UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FLAVIANA DA SILVA CHAVES

**Bioprospecção de leveduras da Antártica para a produção de
biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de
palha de cana-de-açúcar**

LORENA - SP

2017

FLAVIANA DA SILVA CHAVES

Bioprospecção de leveduras da Antártica para a produção de
biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico
de palha de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada para à Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências no Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Industrial, na
área de concentração Microbiologia
Aplicada

Orientadora: Dra. Maria das Graças de
Almeida Felipe

Edição reimpressa e corrigida

LORENA - SP

2017

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)

Chaves, Flaviana da Silva

Bioprospecção de leveduras da Antártica para a produção de biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar / Flaviana da Silva Chaves; orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe - ed. reimp., corr. - Lorena, 2017. 131 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientadora: Maria das Graças de Almeida Felipe

1. Biossurfactante. 2. Antártica. 3. Hidrolisado hemicelulósico. 4. Palha de cana-de-açúcar. 5. Xilose. I. Título. II. Felipe, Maria das Graças de Almeida, orient.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido esta experiência e conduzido tudo da melhor maneira para meu crescimento pessoal e profissional.

A meus pais, pelo apoio e presença constante em minha vida, amparando-me nos momentos de incertezas. Estes que embora não tenham tido as mesmas oportunidades que eu se esforçam sempre ao máximo para me apoiar em todos os meus sonhos, torcendo sempre para o meu sucesso profissional.

À minha orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe, pela paciência e por estar sempre presente auxiliando e orientando sobre questões técnicas e transmitindo seu conhecimento. E principalmente gostaria de agradecer-lá pelo zelo e empatia que apresenta pelas questões de cunho pessoal.

Ao professor Dr. Sílvio Silvério da Silva e seus alunos por todo apoio na execução dos experimentos e nas dificuldades encontradas.

À Dra Lara Durães Sette por ceder as leveduras isoladas da Antártica para desenvolvimento do trabalho. E toda a equipe de professores e alunos envolvidos no projeto Biotecnologia Marinha e Antártica (Fapesp: Processo 13/19486-0).

Aos amigos do laboratório que sempre me auxiliaram nos experimentos e estavam sempre alegrando meus dias: Danielle, Fernanda, Olívia, Andrés, Bruna, Marcelo, Jéssica.

Aos meus amigos do departamento de biotecnologia e amigos que fiz em Lorena que sempre estiveram dispostos em me auxiliar em todas as dificuldades e que sempre fizeram tudo ser mais leve: Isabele, Fernanda, Larissa, Paulo, Lívia, Ruly, Bruna, Sabrina.

A Escola de Engenharia de Lorena pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos os professores que estiveram presentes na minha formação.

Aos técnicos e funcionários da EEL.

A CAPES por ter concedido a bolsa.

“É necessário ter um caos em si para dar à luz a uma estrela bailarina.”

Nietzsche

RESUMO

CHAVES, F.S., **Bioprospecção de leveduras da Antártica para a produção de biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar**, 2017. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena. 2017.

A produção comercial dos surfactantes ocorre principalmente por síntese química a partir do petróleo. A via biotecnológica se apresenta como uma alternativa promissora por possibilitar a utilização de biomassas vegetais, ricas em carboidratos a exemplo da palha de cana-de-açúcar. Assim, esta biomolécula torna-se mais competitiva comercialmente em relação aos surfactantes químicos, obtendo um processo biossustentável e biodegradável. Microrganismos isolados da Antártica apresentam potencial para a produção destas biomoléculas, uma vez que em condições extremas de sobrevivência estas poderiam ser produzidas em concentrações elevadas. Assim, este estudo avaliou a produção de biossurfactante em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar (HHPC) a partir de leveduras da Antártica, além da caracterização parcial da biomolécula e testes de estabilidade da emulsão. Inicialmente foram avaliadas 24 leveduras, cultivadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL em meio semi-definido contendo xilose ou glicose como fontes de carbono, a 25°C, 150 rpm, por até 72 horas. As propriedades emulsificante e tensoativa do bioproduto foram avaliadas e as culturas que apresentaram resultados satisfatórios para ambas as propriedades e consumo de xilose superior ou igual a 80% foram selecionadas para cultivo em meio formulado com HHPC. Das 24 leveduras testadas, três foram selecionadas para cultivo em hidrolisado: *Cryptococcus laurentii* (L62), *Cryptococcus adeliensis* (L95) e *Rhodotorula mucilaginosa* (L52). Destas, a levedura *Cryptococcus adeliensis* (L95) se destacou por apresentar produção de biomoléculas com maior propriedade emulsificante e tensoativa. Para esta levedura o consumo de xilose em meio semi-definido e em HHPC bem como o índice de emulsificação nas diferentes condições foram semelhantes. O biossurfactante produzido por *Cryptococcus adeliensis* (L95) foi caracterizado como glicolipídeo. Diferentes métodos de extração desta biomolécula foram testados, no entanto, estes não apresentaram diferença significativa. A estabilidade da emulsão obtida do sobrenadante de L95 em HHPC foi determinada em distintas condições físico-químicas, sendo que esta foi estável a pH extremamente baixo (2,00), baixas temperaturas (0°C e 4°C) e elevada concentração salina (10% m/V). Estes resultados são promissores considerando o potencial de aplicação de biossurfactantes em biorremediação bem como insumos nos mais diversos segmentos industriais, os quais necessitam de biomoléculas que resistam às mais diversas condições ambientais. Desta forma nesta pesquisa foi possível inferir que a biomassa de palha de cana pode ser destinada à obtenção de biossurfactantes a partir de leveduras da Antártica, destacando a relevância da pesquisa quanto à inovação biotecnológica.

Palavras-chave: Biossurfactante, Antártica, hidrolisado hemicelulósico, palha de cana-de-açúcar, xilose.

ABSTRACT

CHAVES, F.S., **Bioprospecting of yeasts from Antarctica for the production of biosurfactant from hemicellulosic hydrolysate of sugarcane straw**, 2017. 131 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena. 2017.

