
SSS24	+	52,5 ± 3,5	52,5 ± 3,5	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---	42,9 ± 0,0	42,9 ± 0,0	+++
SSS25	+++	37,5 ± 3,5	37,5 ± 3,5	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---
SSS26	+	45,0 ± 7,1	45,0 ± 7,1	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---	48,1 ± 7,4	48,1 ± 7,4	+++

Continua...

...Continuação

Código das leveduras	Meio SX				Meio HND			Meio HD		
	A.H.	I.E. ₂₄ (%)	I.E. ₁₄₄ (%)	C.G.	I.E. ₂₄ (%)	I.E. ₁₄₄ (%)	C.G.	I.E. ₂₄ (%)	I.E. ₁₄₄ (%)	C.G.
SSS27	++	60,0 ± 0,0	60,0 ± 0,0	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---	60,8 ± 1,1	60,8 ± 1,1	---
SSS28	++	62,5 ± 3,5	62,5 ± 3,5	+++	16,3 ± 5,3	0,0 ± 0,0	---	43,1 ± 4,4	43,1 ± 4,4	+++
SSS29	+	40,0 ± 0,0	40,0 ± 0,0	+++	27,5 ± 3,5	0,0 ± 0,0	---	69,0 ± 3,4	69,0 ± 3,4	++-
SSS30	+++	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	+++	47,2 ± 0,0	42,3 ± 0,8	+--	60,0 ± 0,0	60,0 ± 0,0	+++
Controle	---	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	---

A.H.: atividade hemolítica; **I.E.₂₄:** índice de emulsificação após 24 horas; **I.E.₁₄₄:** índice de emulsificação após 144 horas; **C.G.:** colapso da gota

Fonte: Autoria própria

Conforme a Tabela 13, 93,33 % das leveduras cultivadas em meio SX, 86,66 % em HD e 66,66 % em HND, foram capazes de produzir biossurfactantes que emulsionaram a substância teste querosene. As leveduras cultivadas nos meios SX e HD produziram biossurfactantes com índices de emulsificação entre 20 a 70 %, estáveis por até 144 horas. Em contraste, em meio suplementado com hidrolisado não-destoxificado observou-se índices de emulsificação entre 16 a 59 % e emulsões não estáveis.

Para a determinação da tensão superficial realizada pelo teste de colapso da gota, utilizou-se como substrato apolar óleo lubrificante de motor automotivo, praticamente insolúvel em água, constituído de uma mistura de hidrocarbonetos naftênicos e parafínicos em quantidades variáveis. Nesses testes, conforme apresentado na Tabela 13, todas as leveduras cultivadas em meio SX produziram biossurfactantes capazes de reduzir a tensão superficial, por outro lado, nos meios HD 70 % e HND 60 % dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras apresentaram atividade tensoativa.

A propriedade tensoativa dos biossurfactantes também pôde ser detectada a partir do teste de β -hemólise. Nesse método observou-se a lise membranar das hemácias presentes no meio de cultivo ao interagir com substâncias surfactantes, formando halos amarronzados para resultados positivos (DEGHAN-NU; HOUSAINDOKHT; BAZZAZ, 2005). Observou-se que 80 % das leveduras cultivadas em meio suplementado com xilose são produtoras de biossurfactantes com propriedades tensoativas (Tabela 13). Os testes foram realizados apenas em meio SX, pois, a presença de compostos fenólicos e furanos oriundos do hidrolisado hemicelulósico podem causar falsos positivos.

No presente estudo, acredita-se que as diferenças entre as propriedades emulsificantes e tensoativas dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras nos meios de cultivo testados, deve-se aos íons e material particulado presentes no hidrolisado não-destoxificado, que podem ter interferido nas propriedades emulsificantes e tensoativas através da força iônica do meio (DALVIN, 2011). Tal fato pode ser comprovado ao se determinar a condutividade (propriedade físico-química relacionada a espécies iônicas) dos meios utilizados no sistema de seleção. Observou-se que em meio SX a condutividade foi de $16 \pm 2,25$ S/cm, enquanto nos meios HND e HD foram, respectivamente, $37,03 \pm 5,69$ e $16,52 \pm 0,45$ S/cm. Nos meios SX e HD, há uma baixa concentração de íons e material particulado, e consequentemente uma reduzida força iônica, fato que ocasionou uma maior estabilidade das emulsões formadas e uma maior tensoatividade, enquanto no meio HND o mesmo não foi observado por apresentar uma elevada força iônica.

Outro fato que deve ser salientado, é que nem todos os biossurfactantes apresentaram simultaneamente propriedades emulsificantes e tensoativas, como pode ser observado na Tabela 13. Essas propriedades dependem da estrutura química das substâncias em questão, mais especificamente da proporção entre suas regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (UZOIGWE et al., 2015). Os biossurfactantes com características tensoativas possuem baixa massa molar, enquanto os emulsificantes apresentam alta massa molar (SMYTH et al., 2010a; 2010b).

As elevadas estabilidades e atividades emulsificantes observadas nos biossurfactantes produzidos pelas leveduras no hidrolisado hemicelulósico destoxificado, devem-se também à relação direta que os efeitos eletrostáticos e de partículas encontradas no meio exercem no tamanho das gotículas presentes nas emulsões formadas (DALTIM, 2011). Na Figura 18, pode-se observar que as gotículas dos biossurfactantes em (A) e (B) são pequenas e uniformes. De acordo com a literatura, emulsões com gotículas menores e uniformes tendem a ter efeitos reduzidos pelos mecanismos de quebra (flotação, sedimentação e ascensão) exercidos pelo meio, que ocasionam coalescência e desestabilização, tornando-as emulsões mais estáveis (ROSEN, 2004).

Figura 18 - Micrografias ópticas das emulsões obtidas entre o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD livre de células com querosene - magnificação de 400X – (A) região com menor compactação e (B) região com maior compactação

Fonte: Autoria própria

Além dos efeitos de alguns parâmetros físico-químicos que interferem sobre as propriedades emulsionantes e tensoativas dos biossurfactantes, deve-se considerar também que o tipo de fonte de carbono utilizada nos cultivos afeta as estruturas e composições químicas e, conseqüentemente, as propriedades físico-químicas e biológicas dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras (BEDNARSKI et al., 2006).

As elevadas atividades e estabilidades emulsificantes dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras no hidrolisado hemicelulósico destoxificado revelam o destacado potencial destes compostos para uso na biorremediação de poluentes e nas indústrias de alimentos e cosméticos como agentes emulsionantes e solubilizantes. A levedura *Trichosporon mucoides* (SSS11) merece destaque por ter apresentado um I.E.₁₄₄ de 70 % e uma estabilidade constante após 144 horas de testes em meio HD.

Conforme os resultados apresentados, a inovação do presente estudo foi a prospecção de leveduras produtoras de biossurfactantes em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, pela primeira vez, é relatada a produção destes compostos por leveduras da espécie *Candida shehatae* e do gênero *Spathaspora*.

Além dos biossurfactantes, observou-se também que a levedura SSS8 (*Issatchenkia orientalis*) apresentou uma pigmentação rosada ao ser cultivada nos meios de cultivo ricos em pentoses, utilizados no presente trabalho, como pode ser observado na Figura 19. Na literatura, há relatos da produção de pigmentos do tipo carotenóides por algumas espécies de leveduras, sendo esses bioprodutos de grande interesse para as indústrias farmacêutica, médica, cosmética, de alimentos e de ração, principalmente por sua ação antioxidante. Os carotenóides apresentam um preço de mercado em torno de US\$ 400-800 e US\$1.000-2.000/kg para as formas sintética e natural, respectivamente (VALDUGA et al., 2009; MAROVA et al., 2012). A prospecção de leveduras que produzam concomitantemente biopigmentos e biossurfactantes em hidrolisados hemicelulósicos pode ser um processo de grande interesse industrial, principalmente quando se trata da consolidação das biorrefinarias lignocelulósicas multiprodutos, pois, ambos os produtos possuem alto valor agregado, sendo obtidos a partir de somente uma fermentação, sendo considerada uma estratégia para a redução dos custos do bioprocessos.

Figura 19 - Levedura SSS8 com pigmentação rosada indicando a produção de biopigmentos ao ser cultivada em meios com hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar

Fonte: Autoria própria

5.3. Caracterização parcial dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras em meio SX e HD

As 30 leveduras selecionadas nos testes de propriedades emulsificantes e tensoativas, após extração líquido-líquido com acetato de etila combinada com precipitação ácida, foram submetidas ao teste descrito por Pinzón e Ju (2009) para a detecção de biossurfactantes glicolipídicos produzidos nos meios de cultivo em que foram observados resultados promissores. Nesse método, os glicolipídeos são detectados por meio da complexação dos radicais carboxilas presentes nas estruturas dos biossurfactantes com o azul de metileno formando compostos de coloração azul (CHAYABUTRA; JU, 2001). Nos dois meios em estudo, as leveduras testadas, em sua totalidade, produziram glicolipídeos ou biossurfactantes complexos com região glicolipídica. De acordo com a literatura, as leveduras são os principais eucariotos produtores de glicolipídeos biossurfactantes. Esses microrganismos secretam principalmente soforolipídeos, manosileritritol lipídeos (MELs), celobiose lipídeos e poliol lipídeos (FONTES et al., 2008). Na literatura mais recente também há artigos que relatam a produção de xilolipídeos por leveduras (JOSHI-NAVARE et al., 2014).

Após a extração dos glicolipídeos por precipitação ácida combinada com extração líquido-líquido utilizando acetato de etila, o solvente foi evaporado e o extrato bruto foi então solubilizado em tampão fosfato pH 6,8 e mantido em repouso a aproximadamente

4 °C por 24 horas. Posteriormente, observou-se a formação de cristais em algumas amostras de biossurfactantes produzidos pelas leveduras SSS15, SSS19, SSS20 e SSS28. Em trabalhos de Hu e Ju (2001), utilizando a mesma metodologia para a separação de soforolipídeos produzidos por *Torulopsis bombicola*, o emprego de tampão fosfato na faixa de pH entre 6,0 e 7,0 favoreceu a cristalização de soforolipídeos, principalmente os de forma lactônica. Na Figura 20, podem ser observados os biossurfactantes produzidos pelas leveduras nas formas cristalizadas.

Figura 20 - Micrografias ópticas dos biossurfactantes nas formas cristalizadas produzidos pelas leveduras (A) SSS15, (B) SSS19, (C) SSS20 e (D) SSS29 em meio de cultivo HD. Os cristais analisados apresentam uma magnificação de 1000X

Fonte: Autoria própria

Visando identificar os cristais formados foram realizadas análises químicas qualitativas preliminares. Os biossurfactantes cristalizados foram submetidos a ensaios para a detecção de açúcares totais e redutores, lipídeos e proteínas totais, para verificar a pureza destes. Os testes apontaram somente a presença de carboidratos e lipídeos totais na composição dos cristais, caracterizando-os como glicolipídeos ou biossurfactantes complexos com porções glicolipídicas.

Os biossurfactantes cristalizados foram submetidos às análises por TLC, onde observou-se que os fatores de retenção (R_f) dos *spots* obtidos eram típicos de biossurfactantes glicolipídicos produzidos por leveduras (ASMER et al., 1988). Os biossurfactantes cristalizados produzidos pela levedura SSS15 apresentaram R_f 0,08 e 0,43, SSS19 R_f = 0,51, SSS20 R_f = 0,47 e 0,50 e SSS29 R_f = 0,52. Kawashima et al. (1983), Rau et al. (2005) e Bednarski e colaboradores (2006) relataram a produção de um *pool* de glicolipídeos pelas leveduras utilizadas em seus trabalhos. Tal fato, também é observado em algumas bactérias produtoras de ramnolipídeos, devido a produção de homólogos ou congêneres químicos. Nesses compostos há uma diferença estrutural na composição dos ácidos graxos, geralmente as cadeias carbônicas da fração apolar dos biossurfactantes apresentam diferentes tamanhos (SOUSA et al., 2014). Além disso, Asmer et al. (1988) relataram que TLC de soforolipídeos produzidos por *Torulopsis bombicola* num mesmo cultivo apresentam R_f menores (próximos a linha de frente da cromatoplaça) devido a forma acídica dos biossurfactantes secretados, enquanto os lactônicos apresentam R_f maiores.

Após essas análises, os cristais de biossurfactantes foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho para a determinação dos grupos funcionais presentes em suas estruturas (Figura 21).

Figura 21- Espectros de absorção na região do infravermelho dos biossurfactantes nas formas cristalizadas produzidos pelas leveduras (**A**) SSS15, (**B**) SSS19, (**C**) SSS20 e (**D**) SSS28 em meio HD

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 14, observa-se os principais picos, grupamentos funcionais e tipos de vibração encontrados na análise dos espectros de infravermelho dos biossurfactantes nas formas cristalizadas.

Tabela 14 - Bandas dos grupamentos químicos presentes nos cristais de biossurfactantes produzidos pelas leveduras em meio de cultivo HD

Bandas/picos	Tipo de vibração/Grupo de funcional
3000 – 3500 cm⁻¹	Bandas em região característica de estiramento de hidroxilas: 3500 cm ⁻¹ , estiramento ν -ROH (hidroxila); 3100 cm ⁻¹ , estiramento ν -RCOOH (carboxila).
2400 - 2500 cm⁻¹	Banda em região característica de estiramento simétrico de metileno de grupos alifáticos
1600 - 1800 cm⁻¹	Banda em região característica de estiramento de carbonila 1700 - 1750 cm ⁻¹ , estiramento ν -RC=O (carbonila)
1400 - 1500 cm⁻¹	Banda em região característica de vibração planar de carboxila e estiramento de grupos alquila
1000 – 1250 cm⁻¹	Bandas em região característica de estiramento de C – O de carbonila 1250 cm ⁻¹ , estiramento ν -RC-O (éster/lactona); 1100 - 1150 cm ⁻¹ , estiramento ν -RCOOR ou ν -R-O-R (éster/éter)

Fonte: Autoria própria

As bandas encontradas nos espectros de infravermelho mostraram que os cristais eram possivelmente de biossurfactantes glicolipídicos. Observou-se bandas de grupamentos hidroxila (3000 – 3500 cm⁻¹) e carbonila (1000 – 1200 cm⁻¹ e 1600 – 1700 cm⁻¹), presente em ésteres, lactonas e ácidos carboxílicos, e comumente encontrados em moléculas de carboidratos e lipídeos. A presença de uma banda típica de estiramento carbonila com intensidade mediana, pode ser notada em vários espectros de biossurfactantes e ésteres (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009; WADEKAR et al, 2010). De acordo com Leiterman, Sylclat e Hausmann (2008), as bandas presentes entre 1200 – 1460 cm⁻¹ representam também deformações vibracionais de ligações C – H e O – H típicas de carboidratos, os chamados *fingerprints*, as impressões digitais desses compostos. Por fim, analisando a semelhança dos espectros de infravermelho, pode-se afirmar que as leveduras SSS19, SSS20 e SSS28 produzem o mesmo tipo de biossurfactante glicolipídico.

Posteriormente os biossurfactantes cristalizados foram submetidos às análises de difração de raios X, nos quais observou-se que todas as amostras apresentam regiões cristalinas e amorfas (Figura 22). Na região dos difratogramas entre (2 θ) 10 e 55 ° pode-se observar uma elevada difração que caracteriza a cristalinidade, com intensidade acentuada de reflexão em (2 θ) 17 °, 21 ° e 32 °. Porém, a partir de (2 θ) 55 °, as amostras não apresentam difração, sendo considerada uma região amorfa. Resultados semelhantes foram verificados

por ZINI et al. (2008) em poli-soforolípídeos sintetizados quimicamente, onde a região cristalina se localizava entre (2θ) $3,6^\circ$ - $21,6^\circ$ e um aglomerado reflexivo com intensidade considerável entre (2θ) 29° - 33° , coincidindo com os valores encontrados no presente estudo. Abdel-Mawgoud et al. (2009) observaram um biossurfactante do tipo ramnolípídeo produzido por *Pseudomonas* em que mostrou a organização cristalina numa estrutura do tipo romboidal. É interessante ressaltar, que os difratogramas mostram que as leveduras testadas produzem biossurfactantes glicolípídicos com características estruturais similares.

Figura 22 - Difratogramas dos biossurfactantes nas formas cristalizadas produzidos pelas leveduras (A) SSS15, (B) SSS19, (C) SSS20 e (D) SSS28 em meio HD

Fonte: Autoria própria

Neste estudo, os biossurfactantes cristalizados também foram submetidos à uma hidrólise para a análise da composição monossacarídica, onde foram encontrados picos, em todas as amostras, referentes ao tempo de retenção ($t_r = 8,85$) da glicose. Sendo assim, pode-se dizer que os biossurfactantes produzidos pelas leveduras SSS15, SSS19, SSS20 e SSS28 em meio de cultivo HD são do tipo glicolípídeos. A presença de somente glicose na porção glicídica das moléculas pode ser um indicativo de produção de celobiose lipídeos (ácido ustilágico) ou soforolípídeos, porém, necessita-se de uma análise mais robusta, envolvendo

técnicas espectroscópicas, como RMN, para se conhecer as conformações entre as ligações glicosídicas e identificar o tipo de glicolípido produzido pelas leveduras estudadas. Esses resultados corroboram como aqueles da literatura, em que relatam a produção de biossurfactantes do tipo complexo carboidrato-lípido e glicolípido por leveduras dos gêneros *Candida* e *Issatchenkia* (KATEMAI et al., 2008).

5.4. Quantificação dos biossurfactantes glicolipídicos produzidos pelas leveduras em meio HD

Como já relatado anteriormente, o meio de cultivo HD apresentou melhores resultados nos testes de seleção de leveduras produtoras de biossurfactantes. Devido a isso, foram realizadas fermentações nessa condição a fim de quantificar os biossurfactantes glicolipídicos e a biomassa celular produzidos, pH e a xilose residual em 68 horas de cultivo. Na Tabela 15 é possível observar os dados obtidos.

Tabela 15 - Parâmetros da produção de biossurfactantes glicolipídicos pelas leveduras em meio HD

Leveduras	Biomassa celular (Log nº de células/mL)	pH final	Xilose residual (g/L)	Biossurfactante glicolipídico produzido (g/L)
SSS1	9,394	5,75 ± 0,12	2,350 ± 1,061	0,578 ± 0,002
SSS2	9,183	6,04 ± 0,03	36,865 ± 2,270	9,993 ± 0,808
SSS3	9,194	5,21 ± 0,16	5,550 ± 0,307	3,420 ± 0,273
SSS4	9,224	5,41 ± 0,06	28,805 ± 2,000	2,652 ± 0,191
SSS5	9,208	5,44 ± 0,02	21,555 ± 0,884	3,182 ± 0,337
SSS6	9,295	6,24 ± 0,01	31,915 ± 4,773	9,034 ± 0,295
SSS7	9,296	6,36 ± 0,16	33,840 ± 0,566	2,824 ± 0,398
SSS8	9,256	5,48 ± 0,09	28,055 ± 2,086	2,045 ± 0,402
SSS9	9,329	5,43 ± 0,04	3,880 ± 0,891	1,591 ± 0,149
SSS10	9,261	5,96 ± 0,01	36,330 ± 1,117	1,649 ± 0,032
SSS11	9,228	5,80 ± 0,03	0,265 ± 0,078	11,334 ± 2,169
SSS12	9,464	6,90 ± 0,00	24,670 ± 2,121	5,150 ± 0,051
SSS13	9,306	5,51 ± 0,04	19,235 ± 0,587	2,415 ± 0,233
SSS14	9,300	5,73 ± 0,26	34,155 ± 2,892	1,018 ± 0,329
SSS15	9,256	5,73 ± 0,04	25,005 ± 1,322	2,040 ± 0,135
SSS16	9,359	5,72 ± 0,06	26,500 ± 0,707	1,152 ± 0,051
SSS17	9,423	4,57 ± 0,40	0,440 ± 0,028	2,900 ± 0,015
SSS18	9,542	6,29 ± 0,30	0,275 ± 0,021	0,341 ± 0,021

Continua...

...Continuação

Leveduras	Biomassa celular (Log n° de células/mL)	pH final	Xilose residual (g/L)	Biossurfactante glicolipídico produzido (g/L)
SSS19	9,241	6,16 ± 0,10	0,215 ± 0,015	2,541 ± 0,003
SSS20	9,492	6,75 ± 0,65	33,350 ± 0,65	0,728 ± 0,329
SSS21	9,343	5,62 ± 0,04	25,420 ± 5,600	1,437 ± 0,169
SSS22	9,282	5,71 ± 0,05	27,000 ± 7,071	1,483 ± 0,003
SSS23	9,445	5,52 ± 0,19	20,125 ± 3,783	0,236 ± 0,444
SSS24	9,473	6,61 ± 0,72	40,340 ± 0,976	4,535 ± 0,006
SSS25	9,270	5,57 ± 0,77	21,605 ± 2,256	1,133 ± 0,015
SSS26	9,309	5,47 ± 0,02	21,605 ± 2,183	3,966 ± 0,530
SSS27	9,307	5,89 ± 0,06	6,700 ± 1,259	0,400 ± 0,012
SSS28	9,421	5,90 ± 0,06	4,285 ± 1,817	0,431 ± 0,009
SSS29	9,243	4,73 ± 0,02	28,250 ± 3,239	0,690 ± 0,030
SSS30	9,281	5,68 ± 0,00	23,480 ± 4,695	0,650 ± 0,012
Controle	0,000	5,00 ± 0,00	47,100 ± 0,300	0,000 ± 0,000

As linhas com caracteres em negrito apresentam as leveduras com os melhores resultados em relação aos testes de produção de biossurfactantes glicolipídicos

Fonte: Autoria própria

Conforme observado na Tabela 15, as leveduras em sua totalidade cresceram e assimilaram xilose em meio HD. Após 68 horas de cultivo, partindo-se de um inóculo com $1,0 \times 10^7$ células totais/mL, obteve-se aproximadamente 10^9 células totais/mL e o consumo de xilose variou entre 14 – 99 %. Quanto a produção de biossurfactantes glicolipídicos, observou-se uma variação na produtividade 0,0035 – 0,1667 g/L.h, sendo que as leveduras SSS2, SSS6 e SSS11 foram as melhores produtoras, com as respectivas produtividades de 0,1469, 0,1328 e 0,1667 %. De acordo com Hommel e colaboradores (1994), apesar de ser possível a biossíntese microbiana de biossurfactantes utilizando somente fontes de carbono hidrofílicas, melhores rendimentos podem ser obtidos em cultivos com fontes hidrofóbicas ou com a combinação dessas fontes. A relação entre a escolha e/ou combinação de fontes de carbono para a obtenção de biossurfactantes pode ser observada nos trabalhos de Meesters, Huijberts e Eggink (1996), que ao utilizarem glicose (100 g/L) e gordura animal (100 g/L) nos cultivos de *C. bombicola* ATCC22214, após 68 horas de fermentação, obtiveram uma produtividade de de biossurfactante 1,76 g/L.h. O mesmo foi observado por Adamczak e Bednarski (2000) ao cultivarem *C. antarctica* ATCC20509 em óleo de soja, por 144 horas, obtendo uma produtividade de 0,32 g/L.h de biossurfactante.

Ainda há poucos trabalhos que relatem a obtenção de biossurfactantes por leveduras utilizando como fonte de carbono os açúcares pentoses, mais especificamente a xilose. Joshi-Navare e colaboradores relataram a produção de um xilolípídeo por *Pichia caribbica* quando cultivada em meio sintético contendo 100 g/L de xilose, com uma produtividade de aproximadamente 0,020 g/L.h. Faria e colaboradores (2014) relataram a produção de um manosileritritol-lípídeo pela linhagem *Pseudozyma Antarctica* PYCC5048^T em meio de cultivo sintético suplementado com xilose (40 g/L) obtendo-se uma produtividade 0,016 g/L.h após 144 horas de fermentação. Em ambos os casos, os rendimentos alcançados ainda são baixos quando comparados aos valores de cultivos em fontes de carbono hidrofóbicas ou a combinação fonte hidrofóbica/hidrofílica.

Como pode ser visto, o presente trabalho inova ao produzir biossurfactantes glicolipídicos em meio suplementado com o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar apresentando rendimentos superiores aos relatados por outros autores em meios sintéticos com xilose como fonte de carbono. Deve-se salientar que os rendimentos obtidos no presente estudo não foram em condições nutricionais e operacionais otimizadas, sendo que após esse processo pode-se obter maiores rendimentos e produtos com melhores performances físico-químicas, como o aumento do I.E. e a redução da TS.

5.5. Uma potencial aplicação dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras em meio HD com atividade larvicida para o combate de larvas de *Aedes aegypti*

No presente trabalho observou-se que é possível obter os biossurfactantes como produtos alternativos de alto valor agregado nas biorrefinarias lignocelulósicas. Buscando uma aplicação diferenciada daquelas citadas na literatura, os biossurfactantes do tipo glicolípídeos produzidos pelas leveduras SSS1, SSS5, SSS6, SSS13, SSS18, SSS27 e SSS28 foram testados como larvidas contra *A. aegypti*.

Para a seleção dos biossurfactantes, numa primeira etapa, os testes foram realizados em larvas em diferentes estágios de desenvolvimento e uma concentração fixa de 1000 mg/L dos detergentes. Como pode ser observado na Figura 23, o tratamento das larvas com os biossurfactantes mostrou-se eficiente, uma vez que eliminou entre 20 – 100 % das larvas em até 96 horas de ensaios.

Figura 23 - Número de larvas de *A. aegypti* vivas em até 96 horas de exposição aos biossurfactantes. A notação Biossurfactante 1, 5, 6, 13, 18, 27 e 28 refere-se aos compostos produzidos respectivamente pelas leveduras SSS1, SSS5, SSS6, SSS13, SSS18, SSS27 e SSS28

Fonte: Autoria própria

A partir dos resultados dessa seleção, o biossurfactante produzido pela levedura SSS28, que apresentou melhor desempenho, foi utilizado em ensaio posterior, em diferentes concentrações frente as larvas de *A. aegypti* padronizadas no 3º estágio de desenvolvimento, período larval no qual há intensa atividade metabólica e maior resistência. Após 12 horas de aplicação do biossurfactante nas concentrações de 1000 e 800 mg/L observou-se que 100 % das larvas foram eliminadas, enquanto em concentrações menores não se observou morte das larvas.

Na Figura 24, observa-se as curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos em função do logaritmo decimal da concentração de biossurfactante após 24 horas de ensaio. A intersecção das curvas revelou a chamada concentração letal 50 % (CL_{50}) do composto (concentração na qual cinquenta por cento das larvas testadas morrem) (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993). Para o biossurfactante testado a Log da Concentração encontrada foi bem próxima a 2,82, correspondente a CL_{50} de 800 mg/L.

Figura 24 - Estimativa da CL_{50} do biossurfactante produzido pela levedura SSS28 em meio de cultivo com hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono em ensaios com larvas de *A. aegypti*

Fonte: Autoria própria

A ação larvicida e mosquitocida dos biossurfactantes em *A. aegypti* vem sendo relatada por alguns autores, como Geetha et al. (2012) e Silva et al. (2015). De acordo com Christophers (1960), a interação dos biossurfactantes com o sifão respiratório, região altamente hidrofóbica com umidade controlada, permite uma exposição maior ao meio aquoso, e assim, a água flui pela cavidade espiracular das larvas. Além disso, as bolsas de ar traqueais, que apresentam uma gravidade específica muito próxima da água, facilitando a subida até a superfície para respiração, são influenciadas pela presença das substâncias surfactantes, alterando e dificultando a hidrostática da larva, levando a um exacerbado gasto energético e morte por afogamento (Figura 25).

Figura 25 - Ação dos biossurfactantes produzidos por leveduras em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar em larvas e pupas de *A. aegypti*. **(A)** Experimento sem a aplicação do biossurfactante e **(B)** Experimento 24 horas após a aplicação do biossurfactante

Fonte: Autoria própria

Porém, como pode ser observado na Figura 26, as larvas após 12 horas em contato com o biossurfactante nas concentrações de 1000 e 800 mg/L, também sofreram uma desestruturação. Os corpos das larvas apresentaram uma transparência e pareciam mais finos. Com 36 horas de testes, os corpos das larvas se desfizeram totalmente.

Nos testes com concentrações menores que 800 mg/L de biossurfactante, não foi verificada a morte das larvas em até 96 horas de teste. Observou-se o empupamento de algumas larvas entre 36 e 48 horas de teste, porém, as pupas resultantes apresentaram uma motilidade reduzida quando comparadas àquelas dos ensaios controles e um aspecto esbranquiçado.

Ainda não foram realizados estudos que elucidem a ação dos biossurfactantes nas cutículas das larvas, pupas e mosquitos de *A. aegypti*. Sabe-se que já foram identificados ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e hidrocarbonetos (octadecano, n-heneicosano, docosano e nonacosano) nas cutículas de larvas e mosquitos *A. aegypti* (MENDKI et al., 2000). Os biossurfactantes são capazes de emulsificar compostos apolares removendo-os e, possivelmente, desestruturando as cutículas.

Figura 26 - Micrografias das larvas de *A. aegypti* (A) sem a aplicação de biossurfactante – magnificação de 400X, (B) 12 horas após a aplicação do biossurfactante produzido pela levedura SSS28 na concentração de 800 mg/L - magnificação de 400X e (C) 12 horas após a aplicação do biossurfactante produzido pela levedura SSS28 na concentração de 800 mg/L – magnificação de 1000X

Fonte: Autoria própria

Diante dos resultados alcançados e da intensa necessidade de prospectar e produzir novas substâncias capazes de combater o desenvolvimento de mosquitos vetores de doenças negligenciadas, o biossurfactante produzido pela levedura SSS28 em meio de cultivo com

hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono, apresenta-se como um promissor agente larvicida natural em locais de crescimento de larvas do *A. aegypti*.

De acordo com Braga e Valle (2007), para o combate do *A. aegypti* podem ser utilizados inseticidas do tipo organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Atualmente, vários países do mundo vêm empregando os organofosforados, *temephós*, *malathion* e *fenitrothion*, para eliminar larvas, pupas e o mosquito *A. aegypti* (RAWLINS; WAN, 1995; WIRTH; GEORGHIOU, 1999; MACORIS et al., 2003). Porém, as atuações desses compostos são observadas em canais de troca iônica celular e sistema nervoso central, o que garante a resistência do vetor a esses compostos com o passar do tempo. A utilização de biossurfactantes do tipo glicolipídeo como larvicidas e/ou inseticidas no combate de vetores de doenças tropicais é uma importante estratégia, pois esses compostos atuam de forma diferente dos larvicidas e inseticidas sintéticos relatados. Além disso, são compostos naturais que oferecem uma maior segurança para a saúde humana e ao ambiente, devido a biodegradabilidade, atoxicidade, baixo impacto ambiental e viabilidade econômica de sua produção.

5.6. Produção de biossurfactante pela levedura *Trichosporon mucoides* CLM 42.4 (SSS11): características biotecnológicas da espécie leveduriforme, cinética da produção e caracterização físico-química e estrutural

Nos ensaios realizados no presente trabalho, a levedura foi a melhor produtora de biossurfactante glicolipídico em meio HD, apresentando uma produção de $11,334 \pm 2,169$ g/L e rendimento (conversão de xilose inicial em biossurfactante glicolipídico) de aproximadamente 23 % (Tabela 15). Além disso, o biossurfactante produzido apresentou uma destacada propriedade emulsificante, com um I.E.₂₄ de $70 \pm 3,6$ % e estabilidade por 144 horas. Por essa razão, essa levedura foi selecionada para estudos posteriores visando aprofundar os conhecimentos sobre a outros bioprodutos secretados por essa espécie, a cinética de produção do biossurfactante em meio HD e suas propriedades emulsificantes, a estrutura química e a otimização da produção do biossurfactante.