The commercial production of surfactants occurs mainly by chemical synthesis from petroleum. The biotechnological pathway is considered as a promising alternative because it allows the use of vegetable biomass, rich in carbohydrates such as sugarcane straw. Thus, this biomolecule becomes more commercially competitive with respect to the chemical surfactants, obtaining a biodegradable process. Microorganisms isolated from Antarctica have the potential to produce these biomolecules, since under extreme conditions of survival, these could be produced in higher concentrations. In this way, this study aims to evaluate the biosurfactant production in sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate from Antarctic yeasts, in addition to the partial characterization of the biomolecule and stability tests of the emulsion. Initially, 24 yeasts were evaluated, grown in 50 mL Erlenmeyer flasks in semi-defined medium with xylose or glucose as carbon sources, at 25°C, 150 rpm, up to 72 hours. The emulsifying and surfactant properties of the bioproduct were evaluated, and the cultures that had satisfactory results for both properties and xylose consumption higher or equal to 80% were selected to be cultivated in a medium formulated with sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate (SSHH). In the 24 yeasts tested, three were selected to be cultivated in the hydrolysed: *Cryptococcus laurentii* (L62), *Cryptococcus adeliensis* (L95) and *Rhodotorula mucilaginosa* (L52). Among these *C. adeliensis* (L95) was distinguished by the production of biomolecules with higher emulsifying and tensoactive properties. For this yeast, the xylose consumption in semi-defined medium and in SSHH, as well as the emulsification index under different conditions were similar. The biosurfactant produced by *C. adeliensis* (L95) was characterized as glycolipid. Different methods of extraction of this biomolecule were tested, however, these did not have significant difference. The emulsion stability obtained from the *C. adeliensis* (L95) supernatant in SSHH was determined under different physicochemical conditions, which was stable at extremely low pH (2,00), low temperatures (0°C and 4°C) and high saline concentration (10% m/v). These results are interesting considering the potential of the biosurfactants application in bioremediation and inputs for several industrial segments, which require biomolecules that resist to the most diverse environmental conditions. In this research, it was concluded that sugarcane straw biomass can be used to obtain biosurfactants from Antarctic yeasts, consequently highlighting the research relevance regarding to the biotechnological innovation.

Keywords: Biosurfactant, Antarctica, hemicellulosic hydrolysate, sugarcane straw, xylose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do modelo “cabeça-cauda” do estereato de sódio (sabão).	19
Figura 2 - Representação esquemática de algumas estruturas organizadas de surfactantes.....	20
Figura 3 - Tensão superficial, interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante.....	21
Figura 4 - Estrutura química do SDS, surfactante químico aniônico (A), e do Triton X-100, um surfactante químico não iônico (B).	22
Figura 5 - Número de publicações e patentes obtidas a partir 1980 para o termo “Biossurfactante” no diretório de pesquisa SciFinder.....	24
Figura 6 - a) Cristais de soforolipídeo na forma lactônica (microscopia óptica ampliação de 100 vezes) b) sedimentação de soforolipídeo (forma ácida) como óleo viscoso marrom.	25
Figura 7 - Estrutura química dos biossurfactantes mais estudados (a) Ramnolipídeo (b) Soforolipídeo (c) Surfactina (d) Emulsan.	28
Figura 8 - Biossíntese de ramnolipídeo por <i>P. aeruginosa</i> : metabolismo relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de ácidos graxos como substratos.....	31
Figura 9 - Metabolismo relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chave para o controle do fluxo de carbono: A: fosfofrutoquinase; B: piruvato quinase; C: isocitrato desidrogenase; D: citrato liase; E: piruvato desidrogenase; F: piruvato carboxilase.....	32
Figura 10 - Antártica e Oceano Antártico. Frente Polar (linha completa); extensão de gelo marinho (linha pontilhada), regiões da Antártica e lagos são destacados.	38
Figura 11 - Principais constituintes da estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica da palha de cana.	49
Figura 12 - Formação de furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido levulínico e ácido fórmico a partir dos monossacarídeos glicose e xilose em meio ácido.	52
Figura 13 - Compostos químicos originados da degradação da lignina pela hidrólise ácida diluída.....	53

Figura 14 - Representação esquemática dos processos envolvidos para a seleção da levedura e caracterização parcial do biossurfactante.....	58
Figura 15 - Representação esquemática do processo que envolve o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar destoxificado.....	62
Figura 16 - Características morfológicas das leveduras. Lâminas a fresco ampliação de 400 vezes.	73
Figura 17 - Meio de cultivo semi-definido contendo xilose como fonte de carbono (controle) (A) e após fermentação por 72 horas pelas leveduras da espécie <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L02 (B), L07 (C), L67 (D) L73 (E).	74
Figura 18 - Índices de emulsificação obtidos após 24 horas de repouso obtidos dos cultivos de L94 (A), L62 (B) e L52 (C) em meios semi-definidos contendo glicose (■) ou xilose (■) como fontes de carbono.	85
Figura 19 - Assimilação de glicose (■) e xilose (■) durante os cultivos de L94 (A), L62 (B) e L52 (C) nos meios semi-definidos contendo glicose ou xilose como fontes de carbono.	88
Figura 20 - Teste para determinação do índice de emulsificação do sobrenadante obtido do cultivo de <i>Cryptococcus laurentii</i> (L62) em 48 (A) e em 96 (B) horas de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.....	92
Figura 21 - Teste para determinação de índice de emulsificação após 24 horas de repouso em hidrolisado hemicelulósico de palha (A) e nos sobrenadantes obtidos do cultivo de L95 em hidrolisado hemicelulósico de palha em 24 (B), 48 (C), 72 (D), 96 (E) horas de cultivo.	92
Figura 22 - Teste de espalhamento da gota nos sobrenadantes obtidos do cultivo da levedura L95 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana em 24 horas de cultivo (A), 48 horas (B), 72 horas (C), 96 horas (D).	93
Figura 23 - Consumo de açúcares (%) (■) e IE ₂₄ (%) (■) obtidos em função do meio de cultivo empregado em 72 horas de cultivo de <i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95).	94
Figura 24 - Determinação da produção de glicolípídeos extracelulares: formação de discreto halo azul em meios semi-definidos contendo glicose (A) ou xilose (B) como únicas fontes de carbono.	96
Figura 25 - Extração de biossurfactante com clorofórmio/metanol (4:1), A) fase aquosa (superior) e fase orgânica (inferior), B) fase orgânica com mistura de solventes.....	98