As leveduras do gênero *Trichosporon* pertencem ao Filo *Basidiomycota*, Sub-filo *Basidiomycotina* e Ordem *Trichosporonales* (MIDDELHOVEN et al., 2004). São encontradas em todos os ambientes (solo, ar e água) e também fazem parte das microbiotas naturais de aves, mamíferos e humanos (WOOLLETT; HENDRICK, 1970; ELLNER et al.,

1993). Desde 1890 são conhecidas, porém, nos últimos anos, as espécies consideradas GRAS, têm se destacado pelo potencial de aplicação na indústria biotecnológica, sendo denominadas de leveduras oleaginosas, de extrema importância na produção de biodiesel, lipases e também biossurfactantes. A espécie utilizada no presente trabalho, *Trichosporon mucoides* CLM 42.4 (SSS11), foi isolada da biodiversidade brasileira.

Visando aprofundar a caracterização dessa linhagem leveduriforme e possíveis aplicações biotecnológicas no contexto de biorrefinarias lignocelulósicas, também foram realizados ensaios qualitativos para verificar a produção das enzimas xilanases e celulasas em placas de Petri com meio sólido. Após 7 e 14 dias de ensaio foram verificados os halos de degradação, conforme pode ser observado na Figura 27.

Figura 27 - Teste enzimático para a detecção da produção de xilanases e celulasas pela levedura SSS11. Halos de degradação da hemicelulose (A) após 7 dias e (B) 14 dias de cultivo em meio suplementado com xilana. Halos de degradação da celulose (C) após 7 dias e (D) 14 dias de cultivo em meio suplementado com carboximetilcelulose

Fonte: Autoria própria

Observa-se na Figura 27 que os halos após 14 dias de cultivo apresentam uma maior nitidez, demonstrando uma possível maior atividade dessas enzimas, quando comparados aos halos de 7 dias. Stevens e Payne (1977), Liu et al. (1988) e Souza (2010) já relataram a produção de xilanases por leveduras do gênero *Trichosporon*. Pierozzi et al. (2011) observaram a produção de xilanases e celulasas pela linhagem de *T. mucoides* CLM 21.1. A prospecção de microrganismos produtores de celulasas e xilanases extracelulares é importante, uma vez que essas enzimas são fundamentais para as indústrias química, têxtil, alimentícia e farmacêutica (SOUZA, 2010). Além disso, com base nos resultados obtidos nos testes enzimáticos, futuramente espera-se utilizar a linhagem em estudo no presente trabalho em experimentos para a conversão direta de hemicelulose e celulose em biossurfactantes, integrando processos numa possível biorrefinaria lignocelulósica multiprodutos, conforme já relatado por Faria et al. (2014) e Faria et al. (2015).

Quanto à produção de biossurfactantes pelas leveduras do gênero *Trichosporon*, há alguns relatos na literatura sobre a secreção de biossurfactantes glicolipídicos em meios suplementados com fontes de carbono apolares. CHANDRAN e DAS (2010) observaram a produção de soforolipídeos por *Trichosporon asahii* cultivada em meio com óleo diesel como fonte de carbono, enquanto Monteiro et al. (2009) estudaram um glicolipídeo biossurfactante de estrutura complexa produzido por *Trichosporon montevidense* CLOA 72 em meio de cultivo com óleo de girassol como fonte de carbono. Ainda não há relatos na literatura da produção de biossurfactantes por leveduras em hidrolisados hemicelulósicos, nos quais a xilose é utilizada como principal fonte de carbono, sendo o presente trabalho pioneiro neste estudo.

A Figura 28 mostra a cinética de crescimento da levedura SSS11, a produção de biossurfactante, e o monitoramento das propriedades emulsificantes e tensoativas durante a fermentação em meio HD.

Figura 28 - Cinética da produção de biossurfactante glicolipídico pela levedura SSS11 em meio HD e avaliação das propriedades emulsificantes e tensoativas durante a fermentação

Fonte: Autoria própria

De acordo com a Figura 28, em 24 horas de fermentação, toda a glicose presente no meio HD já havia se esgotado e a produção do biossurfactante pela levedura SSS11 foi linear acompanhando a fase exponencial do crescimento ($R^2 = 0,927$), sendo o pico máximo de produção ($12,5 \pm 0,795$ g/L) observado em 72 horas de fermentação, no qual cerca de 70 % da xilose também já havia sido consumida. Após esse período inicia-se a fase estacionária de crescimento do microrganismo, estabilizando também a produção do biossurfactante.

Quanto as propriedades tensoativas e emulsificantes, na Figura 28, foi observado que a tensão superficial em meio HD durante a fermentação, variou entre 60 e 70 mN/m evidenciando a alta tensoatividade do composto, próxima a da água. As variações nas propriedades emulsificantes, como o I.E.₂₄ (0 – 70 %) e A.E. (0 – 2,7 U.E./mL), também foram observadas durante o processo fermentativo. O I.E.₂₄ máximo obtido foi de aproximadamente 70 % entre 48 e 72 horas de cultivo, mantendo-se quase inalterado até o final do processo (144 horas). Também foi verificado que há uma correlação linear entre o I.E.₂₄ e o crescimento microbiano ($R^2 = 0,914$). Para a A.E. observou-se a atividade máxima (aproximadamente 3,0 U.E./mL) em 72 horas de cultivo, porém, não havia correlação linear com a massa celular.

Conforme observado no presente estudo, as correlações lineares entre a massa celular na fase exponencial de crescimento, a produção de biossurfactante e o I.E.²⁴ já foram verificadas e relatadas por Monteiro et al. (2009). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de substâncias emulsificantes serem produzidas para melhor assimilar componentes apolares do meio de cultivo. No meio HD havia uma concentração inicial de 0,40 mg/L de fenóis totais (apolares), que após 72 horas de fermentação foi reduzida para aproximadamente 0,15 g/L, mostrando assim que houve assimilação dos compostos fenólicos pela levedura durante a fase de crescimento. Leveduras da espécie *Trichosporon mucoides*, vêm sendo relatadas como potentes degradadoras de fenóis em processos de biorremediação por apresentarem o complexo enzimático citocromo P450 (SCHLUETER et al., 2013).

O processo de assimilação de substâncias apolares por microrganismos pode ocorrer de duas formas distintas: pelo aumento da hidrofobicidade da superfície celular ou pela produção de biossurfactante como agente dispersivo e emulsificante de compostos com baixa solubilidade em meio aquoso (MONTEIRO et al., 2009). Sendo assim, no presente estudo também foi verificada a hidrofobicidade celular para a levedura SSS11 em 72 horas de fermentação em meio HD, sendo considerada baixa – aproximadamente 32,3 %. Diante dessas constatações, pode-se inferir que a produção do biossurfactante, nesse caso, foi associada ao crescimento celular devido a assimilação de parte dos compostos fenólicos por meio do fenômeno de solubilização e emulsificação. Além disso, observou-se também que os fenóis no meio HD, mesmo em concentrações inferiores que a xilose (principal fonte de carbono) agiram com indutores na produção do biossurfactante pela levedura SSS11.

Devido a potencial característica emulsificante, o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 teve suas emulsões testadas frente a diferentes compostos hidrofóbicos (hidrocarbonetos, solventes orgânicos e óleos vegetais) e condições físico-químicas (temperatura, pH e força iônica) visando uma futura aplicação industrial para esse composto.

Inicialmente, o potencial emulsificante do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 foi testado em diferentes compostos hidrofóbicos, como óleos vegetais, hidrocarbonetos, lubrificantes e solventes orgânicos importantes para a indústria química, petroquímica, farmacêutica e alimentícia. Na Figura 29, é possível observar os perfis das emulsões obtidas.

Figura 29 - Perfil das emulsões formadas entre o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em diferentes compostos hidrofóbicos. **(A)** Índice de Emulsificação (E.I.₂₄ - %) e **(B)** Atividade Emulsificante (A.E. – U.E./mL)

Fonte: Autoria própria

O I.E.₂₄ das emulsões formadas entre o biossurfactante e diferentes compostos hidrofóbicos (Figura 29A), confirmaram a eficácia do emulsionamento, principalmente, em querosene (65 %) e o óleo lubrificante (55 %). Nos solventes (toluol e hexano) e nos óleos vegetais, os índices de emulsificação atingiram um máximo de aproximadamente 50 %. De acordo com Haba et al. (2000) e Batista et al. (2006), substâncias bioemulsificantes eficientes para processos industriais devem apresentar um I.E. superior a 50 %. Porém, deve-

se pontuar que apenas as emulsões em querosene, óleo lubrificante e óleo de canola exibiram estabilidade após 144 horas. Os resultados obtidos sugerem uma maior emulsificação e estabilidade formada pelo biossurfactante com hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa. Tal constatação pode ser realizada, devido a composição do querosene, onde se encontra uma mistura de hidrocarbonetos com a maior proporção de alcanos alifáticos de cadeia longa ($C_9 - C_{17}$), e o óleo lubrificante de motor automotivo, com uma mistura majoritária de hidrocarbonetos parafínicos e isoparafínicos. De acordo com Rufino et al. (2007), a capacidade emulsionante depende diretamente da afinidade entre o biossurfactante e substrato hidrofóbico, não tendo relação alguma com a tensão superficial do meio. Resultados semelhantes aos do presente trabalho foram obtidos por Barros et al., (2008) e Monteiro et al., (2009) em trabalhos com biossurfactantes produzidos por bactérias e leveduras dos gêneros *Trichosporon*.

Já os resultados de atividade emulsificante (Figura 29B), corroboraram com os dados da estabilidade das emulsões obtidas, sendo maior nos sistemas emulsionantes formados pelo biossurfactante com querosene (2,9 U.E./mL), hexano (1,0 U.E./mL), óleo lubrificante (1,3 U.E./mL) e de canola (1,0 U.E./mL). Na Figura 30, foi feita uma análise microscópica das emulsões formadas entre o biossurfactante e o óleo de soja, o querosene e o óleo lubrificante.

Figura 30 - Microscopia óptica das emulsões formadas entre o biossurfactante e (A) óleo de soja, (B) querosene e (C) óleo de motor automotivo – magnitude de 400X

Fonte: Autoria própria

Como pode ser observado, na primeira emulsão (Figura 30A) os glóbulos presentes eram maiores, enquanto nas emulsões formadas entre o biossurfactante e os hidrocarbonetos eram menores e mais compactos (Figura 30B e C). Assim, pode-se afirmar que o tamanho dos glóbulos presentes nas emulsões se relaciona com a compactação, a atividade e a estabilidade emulsiva, conforme proposto por Rosen (2004). Emulsões com glóbulos maiores tendem a uma menor estabilidade, em contrapartida, glóbulos menores são responsáveis por emulsões mais estáveis. De uma forma geral, a reduzida emulsificação e estabilidade emulsiva de alguns sistemas, pode ser devido à incapacidade do biossurfactante em produzir e estabilizar os glóbulos microscópicos (DESAI; BANAT, 1997).

A análise microscópica dos glóbulos presentes nas emulsões também é uma importante ferramenta para a aplicação dos biossurfactantes em produtos cosméticos. Baseando-se na classificação proposta por Florence e Whitehill (1982), pode-se afirmar que a emulsão formada entre o biossurfactante e o óleo de soja (Figura 30A) é do tipo B – glóbulos múltiplos que apresentam um único glóbulo grande interno. Enquanto as emulsões formadas com a querosene (Figura 30B) e o óleo lubrificante (Figura 30C) são do tipo C – glóbulos múltiplos que apresentam grande quantidade de glóbulos pequenos internos – amplamente empregadas como veículos cosméticos e/ou farmacêuticos (VASILJEVIC; VULETA; PRIMORAC, 2005). Sendo assim, como observado no presente estudo, o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 pode ser uma alternativa de agente emulsionante na composição de formulações cosméticas que contêm parabenos, óleo mineral, parafina e a nafta petroquímica.

O biossurfactante produzido pela levedura SSS11 demonstrou ser melhor emulsificante de hidrocarbonetos. Diante disso, os testes de estabilidade em diferentes temperaturas, concentrações de NaCl e pH foram realizados com o querosene, a substância hidrofóbica que exibiu as melhores propriedades emulsivas dentre todos os compostos hidrofóbicos testados. Na Figura 31, é possível observar os perfis das emulsões nas condições testadas.

Figura 31 - Perfil das emulsões formadas entre o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 e querosene em diferentes (A) Temperaturas (°C), (B) Concentrações de NaCl (%) e (C) pH

Fonte: Autoria própria

Na avaliação do tratamento térmico das emulsões, observa-se na Figura 31A, que o I.E.₂₄ permaneceu estável (entre 65 – 70 %) sofrendo alteração apenas na temperatura de 100 °C, onde houve uma redução de aproximadamente 15 unidades do I.E.₂₄. As atividades emulsificantes, com exceção da emulsão acondicionada a 30 °C que apresentou um valor de 2,8 U.E./mL, ficaram em torno de 1,0 – 1,2 U.E./mL. Essa redução da atividade emulsificante evidencia a menor estabilidade das emulsões em temperaturas não medianas. O aumento da temperatura fornece energia ao sistema, tornando a emulsão ainda mais instável. Sabe-se que a temperatura elevada é capaz de alterar importantes propriedades reológicas do meio, como por exemplo, a redução da viscosidade, o que acarreta uma coalescência mais rápida e reduz a resistência das películas interfaciais desestabilizando-as. Além disso, a baixa viscosidade facilita a aproximação e sedimentação dos glóbulos, proporcionando a formação de uma emulsão coalescente (KOKAL, 2002; CUNHA, 2007).

O comportamento das emulsões formadas entre o biossurfactante e o querosene frente a diferentes concentrações de NaCl (% , m/V), conforme exibido na Figura 31B, mostrou uma variação do I.E.₂₄ entre 60 – 70 % e atividades superiores a 1,0 U.E./mL. Nota-se também que nos ensaios em que a concentração de NaCl variou entre 6 e 10 %, as atividades emulsificantes decaíram, sendo um indicativo, de que o aumento da salinidade pode gerar emulsões com menor estabilidade. Com o aumento da concentração de NaCl é visto um efeito proporcional na força iônica do meio, o que eleva a energia interna do sistema e, conseqüentemente, as emulsões tornam-se ainda mais termodinamicamente instáveis. Observa-se nas emulsões formadas em elevada força iônica, que os glóbulos fundem-se tomando dimensões maiores, aumentando a coalescência da emulsão. Tal fato ocorre quando a energia de adesão entre dois glóbulos é maior que a energia de turbulência, o que ocasiona a dispersão causando a destruição da emulsão (CALDERON; POULIN, 1999).

A avaliação do emulsionamento entre o biossurfactante e o querosene frente a diferentes valores de pH (Figura 31C), mostrou que em valores extremos (2 e 12) não ocorreu emulsionamento. E que os valores de pH próximos a neutralidade (6 e 8) exibiram melhores emulsões, com I.E.₂₄ variando entre 40 – 50 %. As atividades emulsificantes na faixa de pH entre 4 e 10 mostraram valores superiores a 1,0 U.E./mL. Segundo Antunes (2007), valores de pH ácidos alteram as forças eletrostáticas responsáveis pela formação das emulsões promovendo a floculação e, posteriormente, a sedimentação dos glóbulos, formando emulsões instáveis. No trabalho de Barros e colaboradores (2008), foi observado um baixo

desempenho do biossurfactante produzido *Bacillus subtilis* em pH fortemente ácido, pois, o composto pode se encontrar na forma precipitada (insolúvel), o que diminui suas propriedades tensoativas e emulsificantes. Entretanto, a neutralização do meio pode torná-lo novamente solúvel e suas propriedades serem recuperadas.

Além da alteração da solubilidade do biossurfactante, a variação do pH no meio pode afetar a estrutura e a dimensão das micelas formadas entre o biossurfactante e o sistema água-óleo (SANTOS et al., 2014). De acordo com os relatos de Knoblich e colaboradores (1995), em experimentos de elétron criomicroscopia com surfactina padrão, observou-se que em pH com valores mais próximo da neutralidade, a micela apresentava estrutura esférica e elipsoidal. Em pH com valores alcalinos, a estrutura micelar era esférica e cilíndrica e com dimensões superiores as observadas em pH ácido ou neutro.

De acordo com os resultados, os fatores ambientais como a temperatura, a salinidade e o pH também influenciaram o processo de emulsificação. Assim é de extrema importância o estudo da influência desses parâmetros ao se considerar a possibilidade de aplicações específicas para esses compostos (MULLIGAN, 2005). Zinjarde e colaboradores (1997) e Monteiro et al., (2009) estudaram as propriedades de bioemulsificantes produzidos por leveduras dos gêneros *Yarrowia* e *Trichosporon*, detectando excelentes sistemas emulsionantes quando combinados com hidrocarbonetos em variadas condições ambientais, obtendo resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Os biossurfactantes com propriedades emulsionantes ativas em contato com hidrocarbonetos são importantes, principalmente para a indústria petroquímica, uma vez que podem ser aplicados no bombeamento de petróleo, na lavagem de depósitos de petroderivados, no tratamento de efluentes industriais em processos de biorremediação (MONTEIRO et al., 2009).

Após a caracterização de sua propriedade emulsificante, o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD, foi purificado e caracterizado estruturalmente. Posteriormente ao processo de extração líquido-líquido, foi isolado um extrato bruto de coloração amarelada/amarronzada (Figura 32), conforme relatado por Josh-Navare e colaboradores (2013) em estudo para a produção de glicolípídeo microbiano.

Figura 32 - Extrato bruto do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD. (A) extrato bruto durante a rotaevaporação do solvente e (B) extrato bruto após a evaporação do solvente

Fonte: Autoria própria

O extrato bruto foi então purificado através de procedimentos cromatográficos em coluna Solid-Phase Extraction (SPE) e submetido a uma TLC onde pode-se detectar *spot* com um valor de R_f de aproximadamente 0,5. Resultado similar foi obtido por ASMER et al. (1988) ao descrever a produção de um *pool* de soforolipídeos por *Torulopsis bombicola* ATCC 22214.

Após a TLC, o biossurfactante foi submetido a espectroscopia de infravermelho para a detecção de grupamentos funcionais que o constituem (Figura 33).

Figura 33 - Espectros de infravermelho do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD

Fonte: Autoria própria

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 33) apresentou uma banda entre 3200 - 3600 cm^{-1} característica de estiramento de hidroxilas e picos entre 2800 – 2900 cm^{-1} correspondentes ao estiramento assimétrico e deformação axial simétrica da ligação C – H de grupamentos metila ($-\text{CH}_3$) e metileno ($-\text{CH}_2-$). Na região próxima a 1750 cm^{-1} observa-se uma banda típica de deformação axial de carbonilas, grupamento químico comum em lactonas, ésteres e ácidos carboxílicos. Na região de *fingerprint* do espectro também são observados picos entre 1000 – 1500 cm^{-1} , referentes ao estiramento da ligação C – O em lactonas ($\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}$) (1250 cm^{-1}) e em aproximadamente 1400 cm^{-1} um pico típico de deformação simétrica no plano para ligação do tipo C – O – H de ácido carboxílico. Na região do espectro entre 740 – 750 cm^{-1} observa-se picos possivelmente referentes a deformação angular do tipo balanço de grupos metileno com quatro ou mais unidades (BARBOSA, 2007). As bandas e picos detalhados no espectro de absorção na região do infravermelho são similares as relatadas por Daverey e Pakshirajan (2009) em seu trabalho para a caracterização de um sofrorolípido produzido *Candida bombicola*.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 podem ser observados nos Apêndices 1 e 2 e os valores dos principais sinais encontram-se agrupados na Tabela 16.

Tabela 16 - Sinais de RMN ^1H e ^{13}C do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD

Elucidação Estrutural - RMN ^1H	
Sinais (ppm)	Possíveis Grupamentos
1,201 – 1,297	Presença de múltiplos hidrogênios metílicos ($-\text{CH}_3$)
2,068	Presença de hidrogênios metílicos ligados a grupamentos carbonílicos ($-\text{COCH}_3$)
3,678	Presença de hidrogênio metínico no grupamento $-(\text{CH}_2)-\text{CH}-(\text{O}-\text{açúcar})-\text{CH}_3$
4,219	Presença de hidrogênios metilênicos ligados ao grupamento $\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{O})-\text{CH}-\text{OH}$
5,324 – 5,347	Presença de hidrogênios metílicos e metilênicos próximos a insaturações $-\text{CH}=\text{CH}-$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$
Elucidação Estrutural - RMN ^{13}C	
Sinais (ppm)	Possíveis Grupamentos
62,055	Presença de carbono na posição C-6'' da glicose
63,690	Presença de carbono na posição C-6' da glicose
102,383	Presença de carbono na posição C-1' da glicose
104,008	Presença de carbono na posição C-1'' da glicose

Fonte: Autoria própria

De acordo com a Wadekar e colaboradores (2010), os sinais de 1,201 – 1,297 ppm podem ser indicativos de hidrogênios metilênicos na posição ω (ômega – terminal) em ácidos graxos. Em 3,678 ppm observa-se um sinal que possivelmente mostra a presença do hidrogênio de um grupamento típico de açúcar ligado a um ácido graxo e em 5,324 – 5,347 há indícios de hidrogênios metilênicos e metínicos das insaturações comumente encontrados em ácidos graxos.

Os sinais encontrados na análise de RMN ^{13}C , segundo Daverey e Pakshirajan (2009), são possivelmente de carbonos na posição 1 e 6 de moléculas de glicose que compõem a soforose.

De acordo com a análise estrutural pode-se sugerir que o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD é do tipo soforolipídeo. Na literatura, trabalhos como o de Chandran e Das (2010) relatam a produção de soforolipídeos por levedura do gênero *Trichosporon*, entretanto, deve-se ressaltar o ineditismo do presente trabalho ao produzir tal composto em meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico.

5.7. Otimização da produção de biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD: um estudo nutricional para a formulação de meios de cultivo

5.7.1. Caracterização físico-química dos extratos de farelos de soja e arroz utilizados como fontes de nutrientes na formulação de meios de cultivo para a produção de biossurfactante pela levedura SSS11

Visando adotar substratos ricos em macro e micronutrientes, como por exemplo, peptídeos, proteínas, sais minerais e vitaminas em bioprocessos, no presente trabalho estudou-se a viabilidade do emprego dos extratos de farelo de soja (EFS) e arroz (EFA) como suplemento nutricional no processo fermentativo para a obtenção de biossurfactante pela levedura SSS11. Ainda não há relatos na literatura acerca da utilização do extrato de farelo de soja como suplemento nutricional em fermentações. Chaud et al. (2009) e Martiniano et al. (2013) relataram a utilização de extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio e vitaminas em bioprocessos para obtenção de etanol de segunda geração e xilitol.

Os EFS e EFA obtidos após o tratamento térmico em meio aquoso foram caracterizados quanto ao pH, densidade, condutividade e aos teores de proteínas totais, lipídeos totais, compostos fenólicos totais, carboidratos totais e redutores e saponinas totais, e os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Parâmetros físico-químicos e composição química parcial do EFS e EFA obtidos pós-tratamento térmico

Parâmetros físico-químicos/composição Química	EFS	EFA
pH	6,373 ± 0,038	5,847 ± 0,031
Densidade (mg/mL)	1,039 ± 0,025	1,020 ± 0,040
Condutividade (µS/cm)	6,75	4,89
Carboidratos totais (g/L)	26,792 ± 1,195	22,875 ± 1,786
Carboidratos redutores (g/L)	23,452 ± 3,735	
Proteínas totais (g/L)	22,742 ± 0,380	7,312 ± 0,599
Lipídeos totais (mg/L)	377,895 ± 7,444	195,263 ± 8,932
Compostos fenólicos totais (mg/L)	300,841 ± 13,463	258,803 ± 2,266
Vanilina (mg/L)	ND	ND
Siringaldeído (mg/L)	ND	11,305 ± 0,192
Álcool vanilil (mg/L)	51,118 ± 0,989	13,869 ± 0,024
Ácido Vanílico (mg/L)	12,014 ± 0,257	12,710 ± 0,258
Ácido Sirínico (mg/L)	6,879 ± 0,976	3,521 ± 0,321
Ácido p-cumárico (mg/L)	3,522 ± 0,332	0,276 ± 0,012
Ácido ferúlico (mg/L)	1,625 ± 0,224	8,917 ± 0,435
Ácido gálico (mg/L)	33,342 ± 0,471	10,514 ± 0,225
Furanos e derivados (furfural, 5-HMF e ácido furóico) (mg/L)	181,529 ± 1,392	66,514 ± 0,759
Saponinas totais (g/L)	0,253 ± 0,031	0,289 ± 0,029

ND: não detectado

Fonte: Autoria própria

Os extratos obtidos apresentaram valores de pH próximos a neutralidade, evidenciando que a hidrólise de peptídeos e proteínas durante o tratamento térmico não causou alterações bruscas no pH. Este fato é importante, uma vez que a necessidade de adição de ácidos ou bases para a correção do pH do meio de cultivo, pode vir a encarecer o processo. O emprego de fontes orgânicas de nitrogênio também apresenta como vantagens, a baixa variação de pH durante o processo fermentativo, uma vez que os produtos do metabolismo de aminoácidos e peptídeos não alteram substancialmente o pH, e o aporte simultâneo como fonte de carbono (BALATTI, 1991).

As condutividades dos EFS e EFA podem ser relacionadas com a concentração de sais minerais e outras espécies iônicas disponíveis nos extratos (SCHEIDT; BOMBARDELLI, 2011). Segundo Rieger et al. (2008), na soja são encontrados os minerais

cálcio, potássio, fósforo, ferro, magnésio, manganês, cobre e zinco. Enquanto no arroz encontram-se silício, fósforo, potássio e magnésio e, em menor proporção, ferro e zinco (JULIANO; BECHTEL, 1985; WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008). Sendo assim, esses metais servem como micronutrientes para a nutrição microbiana.

A composição química dos farelos de soja e arroz pode variar em função da sazonalidade e do tipo de cultivar. Apesar das estruturas complexas, esses farelos apresentam majoritariamente carboidratos e proteínas em sua composição. De acordo com Cabral et al. (2004), o farelo de soja apresenta em sua composição 45,05 % de carboidratos e 47,58 % de proteínas totais. De forma semelhante, segundo Silva, Calliari e Soares Junior (2011), o farelo de arroz é composto por 49,80 % de carboidratos e 14,94 % de proteínas. Conforme demonstrado na Tabela 17, os teores de carboidratos e proteínas totais encontrados nesses extratos aquosos pós-tratamento térmico são satisfatórios para sua utilização como de fontes nutrientes em bioprocessos. Atualmente a prospecção de matérias-primas de baixo custo para o emprego como fontes de nutrientes em processos biotecnológicos é uma prioridade. No caso dos biossurfactantes, segundo Fontes e colaboradores (2008), a adoção de subprodutos oriundos da agroindústria e a indústria alimentícia, como matérias-primas nos processos é responsável pela redução de até 30 % do custo do produto.

Os teores de carboidratos totais e redutores em ambos os extratos foram similares. Sabe-se que na soja são encontrados carboidratos como o amido, celulose, hemicelulose, pectina e alguns oligossacarídeos (sacarose, maltose, rafinose e estaquiose), com diferentes solubilidades. Segundo Walter e colaboradores (2008), o arroz apresenta como principal carboidrato constituinte o amido. A elevada concentração de carboidratos no EFS e EFA deve-se ao processo térmico de obtenção ao qual os grãos foram submetidos. Assim, em meio aquoso e alta temperatura (aproximadamente 121 °C), pode-se garantir a hidrólise dos polímeros glicídicos pouco solúveis a oligossacarídeos e monossacarídeos solúveis em água. A análise qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência, mostrou somente a presença de picos referentes aos açúcares e oligossacarídeos: glicose ($t_r = 12,70$ min), xilose ($t_r = 20,28$ min), galactose ($t_r = 14,73$ min), sacarose ($t_r = 15,15$ min) e maltose ($t_r = 16,42$ min). A detecção de xilose no EFA é devido a presença das cascas do grão, que mesmo após os processos de descascamento, separação e brunização, ainda podem estar presentes devido a ineficiência do maquinário da usina de beneficiamento. A presença das cascas pode ser

comprovada por meio das microscopias eletrônicas de varredura, como apresentado na Figura 34.

Figura 34 - Micrografias eletrônicas de varredura da casca de arroz encontrada no farelo após tratamento térmico para a obtenção de extrato de farelo de arroz. A casca de arroz observada em (A) apresenta uma magnificação de 100X e em (B) uma magnitude de 206X

Fonte: Autoria própria

Observa-se que o tratamento térmico não causou uma desestruturação visível nas cascas de arroz utilizadas no presente trabalho (Figura 34), devido ao seu caráter brando quando comparados a outros métodos de pré-tratamento descritos na literatura. Há relatos de trabalhos onde a palha de arroz foi submetida ao tratamento térmico combinado com ácido e líquidos iônicos para a obtenção de monossacarídeos e, devido à severidade do tratamento, foi possível observar nas micrografias uma maior desestruturação do material (RODRIGUES et al., 2015).

Quanto ao teor proteico, o EFS mostrou-se como melhor fonte nitrogenada, apresentando uma concentração de proteínas totais 3 vezes maior que o EFA. O alto teor de proteínas do EFS em comparação ao EFA pode ser explicado não só pela composição de proteínas brutas desses grãos, como já relatado anteriormente, mas como também pela solubilidade em meio aquoso de suas proteínas constituintes. O baixo teor de proteínas no EFA é devido a elevada concentração de glutelina em sua composição, cerca de 80 %, como demonstrado em alguns estudos. Essa proteína apresenta alta massa molar e subunidades ligadas por ligações dissulfeto sendo pouco solúvel em meio aquoso e com pH neutro (PARAMAN et al., 2007).

Os teores de lipídeos encontrados nos EFS e EFA foram inferiores ao encontrados por Faria (2008), que quantificou lipídeos totais do farelo de arroz cru no extrato etéreo, nos quais esses compostos são mais solúveis, encontrando concentrações superiores à 2 g/L de lipídeos totais. Porém, apesar das inferiores concentrações de lipídeos encontradas no EFS e EFA em meio aquoso, esses compostos podem atuar como indutores para a produção de biossurfactantes no processo fermentativo, devido ao seu caráter hidrofóbico.

Os compostos furânicos, oriundos da degradação dos açúcares, apresentaram concentrações no EFS e EFA consideradas não-inibitórias ao metabolismo microbiano. De acordo com a Tabela 17, o EFS apresentou uma concentração aproximadamente três vezes maior que o EFA em compostos furânicos. Porém, os teores de furanos encontrados no presente estudo ainda são menores que o relatado por Sanchez e Bautista (1988) e Delgenes e colaboradores (1996), em seus trabalhos, onde em cultivos a partir de 1,0 g/L desses compostos, notou-se a inibição do crescimento microbiano.