Figura 26 - Rendimentos (g/L) de biossurfactantes no extrato bruto das diferentes misturas de solvente utilizadas na extração.....	98
Figura 27 - Índice de emulsificação (IE_{24}) do sobrenadante obtido do cultivo de <i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana por 72 horas de fermentação em diferentes pHs.	100
Figura 28 - Emulsões obtidas a partir dos diferentes pHs testados (A) pH 2,0, (B) 4,0, (C) 6,0, (D) 8,0, (E) 10,0, (F) 12,0 do sobrenadante obtido do cultivo de <i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana no tempo de 72 horas de fermentação.	101
Figura 29 - Índice de emulsificação do sobrenadante obtido do cultivo de <i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana por 72 horas de fermentação em diferentes concentrações de NaCl (%).	102
Figura 30 - Emulsões obtidas a partir de diferentes concentrações salinas (A) 2%, (B) 4%, (C) 6%, (D) 8%, (E) 10% (m/V) do sobrenadante obtido do cultivo de <i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana no tempo de 72 horas de fermentação.	102
Figura 31 - Índice de emulsificação do sobrenadante obtido do cultivo de <i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana por 72 horas de fermentação em diferentes temperaturas (°C).	103
Figura 32 - Emulsões obtidas a partir de temperaturas (A) 0°C, (B) 4 °C, (C) 30 °C, (D) 60 °C, (E) 80 °C, (F) 100 °C do sobrenadante obtido do cultivo de <i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana no tempo de 72 horas de fermentação.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de biossurfactantes produzidos por distintos microrganismos...	27
Tabela 2 - Biossurfactantes e ramos industriais de aplicação.....	35
Tabela 3 - Leveduras produtoras de biossurfactantes de classes distintas.....	37
Tabela 4 - Biomoléculas produzidas a partir de microrganismos isolados do continente Antártico.	42
Tabela 5 - Exemplos de produtos comercializados que contêm em sua composição biossurfactantes.....	44
Tabela 6 - Matérias-primas de baixo custo para a produção de biossurfactantes por várias estirpes microbianas.	46
Tabela 7 - Quantidades de biossurfactantes produzidos por diferentes leveduras e mistura de solventes utilizados na extração.	56
Tabela 8 - Linhagens de leveduras da Antártica isoladas no CPQBA/ UNICAMP e suas respectivas fontes de isolamento (*).	60
Tabela 9 - Caracterização química da palha e bagaço de cana-de-açúcar.....	76
Tabela 10 - Concentração (g/L) de açúcares, saponinas e compostos tóxicos no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar (HHPC) original, e após etapas de concentração e de destoxificação.	77
Tabela 11 - Seleção de leveduras da Antártica produtoras de biossurfactante em meio semi-definido contendo glicose.....	79
Tabela 12 - Seleção de leveduras produtoras de biossurfactante em meio de cultivo semi-definido contendo xilose.	83
Tabela 13 - Resultados de concentração de biomassa, consumo de xilose, pH e propriedades surfactantes obtidos a partir do cultivo de <i>Cryptococcus laurentii</i> (L62) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana até 96 horas de cultivo. ..	91
Tabela 14 - Resultados de concentração de biomassa, consumo de xilose, pH e propriedades surfactantes obtidos a partir do cultivo de <i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha até 96 horas de cultivo.	91
Tabela 15 - Crescimento celular da levedura <i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95) e índice de emulsificação (IE ₂₄) (%) em cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 SURFACTANTES	19
2.2 SURFACTANTES SINTÉTICOS	21
2.3 BIOSSURFACTANTES	23
2.3.1 Classificação dos biossurfactantes	25
2.3.2 Funções fisiológicas	28
2.3.3 Mecanismos de biossíntese de biossurfactante	29
2.3.4 Fatores que afetam a produção de biossurfactante	33
2.3.5 Aplicações	34
2.3.6 Leveduras produtoras de biossurfactante	35
2.3.7 Antártica	38
2.3.7.1 Ecossistema Antártico	38
2.3.7.2 Microrganismos	39
2.3.7.3 Estratégias adaptativas realizadas pelas células microbianas do continente Antártico e potencial biotecnológico	40
2.3.8 Mercado, produção comercial e seus desafios	43
2.3.9 Produção em fontes de carbono não convencionais	45
2.3.10 Biomassa vegetal: Palha de cana-de-açúcar	47
2.3.10.1 Plantio e características estruturais da biomassa lignocelulósica	47
2.3.10.2 Potencial da palha de cana para produção de bioprodutos e bioenergia	50
2.3.11 Extração e caracterização de biossurfactantes	54
3 OBJETIVOS	57
3.1 OBJETIVO GERAL	57

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1 MICRORGANISMOS.....	58
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO SEMI-DEFINIDO PARA AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE BIOTENSOATIVA E BIOEMULSIFICANTE.....	60
4.3 TESTES PARA DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTE E TENSOATIVA.....	61
4.3.1 Determinação do índice de emulsificação.....	61
4.3.2 Teste de espalhamento da Gota: propriedade tensoativa	61
4.4 CULTIVO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR destoxificado	62
4.4.1 Caracterização da palha de cana-de-açúcar	62
4.4.1.1 Determinação do teor de umidade	62
4.4.1.2 Remoção de extrativos.....	63
4.4.1.3 Hidrólise ácida	63
4.4.1.4 Teor de lignina insolúvel.....	63
4.4.1.5 Teor da lignina solúvel	64
4.4.1.6 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina	64
4.4.1.7 Determinação de cinzas	65
4.4.2 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar destoxificado.....	65
4.4.3.1 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético e tóxicos	66
4.4.3.2 Determinação de compostos fenólicos totais no hidrolisado hemicelulósico pelo método de Folin-Ciocalteu.....	66
4.4.3.3 Determinação da concentração de saponinas no hidrolisado hemicelulósico destoxificado.....	67
4.4.3.4 Condições de cultivo das leveduras da Antártica em hidrolisado hemicelulósico de palha e ponta de cana-de-açúcar	67