Nos EFS e EFA também foi detectada a presença de compostos fenólicos, conforme observado na Tabela 17. Sabe-se que em grãos de soja pode-se encontrar compostos polifenólicos como as isoflavonas e os polifenóis. Porém, nas análises realizadas no presente trabalho também foram encontrados, em maiores quantidades no EFS os ácidos gálico e vanilínico e o álcool vanilil, representando 32 % dos compostos fenólicos totais presentes no EFS. Nos grãos de arroz são comuns compostos fenólicos derivados dos ácidos benzóicos e hidroxicinâmicos, sendo comumente relatados os ácidos ferúlico, vanílico e p-cumárico (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008; MIRA et al., 2008; FALLER; FIALHO, 2009). Entretanto, alguns autores descreveram ainda siringaldeído, ácido siríngico, ácido gálico e ácido caféico em grãos de arroz (MORIMITSU et al., 2002; HYUN; CHUNG, 2004; TIAN et al., 2004; ZHOU et al., 2004). No EFA analisado no presente trabalho, nota-se majoritariamente a presença de siringaldeído, álcool vanilil, ácidos vanílico e gálico, correspondendo a aproximadamente 19 % dos compostos fenólicos totais analisados (Tabela 17). As quantidades de compostos fenólicos encontradas nos extratos do presente estudo, não inibirão o crescimento microbiano durante o processo fermentativo. As concentrações de EFS e EFA empregadas nas composições dos meios de cultivo para a obtenção de biossurfactantes não passarão de 10 % (V/V), correspondente a aproximadamente 25 - 30 mg/L de compostos fenólicos no meio. Sendo assim, os fenóis estarão abaixo do teor de 0,1 g/L considerado inibidor do crescimento microbiano.

Deve-se salientar que a quantidade e a composição dos fenóis presentes em vegetais são influenciadas pela natureza genotípica, a época do cultivo (HOWARD; CLARK; BROWNMILLER, 2003) e pelas condições ambientais (ROBINSON; BRITZ, 2000; CALDWEL; BRITZ; MIRECK, 2005). Além disso, as condições de armazenamento (ASAMI et al., 2003) e os parâmetros de extração influenciam nas variáveis químicas desses extratos (HINNEBURG; NEUBERT, 2005).

Por fim, a quantificação de saponinas nos EFS e EFA, mostrou a presença dessas substâncias em quantidades variando entre 0,25 – 0,29 g/L. Nos cultivos, as concentrações empregadas dos extratos serão em torno de 10 % (V/V) e, por consequência, os teores de saponinas serão diluídos. Assim, os efeitos detergente e emulsificante das saponinas serão reprimidos devido a essas baixas concentrações. Além disso, conforme relatado por Pereira et al. (2007), as saponinas também apresentam efeito permeabilizante e desestruturante às células, porém, em baixas concentrações esse efeito também pode ser evitado.

5.7.2. Otimização da produção de biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD: estudos de suplementação com fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas e indutores na formulação de meios de cultivo na produção de biossurfactante com destacadas propriedades emulsificantes e tensoativas

Visando estudar estratégias nutricionais para a produção do biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD foram realizados planejamentos fatoriais para a seleção dos fatores e a posterior otimização do processo obtendo um bioproduto com atrativas propriedades emulsificantes e tensoativas.

Para a otimização da produção de biossurfactantes com características aplicáveis em processos industriais, numa primeira etapa foi realizado um planejamento fatorial de *Plackett-Burman* (PB) para a seleção das variáveis nutricionais (fontes de nitrogênio e indutor) no bioprocessamento em estudo. Foi realizado um planejamento com 12 ensaios e 3 repetições do ponto central. A Tabela 18 apresenta o delineamento do planejamento fatorial com fatores independentes decodificados e codificados e as respostas obtidas.

Tabela 18 - Delineamento do planejamento fatorial PB com 12 ensaios e 3 repetições do ponto central para seleção dos fatores nutricionais para a análise da produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 em meio HD tendo como respostas I.E.₂₄ e TS

Ensaios	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	I.E. ₂₄ (%)	TS (mN/m)
1	6,40 (+)	0,00 (-)	1,50 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	4,00 (+)	5,00 (+)	(+)	(-)	(+)	2,50	58,22
2	6,40 (+)	10,0 (+)	0,00 (-)	5,00 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	5,00 (+)	(+)	(+)	(-)	2,50	56,14
3	0,00 (-)	10,0 (+)	1,50 (+)	0,00 (-)	2,00 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	(+)	(+)	(+)	27,50	63,75
4	6,40 (+)	0,00 (-)	1,50 (+)	5,00 (+)	0,00 (-)	4,00 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	(-)	(+)	(+)	37,50	63,75
5	6,40 (+)	10,0 (+)	0,00 (-)	5,00 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	4,00 (+)	0,00 (-)	(-)	(-)	(+)	65,00	55,94
6	6,40 (+)	10,0 (+)	1,50 (+)	0,00 (-)	2,00 (+)	4,00 (+)	0,00 (-)	5,00 (+)	(-)	(-)	(-)	2,50	55,12
7	0,00 (-)	10,0 (+)	1,50 (+)	5,00 (+)	0,00 (-)	4,00 (+)	4,00 (+)	0,00 (-)	(+)	(-)	(-)	60,00	55,75
8	0,00 (-)	0,00 (-)	1,50 (+)	5,00 (+)	2,00 (+)	0,00 (-)	4,00 (+)	5,00 (+)	(-)	(+)	(-)	57,50	54,69
9	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	5,00 (+)	2,00 (+)	4,00 (+)	0,00 (-)	5,00 (+)	(+)	(-)	(+)	40,00	56,05
10	6,40 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	2,00 (+)	4,00 (+)	4,00 (+)	0,00 (-)	(+)	(+)	(-)	10,00	55,49
11	0,00 (-)	10,0 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	4,00 (+)	4,00 (+)	5,00 (+)	(-)	(+)	(+)	47,50	52,20
12	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	(-)	(-)	(-)	37,50	69,82
13	3,20 (0)	5,00 (0)	0,75 (0)	2,50 (0)	1,00 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	2,50 (0)	(0)	(0)	(0)	20,00	54,64
14	3,20 (0)	5,00 (0)	0,75 (0)	2,50 (0)	1,00 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	2,50 (0)	(0)	(0)	(0)	22,50	55,18
15	3,20 (0)	5,00 (0)	0,75 (0)	2,50 (0)	1,00 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	2,50 (0)	(0)	(0)	(0)	18,75	54,46

X₁ - peptona bacteriológica (g/L); X₂ – extrato de levedura (g/L); X₃ – uréia (g/L); X₄ – sulfato de amônio (g/L); X₅ – nitrato de sódio (g/L); X₆ – extrato de farelo de arroz (EFA) (%); X₇ – extrato de farelo de soja (EFS) (%); X₈ – óleo de soja (baseado no teor de gorduras totais) (g/L); X₉, X₁₀ e X₁₁ – fatores inertes; (-) – níveis inferiores; (+) – níveis superiores

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 19, observa-se os efeitos dos fatores do planejamento de PB para a seleção dos nutrientes utilizados na produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 com propriedades emulsificantes e tensoativas atrativas para posterior aplicação industrial.

Tabela 19 - Estimativa de efeitos e p-valor dos fatores estudados no planejamento de PB para a seleção dos nutrientes utilizados na produção de biossurfactantes pela levedura SSS11

Fatores	I.E. ₂₄ (%)		TS (mN/m)	
	Efeitos	p-valor	Efeitos	p-valor
X₁	-25,000	0,035314*	-1,26583	0,382670
X₂	3,3333	0,730653	-3,18750	0,055411*
X₃	-2,5000	0,795799	0,93917	0,510885
X₄	22,5000	0,050816*	-2,04417	0,179120
X₅	2,5000	0,795799	-2,47083	0,115657
X₆	0,8333	0,931075	-3,36750	0,046192*
X₇	15,8333	0,137449	-5,39083	0,007033*
X₈	-14,1667	0,176130	-5,34750	0,007296*

*significativo para p-valor < 0,1; **X₁** - peptona bacteriológica (g/L); **X₂** – extrato de levedura (g/L); **X₃** – uréia (g/L); **X₄** – sulfato de amônio (g/L); **X₅** – nitrato de sódio (g/L); **X₆** – extrato de farelo de arroz (EFA) (%); **X₇** – extrato de farelo de soja (EFS) (%); **X₈** – óleo de soja (baseado no teor de gorduras totais) (g/L)

Fonte: Autoria própria

De acordo com a Tabela 19, obtida após o experimento de seleção de fatores, são considerados significativos para a produção de biossurfactantes, os fatores nutricionais: peptona (**X₁**), extrato de levedura (**X₂**), sulfato de amônio (**X₄**), EFA (**X₆**), EFS (**X₇**) e o óleo de soja (**X₈**) (levando-se em consideração o teor de lipídeos totais).

Analizando os efeitos na resposta I.E.₂₄, observa-se que a peptona exibe uma influência negativa, não sendo interessante explorá-la. Devido a isso, para experimentos posteriores, adotou-se somente o sulfato de amônio, que apresentou um incremento no I.E.₂₄ (aumento de 22,50 unidades). Quanto aos efeitos na resposta TS, observa-se que as variáveis extrato de levedura, EFA, EFS e óleo de soja exibiram efeitos negativos, sendo interessante aproveitá-los como nutrientes na composição de meios de cultivo para produção de biossurfactantes com reduzidas tensões superficiais. Porém, afim de otimizar a produção e os custos, em experimentos posteriores, as variáveis adotadas foram o extrato de levedura, o EFS e o óleo de soja. A escolha pelo EFS e não o EFA, apesar dos dois extratos serem fontes orgânicas de nitrogênio, deu-se em função do elevado teor de proteínas totais no EFS e da disponibilidade do mesmo, visto que o Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo. Além disso, o EFS apresentou um efeito negativo mais acentuado na redução da TS quando comparado ao EFA.

Os resultados obtidos nos experimentos de seleção dos fatores nutricionais, estão de acordo com alguns trabalhos descritos na literatura. Fontes et al. (2010) em experimentos com *Yarrowia lipolitica* para a produção de biossurfactantes, observaram efeitos significativos do sulfato de amônio e do extrato de levedura nas respostas I.E.₂₄ e Δ TS. Os mesmos autores também verificaram que a peptona foi estatisticamente significativa para o

I.E.₂₄ e a uréia não exibiu efeito algum. Resultados semelhantes também foram relatados por Cooper e Paddock (1984), Zinjard e Pant (2002) e Lukondeh, Ashbolt e Rogers. (2003).

Em função dos resultados da seleção de fatores nutricionais realizada, optou-se verificar a influência dos quatro fatores considerados significativos para o I.E.₂₄ e TS dos biossurfactantes produzidos pela levedura SSS11 nas fermentações submersas em meio de cultivo HD. Sendo assim, nos experimentos posteriores utilizou-se um planejamento fatorial composto central rotacional (DCCR) do tipo 2⁴, incluindo 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central. As escolhas dos níveis utilizados foram baseadas na literatura e no desempenho das respostas, de acordo com seus efeitos no planejamento anterior. A Tabela 20 apresenta o delineamento do planejamento fatorial com os fatores independentes decodificados e codificados e as respostas utilizadas nas análises estatísticas.

Tabela 20 - Delineamento do planejamento DCCR do tipo 2⁴ com 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central para a análise da produção de biossurfactantes pela levedura SSS11 em meio HD tendo como respostas I.E.₂₄ e TS

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	I.E. ₂₄ (%)	TS (mN/m)
1	7,50 (-)	7,50 (-)	4,00 (-)	4,00 (-)	61,54	39,01
2	12,50 (+)	7,50 (-)	4,00 (-)	4,00 (-)	60,00	34,02
3	7,50 (-)	12,50 (+)	4,00 (-)	4,00 (-)	64,29	44,11
4	12,50 (+)	12,50 (+)	4,00 (-)	4,00 (-)	62,50	38,47
5	7,50 (-)	7,50 (-)	8,00 (+)	4,00 (-)	53,33	43,68
6	12,50 (+)	7,50 (-)	8,00 (+)	4,00 (-)	57,14	36,66
7	7,50 (-)	12,50 (+)	8,00 (+)	4,00 (-)	53,85	39,42
8	12,50 (+)	12,50 (+)	8,00 (+)	4,00 (-)	56,48	38,09
9	7,50 (-)	7,50 (-)	4,00 (-)	8,00 (+)	60,00	39,70
10	12,50 (+)	7,50 (-)	4,00 (-)	8,00 (+)	61,11	37,82
11	7,50 (-)	12,50 (+)	4,00 (-)	8,00 (+)	62,50	37,09
12	12,50 (+)	12,50 (+)	4,00 (-)	8,00 (+)	55,56	36,58
13	7,50 (-)	7,50 (-)	8,00 (+)	8,00 (+)	58,33	38,16
14	12,50 (+)	7,50 (-)	8,00 (+)	8,00 (+)	64,71	35,60
15	7,50 (-)	12,50 (+)	8,00 (+)	8,00 (+)	53,33	37,74
16	12,50 (+)	12,50 (+)	8,00 (+)	8,00 (+)	66,67	36,79
17	5,00 (-2)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)	69,49	33,03
18	15,00 (+2)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)	62,50	38,82
19	10,00 (0)	5,00 (-2)	6,00 (0)	6,00 (0)	53,33	37,97
20	10,00 (0)	15,00 (+2)	6,00 (0)	6,00 (0)	58,82	37,64
21	10,00 (0)	10,00 (0)	2,00 (-2)	6,00 (0)	58,82	39,38
22	10,00 (0)	10,00 (0)	10,00 (+2)	6,00 (0)	50,00	39,10
23	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	2,00 (-2)	58,82	34,29

Continua...

						...Conclusão
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	I.E. ₂₄ (%)	TS (mN/m)
24	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	10,00 (+2)	64,71	38,18
25	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)	60,00	42,02
26	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)	60,00	39,74
27	10,00 (0)	10,00 (0)	6,00 (0)	6,00 (0)	53,33	37,68

X₁ – sulfato de amônio (g/L); X₂ – extrato de levedura (g/L); X₃ – extrato de farelo de soja (%); X₄ – óleo de soja (baseado no teor de lipídeos totais); (-) – níveis inferiores; (+) – níveis superiores
 Fonte: Autoria própria

A análise de variância e o coeficiente de determinação do planejamento fatorial completo e o ajuste do modelo baseando-se nas propriedades de emulsificação (I.E.₂₄) e tensoativas (TS) dos biossurfactantes produzidos pela levedura SSS11 podem ser observados na Tabela 21.

Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R²) para o modelo ajustado em função do I.E.₂₄ e TS dos biossurfactantes produzidos pela levedura SSS11 em meio HD no planejamento DCCR do tipo 2⁴ com 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central

Fatores	I.E. ₂₄ (%)					TS (mN/m)				
	SQ	GL	QM	F	p-valor	SQ	GL	QM	F	p-valor
Modelo	436	14	31,14	2,80	0,0408*	58,74	14	4,20	0,48	0,9066
X₁	0,38	1	0,38	0,034	0,8565	7,37	1	7,37	0,84	0,3783
X₂	4,17	1	4,17	0,37	0,5520	0,37	1	0,37	0,042	0,8410
X₃	71,07	1	71,07	6,39	0,0266*	0,062	1	0,062	0,007	0,9345
X₄	25,75	1	25,75	2,31	0,1541	1,60	1	1,60	0,18	0,6773
X₁²	88,56	1	88,56	7,96	0,0154*	13,80	1	13,80	1,57	0,2346
X₂²	4,18	1	4,18	0,38	0,5516	2,38	1	2,38	0,27	0,6145
X₃²	15,73	1	15,73	1,41	0,2575	0,013	1	0,013	0,001	0,9701
X₄²	20,49	1	20,49	1,84	0,1998	11,26	1	11,26	1,28	0,2802
X₁ X₂	0,40	1	0,40	0,036	0,8534	4,02	1	4,02	0,46	0,5121
X₁ X₃	77,97	1	77,97	7,01	0,0213*	0,084	1	0,084	0,009	0,9238
X₁ X₄	7,26	1	7,26	0,65	0,4349	10,69	1	10,69	1,21	0,2922
X₂ X₃	1,81	1	1,81	0,16	0,6939	3,76	1	3,76	0,43	0,5257
X₂ X₄	7,84	1	7,84	0,70	0,4177	6,00	1	6,00	0,68	0,4552
X₃ X₄	61,61	1	61,62	5,54	0,0365*	1,65	1	1,65	0,19	0,6727
Falta de Ajuste	103,90	10	10,39	0,70	0,7151	96,27	10	9,63	2,04	0,3731
Erro Puro	29,66	2	14,83			9,43	2	4,71		
Total	569,56	26				164,44	26			
R²	0,766					0,3571				

X₁ – sulfato de amônio (g/L); X₂ – extrato de levedura (g/L); X₃ – extrato de farelo de soja (%); X₄ – óleo de soja (baseado no teor de lipídeos totais); X₁X₂, X₁X₃, X₁X₄, X₂X₃, X₂X₄ e X₃X₄ – interações entre os fatores; SQ – soma dos quadrados; GL – graus de liberdade; QM – quadrado médio; F – teste F
 Fonte: Autoria própria

A Tabela 22 exibe as estimativas de efeitos dos fatores estudados (coeficientes), erro padrão, t e p-valor para I.E.₂₄ e TS dos biossurfactantes produzido pela levedura SSS11 em meio HD no planejamento DCCR.

Tabela 22 - Estimativa de efeitos dos fatores estudados, erro padrão, t e p-valor para I.E.₂₄ e TS dos biossurfactantes produzidos pela levedura SSS11 em meio HD no planejamento DCCR do tipo 2⁴ com 8 pontos axiais e 3 repetições do ponto central

Fatores	I.E. ₂₄ (%)				TS (mN/m)			
	Efeitos	Erro padrão	t	p-valor	Efeitos	Erro padrão	t	p-valor
X₁	0,252	1,362	0,185	0,856	-1,108	0,886	-1,250	0,338
X₂	0,833	1,362	0,612	0,552	0,248	0,886	0,280	0,806
X₃	-3,442	1,362	-2,527	0,026*	-0,102	0,886	-0,115	0,919
X₄	2,072	1,362	1,521	0,154	0,517	0,886	-0,583	0,619
X₁²	4,075	1,444	2,821	0,015*	-1,608	0,940	-1,711	0,229
X₂²	-0,885	1,444	-0,612	0,552	-0,668	0,940	-0,711	0,551
X₃²	-1,718	1,444	-1,189	0,257	0,492	0,940	0,052	0,963
X₄²	1,960	1,444	1,357	0,200	-1,453	0,940	-1,542	0,262
X₁ X₂	-0,315	1,668	-0,188	0,853	1,002	1,085	0,924	0,453
X₁ X₃	4,415	1,668	2,647	0,021*	0,145	1,085	0,134	0,905
X₁ X₄	1,347	1,668	0,808	0,435	1,635	1,085	1,506	0,271
X₂ X₃	-0,673	1,668	-0,403	0,694	-0,970	1,085	-0,894	0,466
X₂ X₄	-1,400	1,668	-0,839	0,418	-1,225	1,085	-1,129	0,376
X₃ X₄	3,925	1,668	2,353	0,037*	-0,643	1,085	-0,592	0,614

X₁ – sulfato de amônio (g/L); **X₂** – extrato de levedura (g/L); **X₃** – extrato de farelo de soja (%); **X₄** – óleo de soja (baseado no teor de lipídeos totais); **X₁X₂**, **X₁X₃**, **X₁X₄**, **X₂X₃**, **X₂X₄** e **X₃X₄** – interações entre os fatores
Fonte: Autoria própria

Conforme observado nas Tabelas 21 e 22, considerando o I.E.₂₄ como resposta, foram constatados como significativos na análise somente o fator **X₃** (EFS), as interações entre **X₁X₃** (sulfato de amônio e EFS), **X₃X₄** (EFS e óleo de soja) e o termo quadrático **X₁²** (sulfato de amônio), uma vez que apresentaram p-valor < 0,1. Diante desses resultados, pode-se propor um modelo razoável do tipo quadrático para as emulsões dos biossurfactantes obtidos pela levedura em estudo, com um R² de 0,766, que explica 76,60 % da variabilidade dos dados experimentais, um p-valor < 0,1 e uma falta de ajuste do modelo com um F_{tab} (0,70) < F_{calc} (3,29), sendo considerado válido de acordo com os critérios para validação e aceitabilidade de modelos conforme descrito no trabalho de Moldavsky e Cohen (1996). Sendo assim, o modelo pode ser representado algebricamente pela equação polinomial com valores reais abaixo:

$$\text{I.E.}_{24} (\%) = 121,555 - 9,675X_1 + 3,078X_2 - 4,970X_3 - 5,513X_4 + 0,326X_1^2 - 0,070X_2^2 - 0,215X_4^2 - 0,025X_1X_2 + 0,441X_1X_3 - 0,067X_2X_3 - 0,140X_2X_4 + 0,491X_3X_4$$

Onde:

X_1 – concentração de sulfato de amônio (g/L);

X_2 – concentração de extrato de levedura (g/L);

X_3 – concentração de EFS(%);

X_4 – concentração de óleo de soja (baseado no teor de lipídeos totais) (g/L);

X_1X_2 , X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 e X_3X_4 – interações entre os fatores

Observando os valores de efeitos na Tabela 22 e os coeficientes na equação 1, nota-se que o EFS (X_3), efeito principal, é negativo, portanto, deve-se utilizar esse nutriente no menor nível para a obtenção de um biossurfactante com melhor propriedade emulsificante. Esses resultados estão de acordo com a literatura, pois fontes de nitrogênio, como o EFS, devem ser limitantes no processo, uma vez que em elevadas concentrações desfavorecem a produção de biossurfactantes por leveduras, aumentando a massa celular microbiana (DESAI; DESAI, 1993; CASAS; GARCIA-OCHOA, 1999; KIM et al., 2006; FONTES et al., 2010). Já as interações entre os fatores e o termo quadrático não podem ser analisados baseando-se no metabolismo microbiano, nesse caso, devido a sua complexidade.

Com os experimentos do planejamento DCCR, observa-se um valor máximo de 69,49 % no I.E.₂₄ (Tabela 20). Além disso, todas as emulsões obtidas apresentaram aspecto compacto, o que favorece a estabilidade e garante futuras aplicações industriais. Para a otimização numérica da produção de biossurfactantes com propriedades emulsificantes destacadas, utilizou-se a função *desirability*, que indica algumas soluções segundo os critérios de desejabilidade. O *software Design Expert 6 (DX6)*, utilizado no presente trabalho, forneceu duas possíveis soluções, onde o I.E.₂₄ predito é superior a 85 %. A Tabela 23 apresenta a composição dos meios utilizados na otimização e os valores de preditos e reais de I.E.₂₄. Os experimentos foram realizados em triplicata para a validação do modelo polinomial descrito anteriormente.

Tabela 23 - Otimização numérica da produção de biossurfactante pela levedura SSS11 em meio HD de acordo com a função *Desirability*

Fatores				Resposta		
X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃ (%)	X ₄ (g/L)	I.E. ₂₄ real (%)	I.E. ₂₄ predito (%)	Desirability
5	15	2	2	89 ± 3,27	90,70	0,809
15	5	10	10	87 ± 4,02	86,74	0,736

X₁ – sulfato de amônio (g/L); X₂ – extrato de levedura (g/L); X₃ – extrato de farelo de soja (%); X₄ – óleo de soja (baseado no teor de lipídeos totais) (g/L)

Fonte: Autoria própria

De acordo com a Tabela 23, as duas soluções estudadas forneceram valores de I.E.₂₄ satisfatórios para a aplicação industrial e incrementando o valor em aproximadamente 20 unidades de I.E.₂₄. Além disso, as soluções propostas indicaram que o extrato de levedura (X₂), reagente de elevado custo, pode ser fixado no menor nível para composição do meio, uma vez que as emulsões obtidas em meios com 15 e 5 g/L desse componente não se diferenciaram. Resultados similares foram obtidos por Fontes et al. (2010) em experimentos para a otimização do biossurfactante produzido por *Yarrowia lipolitica* baseando-se em suas propriedades emulsificantes e tensoativas. Naquele estudo, os autores conseguiram um biossurfactante com um I.E.₂₄ de 81,3 % em um meio de cultivo composto por 10 g/L de sulfato de amônio e 0,5 g/L de extrato de levedura. Ainda nesse estudo comprovaram que a concentração de extrato de levedura pode ser fixada no menor nível, uma vez que em experimentos utilizando concentrações entre 0,5 e 2,5 g/L dessa fonte nitrogenada não se observou variação significativa nos valores de I.E.₂₄ e TS.

Nas análises onde se considerou a TS como resposta, observou-se no planejamento DCCR do tipo 2⁴, em que a média 38,18 ± 2,51 mN/m, representou melhor o conjunto de dados obtidos, não sendo possível a obtenção de um modelo linear ou quadrático significativo para a explicação da variabilidade experimental na faixa de valores estudados. Também em relação aos experimentos anteriores, notou-se um decréscimo de aproximadamente 42,59 % nas tensões superficiais. Com a otimização numérica a TS em ambos os casos apresentou um valor de aproximadamente 34,13 ± 3,26 mN/m. Sendo assim, nas condições estudadas até o momento, de acordo com Cooper e Paddock (1984), a levedura SSS11 pode ser considerado uma promissor microrganismo produtor de biossurfactante uma vez que produz compostos tensoativos com TS inferior a 40 mN/m.

Além das propriedades emulsificantes e tensoativas, pode-se notar nas fermentações do planejamento fatorial DCCR, aromas cítricos e frutais, indicadores de que durante o bioprocessos foram produzidos alguns bioaromas (*bioflavors*) ou aromas microbianos. Na literatura há relatos de produção de aromas microbianos em fermentações utilizando farelo de soja como substrato (ROSSI, 2011). O presente indicativo por vir a auxiliar trabalhos futuros de produção de biossurfactantes concomitantemente com bioaromas, assim produzindo dois produtos com alto valor agregado, o que é de grande interesse industrial.

6. CONCLUSÃO

- É possível produzir biossurfactantes por leveduras assimiladoras de xilose em meios de cultivo suplementados com o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado;
- Os biossurfactantes produzidos pelas leveduras em estudo no meio de cultivo suplementado com o hidrolisado hemicelulósico apresentaram propriedades emulsificantes e tensoativas destacadas para futuras aplicações industriais;
- As leveduras cultivadas em meio de cultivo suplementado com o hidrolisado hemicelulósico e em meio sintético com xilose produziram biossurfactantes do tipo glicolipídico;
- Os biossurfactantes glicolipídicos produzidos por algumas leveduras em meio de cultivo suplementado com hidrolisado hemicelulósico destoxificado apresentaram atividade larvicida contra *A. aegypti*;
- A levedura SSS11 produziu em meio suplementado com hidrolisado hemicelulósico destoxificado um soforolipídeo com destacadas propriedades emulsificantes;
- Em condições nutricionais otimizadas, o biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio de cultivo, onde a principal fonte de carbono é o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, apresentou I.E.₂₄ de 86 a 90 % e TS de 34 mN/m, sendo considerado um promissor bioproduto para aplicações industriais.

7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros espera-se que as seguintes etapas sejam realizadas:

- O biossurfactante produzido pela levedura SSS28 em meio HD e que apresentou elevada atividade larvica contra *A. aegypti* possa ser caracterizado físico-química e estruturalmente para posterior aplicação;
- Os biossurfactantes produzidos em meio HD possam ser purificados por meio de processo de ultrafiltração, obtendo-se um produto com elevada pureza para aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos;
- O biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD possa ser submetido a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para a determinação de sua massa molar e os ácidos graxos componentes de sua fração hidrofóbica;
- O biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD com as melhores condições nutricionais estabelecidas possa ter seus fatores físico-químicos estudados e otimizados em biorreatores visando o escalonamento do processo;
- Os biossurfactantes produzidos em meio HD possam aplicações diferenciadas das já encontradas na literatura, agregando valor e ampliando ainda mais a versatilidade desses bioprodutos como futuras alternativas as biorrefinarias lignocelulósicas multiprodutos.

REFERÊNCIA

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWABA, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Characterization of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 329–345, 2009.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 1, p. 313–316, 2000.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food Microbiology**. London: RCS Publishing, 2008.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na Biodegradação de Materiais Lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlativas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.

AIELLO, C.; FERRER, A.; LEDESMA, A. Effect of alkaline pre-treatment at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM-9414. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 13–16, 1996.

ALBANO, T.J.S. **Development of production processes for new-to-nature biosurfactants**. 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Instituto Técnico de Lisboa, 2014.

ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. Initial steps of soforose lipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 46:67, 1996.

Alquilbenzenos. Disponível em: < <http://www.deten.com.br/Pesquisar?q=Alquilbenzeno>>. Acesso: Novembro, 2013.

ALVES, L.A.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; SILVA, S.S.; PRATA, A.M.R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 89–98, 1998.

ANDERSON, R. Fermentation and Maturation. In:EBC Technology and Engineering Forum. Germany, 1992.

ANTUNES, M.S. Estudo à microscopia eletrônica da estabilidade física de emulsões lipídicas utilizadas em misturas 3 em 1. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 22, p. 43–53, 2007.

ARAÚJO, L.V.; FREIRE, GUIMARÃES, D.F.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 6, 2013.

ASAMI, D.K.; HONG, Y.J.; BARRET, D.M.; MITCHELL, A.E. Processing induced changes in total phenolics and procyanidins in clingstone peaches. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 1, p. 56-63, 2003.

ASMER, H.J.; LANG, S; WAGNER, F.; WRAY, V. Microbial-production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 65, n. 1, p. 1460–1466, 1988.

ATKINS, P.W.; JONES, Loretta. Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

ATWOOD, D.; FLORENCE, A. T. Surfactants systems: their chemistry, pharmacy and biology. Chapman and Hall. London. 1985.

BALATTI, A.P. **Producción de inoculantes para leguminosas**. 1992. 152 f. Tesis. Facultad de Ciências Exactas y Naturales – Universidad Nacional de La Pampa, Argentina, 1992.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495–508, 2000.

BANAT, P.I.M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, v. 2000, n. 198, p. 44–47, 2000.

BARBOSA, L.C.A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora UFV. 2011.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v.97, n.6, p.868-875, 2006.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PLASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 15–18, 2004.

BEDNARSKI, W.; NARWOJSZ, M.; ADAMCZAK, M.; NAWOTKA, R. Carbon-source-dependent synthesis and composition of biosurfactant synthesized by *Pseudozyma antarctica*. **Environmental Biotechnology**, v. 2, n.1, p. 31-36, 2006

BENITO, I.; GARCIA, M.A.; MONGE, C.; SAZ, J.M.; MARINA, M.L. Spectrophotometric and conductimetric determination of the critical micellar concentration of sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide micellar systems modified by alcohols and salts. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 125, n. 2–3, p. 221–224.

BIOSURFACTANTS market - global scenario, raw material and consumption trends, industry analysis, size, share and forecasts 2011 – 2018. Disponível em: < <http://www.transparencymarketresearch.com/biosurfactants-market.html>>. Acesso: Julho de 2014.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1, p. 41-52, 1999.

BORSATO, D.; GALÃO, O. F.; MOREIRA, I. Detergentes naturais e sintéticos: um guia técnico. Londrina: Eduep, 1999.

BOUFFIOUX, O.; BERQUAND, A.; EEMAN, M.; PAQUOT, M.; DUFRÊNE, Y.F.; BRASSEUR, R.; DELEU, M. Molecular organization of surfactin–phospholipid monolayers: Effect of phospholipid chain length and polar head. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 7, p. 1758–1768, 2007.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, p. 295-302, 2007.