4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PARCIAL DO BIOSSURFACTANTE....	68
4.5.1 Extração dos biossurfactantes	68
4.5.2 Métodos analíticos para a determinação da composição bioquímica parcial do biossurfactante.....	69
4.5.3 Determinação de açúcar total pelo método de fenol sulfúrico	69
4.5.4 Determinação de glicose pelo método do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)	69
4.5.5 Determinação quantitativa de proteínas: Método de Lowry.....	70
4.5.6 Teste de Blue Ágar.....	70
4.6 ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE EM DIFERENTES CONDIÇÕES	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	72
5.1 Características morfológicas e reprodutivas das leveduras.....	72
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR	74
5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	76
5.4 CULTIVO DAS LEVEDURAS DA ANTÁRTICA EM MEIO SEMI-DEFINIDO CONTENDO GLICOSE OU XILOSE COMO FONTES DE CARBONO: ANÁLISE DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	78
5.5 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR	89
5.6 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO BIOSSURFACTANTE.....	96
5.6.1 Produção de glicolípido extracelular: Teste Blue Ágar	96
5.6.2 Extração do biossurfactante	97
5.7 ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE FRENTE À VARIAÇÕES DE pH, CONCENTRAÇÕES SALINAS E TEMPERATURA.....	99
6 CONCLUSÕES.....	105
7 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS	106
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço tecnológico caracterizado pelo crescente consumo e consequente maior produção de moléculas de síntese química, diversos processos e produtos nos mais diversos segmentos industriais vêm sendo desenvolvidos cotidianamente com a finalidade de trazer maior qualidade de vida aos consumidores, maior rendimento e lucro as empresas. No entanto, questões ambientais estão sendo cada vez mais determinantes no desenvolvimento destes. Assim, o conceito de química verde surgiu para possibilitar a compreensão e execução de processos biossustentáveis com consequente redução da liberação de resíduos tóxicos e menor agressão ao meio ambiente.

Dentre o vasto espectro de compostos químicos comercializados os surfactantes se destacam devido às suas distintas atividades, como emulsificante, de-emulsificante, umectante, formação de espuma e adsorção. Devido esta gama de propriedades funcionais estes compostos possuem uma vasta aplicação industrial sendo capazes de atuar como detergentes, agentes molhantes, emulsionantes, dispersantes e espumantes. Além do mais, estes podem ser empregados nos mais distintos seguimentos industriais como de alimentos, têxtil, metalúrgica, cosméticos, farmacêutica, papel e de petróleo.

O mercado de surfactante é prevalentemente dominado pelos surfactantes quimicamente sintetizados, os quais vêm aumentando sua produção impulsionada pelo desenvolvimento de novas formulações de produtos, além de crescente consumo dos produtos que o utilizam como insumo. No entanto, os surfactantes sintéticos são produzidos a partir da fonte esgotável, petróleo, sendo em sua maioria tóxicos, contaminando receptores finais como solos e águas com seus resíduos.

Todavia, os biossurfactantes se apresentam como alternativa aos surfactantes sintéticos pela sua produção a partir de fontes renováveis e biodegradabilidade, dentre outras vantagens. Estes são produzidos por microrganismos e desempenham diversas funções fisiológicas, mobilidade e comunicação celular, adesão de nutrientes, competição célula-célula. Há alguns anos este bioprocessos já ocorre em escala industrial, no entanto, devido ao elevado custo de produção estes nem sempre são competitivos com o produto

sintético. Neste contexto, o uso de fontes renováveis surge como uma alternativa biodegradável e biossustentável.

Neste trabalho optou-se pela utilização da fonte renovável palha de cana-de-açúcar, a qual é um subproduto agroindustrial abundante devido à substituição gradual da colheita com queima pela colheita mecanizada. Isto, aliado à alta concentração de açúcares presente na planta faz desta uma promissora alternativa para a produção de biossurfactante com baixo custo. Além do mais, a palha é rica em açúcares podendo ser empregada na produção de diversos bioprodutos por via biotecnológica. Este seria um novo destino para o resíduo com a possibilidade de abrir novo arsenal de produtos de maior valor agregado de acordo com o conceito de biorrefinaria.

A maioria dos estudos sobre a produção de biossurfactantes é a partir de bactérias e as biomoléculas que já são produzidas e comercializadas em escala industrial também são produzidas via bactérias, justificando a importância de estudos com leveduras, as quais apresentam grande potencial para produção destes biocompostos. Deste modo, leveduras provenientes do continente Antártico que apresentam características peculiares em função da sobrevivência em ambientes extremos foram alvo da presente pesquisa na busca por biomoléculas com propriedades diferenciadas. Na região em que estas leveduras foram isoladas o consumo de substratos pelos microrganismos é crítico, dentre outras características peculiares. Uma vez que os substratos são restritos e de difícil acesso, acredita-se que estes microrganismos produzam bioprodutos como biossurfactante para facilitar o acesso a estes substratos, a partir das propriedades emulsificantes e de redução de tensoatividade que estes apresentam.

Portanto, as leveduras isoladas do continente Antártico apresentam amplo potencial para a produção de biossurfactantes uma vez que suas condições de origem restritivas propiciaram a adaptação para a sobrevivência destes microrganismos. De acordo com as limitações apresentadas para a produção de biossurfactantes a utilização do subproduto palha de cana-de-açúcar vem como uma alternativa à redução de custos de produção destas biomoléculas. Sendo assim, este trabalho buscou contribuir para o desenvolvimento de uma rota biotecnológica biossustentável para produção de biossurfactante a partir do subproduto agroindustrial palha de cana-de-açúcar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, com porções hidrofílicas e hidrofóbicas, que reduzem a tensão superficial (TS - força existente entre uma superfície ar-líquido) e a tensão interfacial (TI - força existente entre uma superfície líquido-líquido) para formar micelas e microemulsões entre duas fases diferentes. (BODOUR e MILLER-MAIER, 1998). A estrutura destas moléculas pode ser observada na Figura 1, na qual se destaca as duas porções.

De acordo com Bognolo et al. (1999) a metade lipofílica pode ser uma proteína ou um peptídeo com uma alta proporção de cadeia de face hidrofóbica, mas é usualmente uma cadeia de hidrocarboneto de ácido graxo com 10-18 átomos de carbono, contudo ácidos graxos de maiores massas molares têm sido relatados. A parte hidrofílica pode ser constituída de um ácido, cátions de peptídeos, ou ânions, mono-, di- ou polissacarídeos. Estas duas partes são unidas por ligação éster com ácidos orgânicos e inorgânicos ou ligação peptídica ou glicosídica (SOURAV et al., 2015). A presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula possibilita a distribuição dos surfactantes nas interfaces entre faces fluídas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) (NITSCHKE; PASTORE, 2003).

Figura 1 - Representação esquemática do modelo “cabeça-cauda” do estereato de sódio (sabão).

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

A estrutura final dos agregados supramoleculares formados é microscopicamente ordenada, sendo capaz de formar micelas, bicamadas, vesículas, macro e micro emulsões (FIECHTER, 1992). Estas estruturas são determinadas pela natureza do monômero do surfactante, do solvente e também

por possíveis íons vizinhos. Algumas destas estruturas estão representadas esquematicamente na Figura 2. Dentre os grupamentos organizados de surfactantes existentes, micelas e vesículas são possivelmente os meios organizados mais interessantes e os mais investigados (SANZ-MEDEL et al., 1999).

Figura 2 - Representação esquemática de algumas estruturas organizadas de surfactantes.

Fonte: Autoria própria

A micela é a configuração das moléculas de tensoativo com melhor estabilidade na solução. Deste modo, a concentração crítica micelar (CMC) é definida como a concentração acima da qual as micelas são formadas; este valor é fortemente dependente da temperatura, pressão e presença de outros eletrólitos. Abaixo da CMC, a tensão superficial (TS) em meio aquoso cai a partir de um valor máximo de 72 mN/m (água pura) (DESAI; BANAT, 1997). Uma vez que o CMC é atingido, a TS mantém-se mais ou menos constante (Figura 3). Quanto menor o CMC mais eficiente é considerado o biossurfactante

especialmente do ponto de vista econômico para aplicações industriais (PACWA-PLOCINICZAK; PIOTROWSKA-SEGET; CAMEOTRA, 2011). Em geral, os biossurfactantes são mais eficientes e eficazes e o seu valor CMC é cerca de 10-40 vezes menor do que o atingido com surfactantes sintetizados quimicamente (DESAI; BANAT, 1997). Segundo Whang e colaboradores (2008), a formação de micelas pelos biossurfactantes permite reduzir a tensão superficial e interfacial, aumentando a solubilidade e biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos. Tensão superficial (TS) e tensão interfacial (TI) entre as fases líquidas são medidas úteis para determinar se uma cultura microbiana é produtora de biossurfactante, mas não podem ser utilizadas de um modo quantitativo, porque uma vez que o mínimo de TS ou TI é atingido, mesmo que haja maior concentração de biossurfactante no meio não é observada qualquer mudança de valor nas duas tensões, podendo ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Tensão superficial, interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante.

Fonte: (MULLIGAN et al., 2005)

2.2 SURFACTANTES SINTÉTICOS

A maior parte dos surfactantes disponíveis comercialmente são surfactantes de origem sintética, principalmente sulfatos de alquila ou sulfanatos de cadeia linear ou ramificada, originados de indústrias petroquímicas. Geralmente, os surfactantes químicos são classificados de acordo com sua carga como aniônicos, não-iônicos, catiônicos e anfóteros (VAN HAMME; SINGH;

WARD, 2006). Segundo Pacheco (2008), exemplos familiares de surfactantes químicos utilizados em laboratórios rotineiramente incluem o dodecil sulfato de sódio (SDS) e o Triton X-100, os quais são aniônico e não iônico, respectivamente (Figura 4). Porém, outros autores, como Daltin (2011), também os classificam levando em consideração seus grupamentos apolares (hidrofóbico), denominando-os de ácidos graxos naturais, parafinas, olefinas, alquilbenzenos, álcoois, alquilfenóis, polipropilenoglicóis, fluorocarbonos e silicones.

Figura 4 - Estrutura química do SDS, surfactante químico aniônico (A), e do Triton X-100, um surfactante químico não iônico (B).

Fonte: (PACHECO, 2008).

Segundo Reznik et al. (2010), o mercado mundial dos surfactantes quimicamente sintetizados corresponde a aproximadamente US\$ 9,4 bilhões por ano, e estima-se que a demanda por surfactantes aumente a uma taxa de 35 % ao ano. Quase todos os surfactantes atualmente utilizados são quimicamente derivados do petróleo. A nível mundial o uso de surfactantes cresceu enormemente ao longo das últimas décadas, embora os números exatos para produção sejam difíceis de determinar em um mercado tão misto. Contudo, quantidades de aproximadamente 9 milhões de toneladas em 1995 subindo para 13 milhões de toneladas em 2008 são razoáveis estimativas, não havendo estudos mais recentes quanto a estimativa de produção destes.

2.3 BIOSSURFACTANTES

São moléculas anfifílicas produzidas por microrganismos, animais ou plantas (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Estas possuem tanto porção hidrofílica quanto porções hidrofóbicas e são capazes de exibir uma variedade de atividades de superfície que, entre outras funções, ajudam a solubilizar substratos hidrofóbicos (DESAI; BANAT, 1997).

Os biossurfactantes produzidos a partir de fonte animal ou plantas tais como sabão, lecitina e saponina têm sido consumidos para uso doméstico e industrial antes dos surfactantes químicos e tornaram-se muito difundidos com o aumento da consciência ambiental e ênfase em uma sociedade sustentável (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002).

A pesquisa sobre a produção de biossurfactante a partir de microrganismos tem crescido significativamente devido às vantagens que eles apresentam sobre os compostos sintéticos, tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade, diversidade de aplicações e funcionalidade sob condições extremas (AMARAL et al., 2010). Estas tornam este bioproduto interessante em relação a gama de aplicações industriais que podem ser exploradas.

Dentre as vantagens citadas anteriormente destaca-se algumas como a biodegradabilidade desta biomolécula, a qual, devido à sua origem biológica, é mais biodegradável do que os seus equivalentes sintéticos. Os testes de biodegradabilidade de biossurfactantes soforolipídios produzidos por *Candida bombicola*, levedura não patogênica, mostraram que a biodegradação de biossurfactantes inicia-se imediatamente após o cultivo, enquanto que os surfactantes sintéticos testados não apresentaram biodegradabilidade (HIRATA et al., 2009). Outro estudo indicou que os biossurfactantes ramnolipídicos são biodegradáveis em condições aeróbicas e anaeróbicas, enquanto que o surfactante sintético Triton X-100 é parcialmente biodegradável sob condições aeróbicas e não biodegradável em condições anaeróbicas (MOHAN; NAKHLA; YANFUL, 2006).