BRANDT, K.K.; HESSELSON, M.; ROSLEV, P.; HENRIKSEN, K.; SORENSEN, J. Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on metabolic activity, growth rate, and microcolony formation of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2489–2498, 2001.

BRECCIA, J.D.; BETTUCCI, L.; PIAGGIO, M.; SINERIZ, F. Degradation of sugarcane bagasse by several white-rot fungi. **Acta Biotechnology**, v. 17, p. 177–184, 1997.

CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J.T.; VELOSO, R.G.; NUNES, P.M.M. Taxas de digestão das frações protéicas e de carboidratos para as silagens de milho e de capim-elefante, o feno de capim-tifton-85 e o farelo de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1573-1580, 2004.

CALDERON, F.; POULIN, P. Progress in understanding emulsion metastability and surface forces. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 4, p. 223-230, 1999.

CALDWELL, A.; BRITZ, S.J.; MIRECKI, R.M. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grown in controlled environments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1125-1129, 2005.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. Effect of different pretreatment of sugar cane bagasse on cellulase and xylanases production by the mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 Grown in Submerged Culture. **BioMed Research International**, Article ID 720740, 2014.

CAMEOTRA, S.S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 16, p. 1-7, 2009.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T.L.; SARUBBO, L.A.; DE LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1097–1108, 2013.

CANETTIERI, E.V.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, p. 323-331, 2002.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.; ROCHA, G.J.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467–1475, 2011.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; SILVA, S.S.; PEREGO, P.; CONVERTI A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochemical Engineering**, v. 25, p. 25–31, 2005.

CASAS, J.; GARCIA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 488–494, 1999.

CASTANHA, R.F. **Utilização de soro de queijo para a produção de lipídeos por leveduras oleaginosas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2012.

CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATEGICOS (CGEE). Ministério da Ciência e Tecnologia. **Relatório**. Brasília, 2010. Relatório.

CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. **Environmental Progress**, v. 27, n. 1, p. 51–57, 2008.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 2, n. 12, p. 6942-6953, 2010.

CHAUD, L.C.S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

CHAUD, L.C.S.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Nucleus**, v. 6, n. 2, 2009.

CHAYABUTRA, C.; JU, L.K. Polyhydroxyalkanoic acids and rhamnolipids are synthesized sequentially in hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 3, p.419–423, 2001.

CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.; GEB, J.; XU, J. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105–109, 2008.

CHRISTOPHERS, S.R. *Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics, and structure. London: Cambridge University Press, 1960.

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.4, p.747-750, 1984.

CLIC MERCADO – corretora de mercadorias:

<<http://www.clicmercado.com.br/novo/cotacoes/buscacot.asp>> acessado em agosto de 2016.

COIMBRA, C.D.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. **Current Microbiology**, v. 58, p. 245–251, 2009.

COLEGATE, S.M.; MOLYNEUX, R.J. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. Boca Raton: CRC, 1993.

COMASSETO, J. V. A reunião da Química e da Biologia. In: MARSAIOLI, A, PORTO, A. L.. (Org.). Biocatálise e Biotransformação Fundamentos e Aplicações. Salto: Schoba, 2010, v. 1.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento em <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso: Março de 2016.

COOPER, D.G. Biosurfactants. **Microbiology Science**, v. 3, p. 145–149, 1986.

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173–176, 1984.

CORTEZ, L.A.B. **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2010.

COWAN, M.K.; TALARO, K.P. Microbiology: A Systems Approach. New York: McGraw-Hill, 2012.

CRUZ, J. M. M. Produção de Cerveja. In: FONSECA, M. M; TEIXEIRA, J. A. (ed). Reactores Biológicos. Lisboa: Lidel, 2007.

CUNHA, R.E.P. **Modelagem matemática de separação gravitacional de emulsões de petróleo**. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes de Aracajú, 2007.

DA ROS, L.; NASCI, C.; CAMPESAN, G.; SARTORELLO, P.; STOCCO, G.; MENETTO, A. Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and cadmium in the digestive gland of mussel, *Mytilus* sp. **Marine Environmental Research**, v. 39, n. 1–4, p. 321–324, 1995.

DALTIN, D. **Tensoativos: Química, Propriedades e Aplicações**. São Paulo: Edgar Blucher. 2011.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1675–1684, 2008.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 1, p.663–674, 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.

DEHGHAN-NOUDEH, G.; HOUSAINDOKHT, M.; BAZZAZ, B.S.F. Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **The Journal of Microbiology**. v. 43, n. 3, p.272-276, 2005.

DELBEKE, E.I.P; ROMAN, B.I.; MARIN, G.B.; VAN GEEM, K.M.; STEVENS, C.V. A new class of antimicrobial biosurfactants: quaternary ammonium sophorolipids. **Green Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 3373-3377, 2015.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 220–225, 1996.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Ed.) **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: CRC Press, 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.

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 143–150, 1995.

DOHERTY, W.O.S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C.M. Value-adding cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n., p. 259-276, 2011

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DWIVEDI, S.; SAQUIB, Q.; AL-KHEDHAIRY, A.A.; AHMAD, J.; SIDDIQUI, M.A.; MUSARRAT, J. Rhamnolipids functionalized AgNPs-induced oxidative stress and modulation of toxicity pathway genes in cultured MCF-7 cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 132, p. 290-298, 2015.

ELLNER, K.; MCBRIDE, M. E.; ROSEN, T.; BERMAN, D. Prevalence of *Trichosporon beigelii*. colonization of normal perigenital skin. **Journal of Medicine and Veterinary Mycology**, v. 29, p. 99-103, 1993.

FALLER, A.L.K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

FARIA, N.T.; MARQUES, S.; FERREIRA, C.; FERREIRA, F.C. Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048(T). **Enzyme, Microbiology and Technology**, v. 71, p.58-65, 2015.

FARIA, N.T.; SANTOS, M.; FERREIRA, C.; MARQUES, S.; FERREIRA, F.C.; FONSECA, C. Conversion of cellulosic materials into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma* spp. under SHF and SSF processes. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 155, p. 1-13, 2014.

FARIA, S.A.S.C. **Caracterização de farelos de arroz irrigado e de sequeiro submetidos a diferentes técnicas de estabilização**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

FELIPE, M. G. A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 171–177, 1995.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* grown in a sugarcane bagasse hydrolysate: effect of aeration and inoculum adaptation. **Acta Biotechnologica**, v. 16, p. 73–79, 1996.

FERNANDES, P. A. V.; ARRUDA, I.R.; SANTOS, A.F.A.B.; ARAÚJO, A.A.; MAIOR, A.M.S.; XIMENES, E.A. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 704–709, 2007.

FERNANDO S.; ADHIKARI S.; CHANDRAPAL C.; MURALI N. Biorefineries: Current Status, Challenges and a Future Direction. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 4, p. 1727-1737, 2006.

FERREIRA, A.D. **Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 111 f.

Dissertação (Mestrado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2010.

FERREIRA, G.D.G.; BARRIÈRE, Y.; EMILE, J.C.; JOBIM, C.C. Caracterização morfo-anatômica do colmo de genótipos de milho. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 230, p. 237-246, 2011.

FLASZ, A.; ROCHA, C.A.; MOSQUERA, B.; SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Medical Science Research**, v. 26, n. 3, p. 181-185, 1998.

FLORENCE, A.T.; WHITEHILL, D. The formulation and stability of multiple emulsions. **International Journal of Pharmacy**, v. 11, p. 277-308, 1982.

FONSECA, B.G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2009.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biosurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, 2008.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, M.A.Z. Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 821306, 2010.

FUKUI, S.; TANAKA, A. Metabolism of alkanes by yeasts. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 19, p. 217-237, 1981.

GANESH, K.C.; MAMIDYALA, S.K.; BISWANATH DAS, B.; SRIDHAR, B.; DEVI, G.S.; KARUNA, M.S. Synthesis of Biosurfactant-Based Silver Nanoparticles with Purified Rhamnolipids Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n.7, p. 1061-1068, 2010.

GEETHA, I.; KUMMANKOTTIL, P.P.; MANONMANI, A.M. Mosquito adulticidal activity of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* subsp *subtilis*. **Pest Management Science**, v. 68, n. 1, p. 1447-1450, 2012.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry (A Mini-Review). **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 1, p. 58-69, 2011.

GINORIS, Y.P. **Avaliação de tratamentos do hidrolisado de eucalipto para a produção biotecnológica de xilitol**. 2001. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnología Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena, 2001.

GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicellulose for fuel ethanol: A review, **Bioresource Technology**. v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GLOBAL biosurfactants market by product (rhamnolipids, sophorolipids, mes, apg, sorbitan esters, sucrose esters) expected to reach usd 2,308.8 million by 2020. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-biosurfactants-market>>.

Acesso: Novembro de 2015.

GOSWAMI, P.; SINGH, H. D. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 1, p. 1–11, 1991.

GUILARDUCI, V.V.; MESQUITA, J.P.; MARTINELLI, P.B.; GORGULHO, H.F.. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1226–1232, 2006.

GUPTE, A.; MADAMWAR, D. High strength cellulase and beta-glucosidase formation from *Aspergillus* sp. under solid state fermentation. In: PANDEY, A. (ed). Solid State Fermentation. New Delhi: Wiley Eastern Publishers, 1994.

GURGEL, P.V.; MANCILHA, I.M.; PECANHA, R.P.; SIQUEIRA, J.F.M. Xylitol recovery from fermented sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 52, p. 219–223, 1995.

GUSMÃO, C.; RUFINO, R.; SARUBBO, L. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1683–1692, 2010.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal Applied Microbiology**, v.88, p.379-387, 2000.

HAIGH, S. D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. **Science of The Total Environment**, v. 185, n. 1–3, p. 161–170, 1996.

HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384–410, 2005.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1207-1218, 2012.

HENDRIKS, A.T.W.M., ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 1, p.10-18, 2009.

HINNEBURG, I.; NEUBERT, R.H. Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 3-7, 2005.

HOMMEL, R.K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RILKE, O.; KLEBER, H.P. Production of sophorose lipid by *Candida (Yorulopsis) apicola* grown on glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 33, n. 2, p.147-55, 1994.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J.N.; GRIFFIN, W.M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 243–248, 1990.

HOWARD, L.R.; CLARK, J.R.; BROWNMILLER, C. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 12, p. 1238-1247, 2003.

HUNTER, R.J. Introduction to modern colloid science. New York: Oxford University Press. 1992.

HYUN, J.W.; CHUNG, H.S. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo* mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.2213-2217, 2004.

IZARD, J.; LIMBERGER, R.J. Rapid screening method for quantification of bacterial cell lipids from whole cells. **Journal of Microbiology Methods**, v. 55, n. 2, p. 411-418, 2003.

JAIN, A. Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 705–709, 1995.

JESUS, J.P.F. **Desenvolvimento de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* lange (imbach) (“champignon de paris”) em diferentes formulações de composto e meios de cultura.** 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Departamento de Agronomia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2011.

JIAN, Y.; HEIKO, S. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8042–8048, 2008.

JONSSON, L.J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, p. 1-10, 2013.

JOSHI-NAVARE, K.; SINGH, P.K.; PRABHUNE, A. New yeast isolate *Pichia caribbica* synthesizes xylolipid biosurfactant with enhanced functionality. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 116, n. 2, p. 1070 – 1079, 2014.

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. In: JULIANO, B.O. (Ed.). Rice: chemistry and technology. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1985.

KAPPELI, O.; FINNERTY, W.R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of Bacteriology**, v. 140, n. 2, p. 707-712, 1979.

KATEMAI, W.; MANEERAT, S.; KAWAI, F.; KANZAKI, H.; NITODA, T.; KITTIKUN, A.H. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Issatchenkia orientalis* SR4. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 79- 82, 2008.

KATZEN, R.; FOWLER, D.E. Ethanol from lignocellulosic wastes with utilisation of recombinant bacteria. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 45–46, n. 1, p. 697–707, 1994.

KAWASHIMA, H.; NAKAHARA, T.; OOGAKI, M.; TABUCHI, T. Extra-cellular production of a mannosyl-erythritol lipid of a mutant of *Candida* sp. from n-alkanes and triacylglycerols. **Journal of Fermentation and Technology**, v. 61, p. 143–148, 1983.

KHAN, Q.A.; HADI, S.A. Inactivation and repair of bacteriophage lambda by furfural. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 379–85, 1994.

KIM, H.S.; JEON, J.W.; KIM, B.H.; AHN, C.Y.; OH, H.M.; YOON, B.D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. **Applied Microbiololy and Biotechnology**, v. 70, p. 391-396, 2006.

KIRSCHNER, Z.I.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D. Incorporation of P32 and growth of *Pseudomonas* UP-2 on n-tetracosane. **Applied Environmental Microbiololy**, v. 40, p. 1086-1093, 1980.

KNOBLICH, A.; MATSUMOTO, M.; ISHIGURO, R.; MURATA, K.; FUJIYOSHI, Y.; ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M. Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, an anionic lipopeptide. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 5, p. 43-48, 1995.

KOKAL, S. Crude oil emulsions: a state-of-the-art review. In: **SPE annual technical conference and exhibition Proceedings (SPE 77947)**. San Antonio, Texas, EUA, 2002.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E.L.; PICKFORD, R.; DERRICK, J.P.; LAMERS, G.E.M.; THOMAS-OATES, J.E.; LUGTENBERG, B.J.J.; BLOEMBERG, G.V. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptidebiosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 97–113, 2004.

KULAKOVSKAYA, T.V.; GOLUBEV, W.I.; TOMASHEVSKAYA, M.A.; KULAKOVSKAYA, E.V.; SHASHKOV, A.S.; GRACHEV, A.A.; CHIZHOV, A.S.; NIFANTIEV, N.E. (2010). Production of antifungal cellobiose lipids by *Trichosporon porosum*. **Mycopathologia**, v. 169, p. 117–123, 2010.

LANG, S.; WAGNER, F. Structures and properties of biosurfactants. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (Ed). **Biosurfactants and biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc, 1987, p. 21–45.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 1036–1043, 2010.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 5, p. 367–380, 2002.

LEVI, R.M. **Aplicação de leveduras no controle de *Penicillium expansum***. 2003. 100 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina, 2003.

LINDNER, A. **Síntese de surfactantes altamente biodegradáveis pela transesterificação de ésteres de ácidos graxos com sacarose**. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

LIU, W.; ZHU, W.; LU, Y.; KONG, J.; Ma, G. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* S1409. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 331–336, 1988.

LIU, Z.L. Molecular mechanism of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 809–25, 2011.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, n. 4, p. 255–261, 2009.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J.; ROGERS, P.L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as a source of yeast autolysates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 52–56, 2003.

LYSSANT, K. Emulsions and Emulsions Technology. Surfactant Science Series. Volume 6, New York. 1974.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M; TAKAKU, L; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C. BRACCO, J.E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 703–708, 2003.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428–434, 2002.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1; p. 1–19, 2011.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 87–93, 2001.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso: Março de 2016.

MAROVA, I.; CARNECKA, M.; HALIENOVA, A.; CERTIK, M.; DVORAKOVA, T.; HARONIKOVA, A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. **Journal of Environmental Management**, v.95, p.S338-S342, 2012.

MARTÍNEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; WELLS, M.L.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology progress**, v. 17, n. 2, p. 287–293, 2001.

MARTINIANO, S.E.; CHANDEL, A.K.; SOARES, L.C.S.R.; PAGNOCCA, F.C. ; SILVA, S.S. Evaluation of novel xylose-fermenting yeast strains from Brazilian forests for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse. **Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 345-352, 2013.

MARTON, J.M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena, 2002.

MAYORGA-REYES, L.; MORALES, Y.; SALGADO, L.M.; ORTEGA, A.; PONCE-LOYOLA, T. *Cellulomonas flavigena*: characterization of an endo-1,4-xylanase tightly induced by sugarcane bagasse. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 205–209, 2002.