Quanto à estrutura, em contraste com os surfactantes sintetizados quimicamente que normalmente possuem cadeias alquila de dez ou mais unidades de carbono, muitos biossurfactantes possuem cadeias alquiladas

surpreendentemente curtas. Tais estruturas promovem a solubilidade aquosa destes biotensioativos (SOURAV et al., 2015).

Outra vantagem relevante dos biossurfactantes é a estabilidade que este apresenta frente a várias temperaturas, pHs e concentrações salinas. O biossurfactante liquenisina produzido por *B. licheniformis* JF-2 é estável em até 50 °C, pH de 4,5-9,0 e em concentrações de NaCl e Ca de 50 g/L e 25 g/L, respectivamente (MCINERNEY; JAVAHERI; NAGLE, 1990).

Devido às diversas vantagens apresentadas sobre os surfactantes de síntese química e a crescente preocupação com questões ecológicas, em um futuro próximo os biossurfactantes começarão a competir economicamente com equivalentes sintéticos na indústria de tensioativos. O crescente número de publicações e patentes no termo de pesquisa "Biossurfactante" (Figura 5) demonstra claramente o interesse por este tema e os elevados investimentos em pesquisa para desenvolver soluções que tornem o processo mais viável do ponto de vista econômico (SOURAV et al., 2015).

Figura 5 - Número de publicações e patentes obtidas a partir 1980 para o termo "Biossurfactante" no diretório de pesquisa SciFinder.

Fonte: Adaptado de (SOURAV et al., 2015).

Pesquisas científicas realizadas por Van Bogaert e Soetaert (2011) apresentam resultados sobre a produção de biossurfactante em pequena escala, conforme pode ser ilustrada na figura 6, sendo que na microscopia nota-se a formação de cristais de sofrorolipídeos, excretados das células tornando-os relativamente fáceis de isolar (a) e o óleo viscoso sedimentado (b). Alguns destes já vieram a ser produzidos em escala industrial, mas ainda há obstáculos a serem contornados, os quais serão destacados posteriormente.

Figura 6 - a) Cristais de sofrorolipídeo na forma lactônica (microscopia óptica ampliação de 100 vezes) b) sedimentação de sofrorolipídeo (forma ácida) como óleo viscoso marrom.

Fonte: Adaptado de (VAN BOGAERT; SOETAERT, 2011)

2.3.1 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados principalmente pela sua estrutura química e origem microbiana (BANAT et al., 2010). A presença de diferentes porções hidrofílicas faz com que os biossurfactantes sejam agrupados em diferentes classes, de acordo com sua composição.

De acordo com a composição química os biossurfactantes são classificados principalmente em seis categorias, (i) glicolipídios, (ii) ácidos graxos, (iii) lipopeptídios e lipoproteínas, (iv) poliméricos, (v) fosfolipídios e (vi) particulados (DESAI; BANAT, 1997; ZAJIC; SEFENS, 1984). Entre estes, os glicolipídeos têm sido mais intensivamente estudados devido aos rendimentos de produção muito mais elevados do que os de outros tipos de biossurfactantes.

Além disso, para sua produção é possível utilizar carboidratos provenientes de biomassa, ou seja, recursos renováveis (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002).

De acordo com Rosenberg e Ron (1999) os biossurfactantes ainda podem ser classificados em duas categorias de acordo com a massa molar:

(I) Agentes tensioativos de baixa massa molar: diminuem eficazmente a tensão superficial e interfacial. As classes principais incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e fosfolipídios.

(II) Agentes tensioativos de elevada massa molar: eficazes como agentes estabilizadores de emulsão. As principais classes incluem surfactantes poliméricos e particulados.

Alguns biossurfactantes classificados de acordo com sua composição química citados na tabela 1 merecem destaque, como a surfactina, que está entre os surfactantes mais conhecidos. Esta biomolécula foi caracterizada como um lipopeptídeo que possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição de coágulos, formação de canais iônicos em membranas, atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). A estrutura química da surfactina e de outros biossurfactantes está representada na Figura 7. A surfactina reduz a tensão superficial para 27,9 mN/m em concentrações de apenas 0,005%. Um surfactante polimérico também muito eficiente é o Emulsan, este é um agente emulsificante muito eficaz de hidrocarbonetos em água até mesmo a uma concentração tão baixa como 0,01%. Além disso, é um dos estabilizadores de emulsão mais potentes conhecidos pela capacidade de resistir a uma proporção de água para óleo de 1:4 (ZOSIM; GUTNICK; ROSENBERG, 1982) (Figura 7).

Uma classe ainda não muito explorada em pesquisas científicas é dos biossurfactantes particulados, estes são vesículas e células microbianas com atividade surfactante, como exemplo tem-se as vesículas de *Acinetobacter calcoaceticus* (DESAI; BANAT, 1997), as quais possuem diâmetro de 20 a 50 nm, compostas de proteínas, fosfolipídeos e lipo-polissacarídeos (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

Tabela 1 - Tipos de biossurfactantes produzidos por distintos microrganismos.

Biossurfactantes	Microrganismos produtores	Referências
Glicolipídeos		
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Soberón-Chávez, Lépine e Dézil (2005)
Trealoselipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Kretschmer, Bock e Wagner (1982)
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>	Cooper, Zajic e Gerson (1979)
Lipídios neutros	<i>N. erythropolis</i>	Macdonald, Cooper e Zajic (1981)
Lipopeptídios		
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Neu e Poralla (1990)
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Yeh, Wei e Chang (2005)
Lipoproteína	<i>Pseudomonas gessardii</i>	Ramani et al. (2012)
Fosfolipídios	<i>Corynebacterium lepus</i>	Cooper, Zajic e Gerson (1978)
Poliméricos		
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Rosenberg et al., (1988)
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	Cirigliano e Carman (1985)
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Navonvenezia et al. (1995)
Particulados		
Vesículas e fimbrias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Gutnick et al. (1980)

Fonte: Autoria própria

Figura 7 - Estrutura química dos biossurfactantes mais estudados (a) Ramnolipídio (b) Soforolipídio (c) Surfactina (d) Emulsan.

Fonte: (SANTOS et al., 2016)

2.3.2 Funções fisiológicas

Biossurfactantes influenciam o comportamento fisiológico microbiano em áreas como mobilidade e comunicação celular, adesão de nutrientes, competição célula-célula e patogênese em animais e plantas (LANG, 2002; CAMEOTRA; MAKAR, 2004). Estes desempenham um papel fisiológico no aumento da biodisponibilidade de moléculas hidrofóbicas que estão envolvidas nos processos de sinalização e de diferenciação celular, o que facilita o consumo de fontes de carbono presentes no solo (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007). Podem permanecer aderentes às superfícies de células microbianas ou excretados no

meio de cultivo. Quando associado à célula, promovem o transporte através da membrana, e como compostos extracelulares ajudam a solubilizar o substrato (MATA-SANDOVAL; KARNS; TORRENTS, 1999).

Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG; RON, 1999). Microrganismos também podem utilizar surfactantes ligados à parede celular para regular as propriedades de sua superfície, induzindo o *quorum sensing*. Enquanto é sabido que o *quorum sensing* é importante para a formação de biofilme, foi mostrado que biossurfactantes, induzidos por moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*, atuam sobre a estrutura do biofilme (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

Segundo Lin (1996) a atividade antibiótica também é demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios. Os ramnolipídios de *P. aeruginosa* e a surfactina de *B. subtilis* funcionam como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes.

Em outros exemplos de biossurfactante é possível que alguns biossurfactantes sejam produzidos como moléculas externas de armazenamento de carbono e não como agentes tensoativos. Por exemplo, Hommel et al. (1994) sugerem que soforolipídeos de *Candida albicans*, cultivados em glicose ou frutose, são produzidos para esta finalidade ou como uma adaptação a alta força osmótica.

2.3.3 Mecanismos de biossíntese de biossurfactante

Segundo os autores Sourav e colaboradores (2015) pelo fato dos biossurfactantes serem moléculas anfifílicas isto significa que há pelo menos dois caminhos sintéticos diferentes: um para a síntese da porção hidrofílica e outro para a porção hidrofóbica. As porções hidrofóbicas são sintetizadas por vias simples do metabolismo lipídico. O componente hidrofílico da molécula apresenta

um maior grau de complexidade estrutural. Assim, uma variedade de métodos biossintéticos está envolvida na sua síntese.

De acordo com os autores Sylatk e Wagner (1987) há quatro possibilidades principais de biossíntese de tais moléculas anfifílicas:

- Ambas as porções hidrofílicas e hidrofóbicas são sintetizadas pela via *de novo* por duas vias separadas.
- A porção hidrofílica é sintetizada pela via *de novo* enquanto que a síntese da porção hidrofóbica é induzida por substrato.
- A porção hidrofóbica é sintetizada pela via *de novo* enquanto que a síntese da porção hidrofílica é dependente do substrato.
- A síntese tanto da porção hidrofóbica e hidrofílica depende do substrato usado.

Algumas bactérias já têm seus sistemas bem compreendidos no que se refere à biossíntese de surfactantes, as duas mais estudadas são a *Pseudomonas aeruginosa* na produção de ramnolipídios e *Bacillus sp.* na produção de surfactina. Na Figura 8 há o esquema da biossíntese de ramnolipídio produzido pela *P. aeruginosa*. Pode-se notar que a porção hidrofóbica (cadeia de hidrocarbonetos) foi sintetizada pela via da síntese de ácidos graxos (síntese *de novo*) e a porção hidrofílica (polar) foi sintetizada pela gliconeogênese, dependente do substrato utilizado como mencionado anteriormente.

Segundo Fontes, Amaral e Coelho (2008), vias metabólicas diversas estão envolvidas na síntese de precursores para a produção de biossurfactantes e as vias a serem ativadas dependem da natureza das principais fontes de carbono empregadas no meio de cultura. Por exemplo, um substrato hidrofílico utilizado, como por exemplo, a glicose, glicerol ou outros, é degradado até formar intermediários da via glicolítica, como a glicose-6-fosfato que é um dos principais precursores dos carboidratos presentes na porção hidrofílica do biossurfactante. Para a produção de lipídeos a glicose é oxidada a piruvato por meio da glicólise, sendo o piruvato então convertido a acetil-CoA, que se liga ao oxaloacetato formando o malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo, precursor para a síntese de lipídeos (SYLDATK; WAGNER, 1987). Por outro lado, quando um hidrocarboneto é utilizado como fonte de carbono o metabolismo microbiano se dirige principalmente à via lipolítica e à gliconeogênese (formação de glicose a partir de

precursores diferentes das hexoses) podendo, desta forma, ser utilizado para produzir ácidos graxos ou sacarídeos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Figura 8 - Biossíntese de ramnolipídeo por *P. aeruginosa*: metabolismo relacionado à síntese de precursores de biosurfactante a partir da utilização de ácidos graxos como substratos.

*RmlA, RmlB, RmlC, RmlD, RhIA, RhIB, RhIG: ramnosiltransferases.

Fonte: Adaptado de (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIL, 2005; MULLER; HAUSMANN, 2011)

Ainda de acordo com Fontes, Amaral e Coelho (2008), quando os carboidratos são a única fonte de carbono para a produção de um glicolípídeo, o fluxo de carbono é regulado de tal modo que ambas as vias lipogênicas (síntese de lipídeos) e a formação da porção hidrofílica através da via glicolítica são suprimidas pelo metabolismo microbiano, como ilustrado na Figura 9.

Figura 9 - Metabolismo relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chave para o controle do fluxo de carbono: A: fosfofrutoquinase; B: piruvato quinase; C: isocitrato desidrogenase; D: citrato liase; E: piruvato desidrogenase; F: piruvato carboxilase.