MEESTERS, P.A.E.P.; HUIJBERTS, G.N.M.; EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, n. 2, p. 575-79, 1996.

MENDKI, M.J.; GANESAN, K.; PRAKASH, S.; SURYANARAYANA, M.V.S.; MALHOTRA, R.C.; RAO, K.M.; VAIDYANATHASWAMY. R. Heneicosane: an oviposition-attractant pheromone of larval origin in *Aedes aegypti* mosquito. **Current Science**, v. 78, p. 1295-1296, 2000.

MIDDELHOVEN, W. J.; SCORZETI, G.; FELL, J. W. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeasts genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabueorum* and *T. gamsii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 975-986, 2004.

MILAGRES, A.M.F.; LACIS, L.S.; PRADE, R.A. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 15, p. 248–253, 1993.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylle acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 11, p. 426-428, 1959.

MIRA, N.V.M.; BARROS, R.M.C.; SCHIOCCHET, M.A.; NOLDIN, J.A.; LANFERMARQUEZ, U.M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Food Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 994-1002, 2008.

MOLDAVSKY, N.; COHEN, S. Determinants of liposome partitioning in aqueous two phase systems: evaluation by means of a factorial design. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, p.529-537, 1996.

MONTEIRO, A.S.; COUTINHO, J.O.P.A.; JÚNIOR, A.C.; ROSA, C.A.; SIQUEIRA, E.P.; SANTOS, V.L. Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 553–563, 2009.

MOO YOUNG, M.; CHISTI, Y; VLACH, D. Fermentation of cellulosic materials to mycoprotein foods. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 469–479, 1993.

MORAIS, G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para o tratamento da celulite**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2006.

MORIMITSU, Y.; KUBOTA, K.; TASHIRO, T.; HASHIZUME, E.; KAMIYA, T.; OSAWA, T. Inhibitory effect of anthocyanins and colored rice on diabetic cataract formation in the rat lenses. **International Congress Series**, v. 1245, p. 503-508, 2002.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALES, B.; ELAND, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Factors Influencing the Economics of Biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Ed.) *Biosurfactants: production, properties, applications*. New York: CRC Press, 1993. p. 19-98.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NIGAM, P.S.; GUPTA, N.; ANTHWAL, A. Pre-treatment of agro-industrial residues. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**, v. 1, p. 13–33, 2009.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 252–259, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NOORDMAN, W.H.; WACHTER, J.H.; DE BOER, G.J.; JANSSEN, D.B. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 195–212, 2002.

OBERBREMER, A.; MÜLLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 485–489, 1990.

PAL, M.; CALVO, A.M.; TERRON, M.C.; GONZALEZ, A.E. Solid state fermentation of sugar cane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 541–545, 1995.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17–24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000b.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PARAMAN I.; HETTIARACHCHY N.S.; SCHAEFER C.; BECK M.I. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein. **Cereal Chemistry**, v. 84, p. 343–349, 2007.

PATRICIA, B.; JEAN-CLAUDE, B. Involvement of bioemulsifier in heptadecane uptake in *Pseudomonas nautica*. **Chemosphere**, v. 38, n. 5, p. 1157–1164, 1999.

PEKIN, G.; VARDAR-SUKAN, F.N.K. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using turkish corn oil and honey. **Engineering and Science of Life**, v. 5, p. 357–362, 2005.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management and Innovation**, v. 2, n. 1, 2007.

PENTEADO, J.; SEOUD, A.; CARVALHO, L. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. **Química Nova**, v. 29, n. 5, 2006.

PEREIRA, J.; BROCARD-LIMA, G.A.; BEITLER, B.; CHAMONE, D.A.F. Utilização de saponina em citometria de fluxo: uma alternativa factível para permeabilização celular. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 109–113, 2007.

PESSOA, A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugarcane hemicellulose hydrolysate for microbial protein production. **Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 83–88, 1996.

PIEROZZI, M.; GIESE, E.C.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A. SILVA, S.S. Seleção de leveduras produtoras de celulasas e xilanases isoladas de reservas naturais brasileiras. In:

Anais XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. São José dos Campos, São Paulo, BRASIL, 2011.

PINZON, N.M; JU, L.K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 975–981, 2009.

QING, Q.; LI, H.; KUMAR, R.; WYMAN, C.E. Xylooligosaccharides production, quantification, and characterization in context of lignocellulosic biomass pretreatment. In: WYMAN, C. E., **Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals**, Wiley Series, 2013.

RANDHWA, K.K.S.; RAHMAN, P.K.S.M. Rhamnolipid biosurfactants – past, present and future scenario of global market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-7, 2014.

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, 2005.

RAVINDRAN, R., JAISWAL, A.K. A Comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92-102, 2015.

RAWLINS, S.; WAN, J.O.H. Resistance in some Caribbean population of *Aedes aegypti* to several insecticides. **Journal American Mosquitul Control Association**, v. 11, p.59-65, 1995.

RAY, L.; PAL, A.; GHOSH, A.K.; CHATTOPADHYAY, P. Cellulases and beta-glucosidase from *Aspergillus niger* and saccharification of some cellulosic wastes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 85–94, 1993.

RECKE, V.K.; GERLITZKI, M., HAUSMANN, R.; SYLDATK, C.; WRAY, V; TOKUDA, H.; NOBUTAKA SUZUKI, N.; LANG, S. Enzymatic production of modified 2-dodecyl sophorosides (biosurfactants) and their characterization. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 4, p. 452 – 463, 2013.

REDDY, P. G.; SINGH, H.D.; ROY, P.K.; BARUAH, J.N. Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 6, p. 1241–1269, 1982.

RIEGER, C.; OLIVEIRA, V.; LOVATTO, P.A.; ARAUJO, J.S.; PEIXOTO, E.; C. M. Características químicas e valores energéticos de farelos de soja do oeste e sudoeste do Paraná. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 266-269, 2008.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILLO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de Biodiesel. **Biociência & Desenvolvimento (Online)**, v. 37, p. 44-51, 2008.

RIZZATTI, I.M. Construção de eletrodos de membrana seletiva para surfactante e eletrodos para brometo para aplicação em estudo potenciométrico de interações entre dodecilsulfato de sódio e polióxido etileno. 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado em

Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

RIZZATTI, I.M.; ZANETTE, D.R. e MELLO, L.C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Química Nova**, v. 32, p. 518–521, 2009.

ROBERTO, I.C.; LACIS, L.S.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, n.1, p. 15–21, 1991.

ROBERTO, S.M. Remoção de surfactantes em efluentes industriais. UFSC, 2000.

ROBINSON, J.M.; BRITZ, S.J. Tolerance of a field grown soybean cultivar to elevated ozone level is concurrent with higher leaflet ascorbic acid level, higher ascorbate-dehydroascorbate redox status, and long term photosynthetic productivity. **Photosynthesis Research**, v. 64, n. 1, p. 77-87, 2000

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L.; TEODORO, J.; OSS, J.F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. A new alternative to produce gibberellic acid by solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 181-188, 2009.

RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R.; DIAZ CERVANTES, D. Effect of chemical solutions sprayed on sugarcane bagasse pith to produce single cell protein – physical and chemical analysis of pith. **Bioresource Technology**, v.47, p.159–164, 1994.

ROJAN, P.J.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 759–763, 2006.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249–252, 2002.

ROSEN, M. J. Surfactants and Interfacial Phenomena. 3 ed. John Wiley & Sons. 2004.

ROSENBERG, E.; ZUCKERBERG, A.; RUBINOVITZ, C.; GUTNICK, D.L. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 402–408, 1979.

ROSSEL, C.E.V. **Conversion of lignocellulose biomass (bagasse and straw) from sugar-alcohol industry into bioethanol: Industrial perspectives for bioethanol**. Ed. Telma Franco. 2006.

ROSSI, C.G.F.T.; DANTAS, T.N.C.; DANTAS NETO, A.A.; MACIEL, M.A.M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 25, n. 1-2, p. 59-71, 2006.

ROSSI, S.C. **Produção de aromas frutais por *Ceratocystis fimbriata* cultivado em polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana por fermentação no estado sólido – determinação da atividade de pectinase (poligalacturonase), esterases e lipases.** 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; GEOFFROY, F.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B.K. Efficient leaching of cellulases produced by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation. **Biotechnology Technology**, v. 6, p. 429–432, 1992.

RUFINO, R.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 729–734, 2007.

RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. 2007. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 729–734, 2007.

RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 907–914, 2008.

SAIKIA, J.P.; BHARALI, P.; KONWAR, B.K. Possible protection of silver nanoparticles against salt by using rhamnolipid. **Colloids Surface B: Biointerfaces**, v. 104, n. 1, p. 330–332, 2013.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 5, p. 315–318, 1988.

SANTOS, B. N.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, S.; PARENTE, A.; FRANÇA, Í. W. L. DE; MELO, V. M. M.; BATISTA, H.; GONÇALVES, L. R. B. Estabilidade de biossurfactante bacteriano do tipo lipopeptídeo frente às variações de temperatura, pH e concentrações salinas. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014**. Florianópolis, Santa Catarina, BRASIL, 2014.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SARROUH, B. **Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leito fluidizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar e células imobilizadas: Avaliação de parâmetros operacionais e viabilidade econômica.** 2009. 185 f. Tese (Doutorado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2009.

SCHEIDT, W. F.; BOMBARDELLI, C. Estudo da cinética em processos fermentativos através da condutividade elétrica. In: **Resumos do 4º Encontro nacional de tecnologia Química**. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, BRASIL, 2011.

SCHELLER, H.V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annuals Reviews of Plant Biology**. v. 61, p. 263-289, 2010.

SCHLUETER, R.; LIPPMANN, R.; HAMMER, E.; GESELL SALAZAR, M.; SCHAUER, F. Novel insights into the fungal oxidation of monoaromatic and biaryllic environmental pollutants by characterization of two new ring cleavage enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n.11, p.5043-5053, 2013.

SEKHON, K.K. Biosurfactant Production and Potential Correlation with Esterase Activity. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 03, n. 07, p. 1-10, 2012.

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.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in food. **Journal of Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 207-217, 1995.

Sigma Aldrich:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Yeast+Extract&interface=Product%20Name&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&lang=pt®ion=BR&focus=productN=0%20220003048%20219853286%20219853075>> acessado em Agosto de 2016

SILVA S.S.; CHANDEL, A.K.; **Biofuels in Brazil: fundamental aspects, recent developments, and future perspectives**. 1 ed. Springer, 2014.

SILVA, D.D.V; CANDIDO, J.; ARRUDA, P.V.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. New culture medium for bioconversion of C5 fraction from sugarcane bagasse using rice bran extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1469-1475, 2014.

SILVA, V.L.; LOVAGLIO, R.B.; VON ZUBEN, C. J.; CONTIERO, J. Rhamnolipids: solution against *Aedes aegypti*? **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1-5, 2015.

SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. In: TIMMIS, K. N. (ed). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010.

SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: TIMMIS, K. N. (ed). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010.

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

SOCOL, C.R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J.M. Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 41, p. 286–290, 1994.

SOETAERT, Wim. Introduction to Biosurfactants. Berlim, Biosurfactants workshop – BioTic, 2014. (Comunicação Oral/Palestra)

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

SOUSA, J. R.; CORREIA, J.A.; MELO, V.M.; GONÇALVES, L.R.B.; CRUZ, A.J. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 431-441, 2014.

SOUZA, O.C. **Caracterização queratinolítica, xilanolítica e otimização da produção de xilanases por culturas de Trichosporon**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

STALMANS, M.; BERENBOLD, H.; BERNA, L.; CAVALLI, L.; DILLARSTONE, A.; FRANKE, M.; HIRSINGER, F.; JANZEN, D.; KOSSWIG, K.; RAPPERT, T.; RENTA, C.; SCHARER, D.; SCHICK, K.P.; SCHUL, W.; THOMAS, H.; VANSLOTEN, R. European life-cycle inventory for detergent surfactants production. **Tenside, surfactants, detergents**, v. 32, n. 2, 1995.

STEVENS, B.J.H.; PAYNE, J. Cellulase and Xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon*. **Journal of General Microbiology**, v. 100, p. 381 – 393, 1977.

TEUNISSEN, M.J.; DEKORT, G.V.M.; DENCAMP, H.J.M.O.; TVELD, J.H.J.H.I. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. on different substrates. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p.1657–1664, 1992.

THANIYAVARN, J.; CHIANGUTHAI, T.; SANGVANICH, P.; ROONGSAWANG, N.; WASHIO, K.; MORIKAWA, M.; THANIYAVARN, S. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. **Bioscience: Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, p. 2061–2068, 2008.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; KAYAHARA, H. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4808-4813, 2004.

TOSMANI, A.; FAJARDO, C.; BARRIOS-GONZALEZ, J. Gibberillic acid production using different solid state fermentation systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 203–206, 1997.

TULLOCH, A.P.; J.F.T. SPENCER; P.A.J. GORIN. The fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, p. 1326–1338, 1962.

UBBINK, J.; SCHÄR-ZAMMARETTI, P. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, n. 4, p. 263–270, 2007.

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of mono-and di-succinoyltrehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Agricultural and biological chemistry**, v. 53, n. 3, p. 757–763, 1989.

VALDUGA, E.; OLIVEIRA, T.P.; TREICHEL, L.; TONIAZZO, H.; ZENI, G.; DI LUCCIO, J.; FÚRIGO, A. Carotenoids production: microorganisms as source of natural dyes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VAN DYKE, M.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 241–252, 1991.

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

VASILJEVIC, D.; VULETA, G.; PRIMORAC, M. The characterization of the semi-solid W/O/W emulsions with low concentration of the primary polymeric emulsifier. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, p. 81 – 87, 2005.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, n. 12, p. 5095–5108, 2010.

VILLA, P. Influence of phenolic compounds on the bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 2, 1998, Porto-Portugal.

VILLARREAL, M.L.M. **Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de resíduos de eucalipto, com carvão ativo e resinas de troca iônica, para a produção de xilitol**. 2005. 132p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena, 2005.

WADEKAR, S.D.; KALE, S.B.; LALI, A.M.; BHOWMICK, D.N.; PRATAP, A.P. Utilisation of Sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, p. 125-142, 2010.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L.A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WEBER, L.; DOGE, C.; HAUFE, G. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. **Biocatalysis**, v. 5, p.267-272, 1992.

WIRTH, M.C.; GEORGHIOU, G.P. Selection and characterization of temephos in a population *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Island. **Journal American Mosquit Control Association**, v.15, p.315-320, 1999.

WOOLLETT, L. L.; HENDRICK, L. R. Ecology of yeasts in polluted water. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 36, p. 427-435, 1970.

ZAYED, G.; MOSTAFA, N. Studies on the production and kinetic aspects of single cell protein from sugarcane bagasse saccharified with *Aspergillus niger*. **Biomass Bioenergy**, v. 3, p. 363-367, 1992.

ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3276-3282, 1992.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.849-868, 2002.

ZINI, E.; GAZZANO, M.; SCANDOLA, M. Glycolipid biomaterials: solid-state properties of a poly(sophorolipid). **Macromolecules**, v. 41, n. 1, p.7463-7468, 2008.

ZINJARDE, S.S.; CHINNATHAMBI, S.; LACHKE, A.H.; PANT, A. Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. **Letters Applied Microbiology**, v. 24, p. 117-121, 1997.

ZINJARDE, S.S.; GHOSH, M. Production of surface active compounds by biocatalyst technology. In: RAMKRISHNA, S. (Ed). **Biosurfactants**. New York: Springer Science, 2010.

ZINJARDE, S.S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, p. 67-73, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1 – Espectro de RMN ¹H do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD

ANEXO 1 – Espectro de RMN ^{13}C do biossurfactante produzido pela levedura SSS11 em meio HD