Fonte: (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008)

Um mecanismo pelo qual a síntese de biossurfactante acontece em condições limitantes de nitrogênio foi sugerido por Albrecht, Rau e Wagner (1996). Segundo os autores, esta condição causa um declínio na atividade específica da isocitrato desidrogenase (dependente de NAD^+ e NADP^+), enzima responsável pela oxidação do isocitrato a α - cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico. Como o declínio da atividade leva a um acúmulo de isocitrato e

subseqüente citrato na mitocôndria, ambos são transportados para dentro do citosol, onde o citrato é clivado pela citrato sintase, originando acetilcoenzima A, que é o precursor da síntese de ácido graxo aumentando, dessa forma, a produção de biossurfactante.

2.3.4 Fatores que afetam a produção de biossurfactante

Diversos fatores afetam a produção de biossurfactantes, desde fatores ambientais (pH, aeração, temperatura) até fontes de carbono e nitrogênio (GAUTAM; TYAGI, 2006).

De acordo com Desai e Banat (1997), as fontes de carbono exibem um papel significativo no crescimento assim como na produção de biossurfactantes pelos vários microrganismos. As fontes de carbono solúveis em água utilizadas na produção de biossurfactantes são: glicerol, glicose, manitol, acetato de sódio e etanol, enquanto que as imiscíveis são os hidrocarbonetos (n-alcanos), azeite. Com relação às fontes de carbono solúveis em água glicerol, glicose, manitol, etanol, estas já foram utilizadas na produção de biossurfactantes (SIM; WARD; LIN, 1997; ROBERT et al., 1989). No entanto, a concentração final da biomolécula foi menor do que a obtida quando se utilizou n-alcanos e óleos vegetais como fontes de carbono (SYLDATK et al., 1987; ROBERT et al., 1989). Apesar da produção de biossurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados (DESAI; BANAT, 1997).

Quanto à fonte de nitrogênio o autor Guerra-Santos e colaboradores (1984), relataram uma máxima produção de biossurfactantes após alterar a condição de limitação de nitrogênio da proporção carbono: nitrogênio 16:1 para 18:1. Quanto às estratégias de cultivo, os biossurfactantes podem ser produzidos em biorreatores, por fermentação contínua, descontínua ou alimentada. De acordo com Kosaric e Cairns (1987) em cultivos em batelada, o acúmulo de lipídios é favorecido quando no meio há um excesso da fonte de carbono sobre outros nutrientes limitantes. Porém, uma das principais desvantagens na produção em biorreator é a formação de espuma intensa causada pelo surfactante quando o meio de cultivo é agitado. Esta espuma aumenta o custo do

processo, sendo necessária a utilização de antiespumante ou outros métodos para rompê-las (KRONEMBERGER et al., 2008).

Para a produção em larga escala de biossurfactante é necessário conhecer os mecanismos de regulação dos microrganismos escolhidos. Nutrientes limitantes que podem levar a essas condições são o nitrogênio, magnésio, ferro e fósforo. Segundo Desai e Desai, A. (1993) e Sylatk et al. (1987), diferentes estratégias podem ser utilizadas para a produção da biomolécula dependendo da natureza do biossurfactante e do microrganismo produtor. Estes autores mencionam produção por cultivo em condições limitantes de crescimento, produção associada ao crescimento, produção por células não proliferantes, onde estas são colhidas durante o estado de produção de biossurfactantes e mantidas no mesmo meio, sem fonte de nitrogênio e outra estratégia é a adição de compostos lipofílicos precursores.

2.3.5 Aplicações

O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais (COLLA; COSTA, 2003). As propriedades presentes nessas moléculas fazem com que os surfactantes sejam adequados para um grande número de aplicações industriais (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002). Segundo Satpute et al. (2010) algumas propriedades funcionais que podem estar presentes nos biossurfactantes são: redução da tensoatividade, emulsificação, de-emulsificação, umectante, formação de espuma, adsorção.

Entretanto, as principais utilizações dos biossurfactantes relacionam-se à indústria petrolífera, para o aumento da solubilidade dos componentes do petróleo (LIMA, 1996). O potencial destas biomoléculas na recuperação de derivados de petróleo deve-se a sua utilização na limpeza de tanques, preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos (LIMA, 1996). Estas propriedades vêm sendo exploradas em diversos campos em distintas funções como mostrado na Tabela 2 a seguir.

Os biossurfactantes também têm sido relatados por possuírem várias propriedades de importância terapêutica e biomédica: devido propriedades antibacterianas, antifúngicas e propriedades antivirais; inibem a formação de coágulos de fibrina; e têm ação antiaderente contra vários microrganismos

patogênicos (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; SINGH; CAMEOTRA, 2004; RODRIGUES et al., 2006).

Tabela 2 - Biossurfactantes e ramos industriais de aplicação.

Função do biossurfactante	Indústria
Recuperação de óleo residual, redução da viscosidade de óleos	Petrolífera
Bactericida, antifúngico e antiviral	Farmacêutica
Limpeza	Alimentícia, petrolífera, cosmética e química em geral
Solubilização	Alimentícia, cosmética, farmacêutica, papel, plásticos e têxtil
Emulsificante	Alimentícia, cosmética, petrolífera, plásticos, curtumes, biorremediação e têxtil
Detergente e formadores de espuma	Curtumes, produtos para agricultura, indústria química e metalúrgica
Agente umectante	Têxtil, metalúrgica e cosmética
Lubrificante	Têxtil e metalúrgica
Agentes permeabilizadores	Farmacêutica, têxtil e química
Estabilizante	Têxtil
Agente dispersante	Papel e petrolífera
Sequestrante de metais	Biorremediação e tratamento de resíduos
Removedor de ceras de frutas e vegetais	Alimentícia
Ligação do asfalto a areia e cascalho	Construção civil

Fonte: Adaptada de (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007)

2.3.6 Leveduras produtoras de biossurfactante

Leveduras têm sido estudadas para a produção de biossurfactantes, entre as leveduras, gêneros *Candida* e *Yarrowia* têm sido largamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biossurfactantes (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Uma grande vantagem do uso de leveduras em relação às

bactérias reside no status GRAS (*generally regarded as safe*) que muitas delas apresentam como *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. Microrganismos com status GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (BARTH; GAILLARD, 1997). Porém, a maioria dos biossurfactantes relatados na literatura é de origem bacteriana (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Entretanto, a grande maioria dos biossurfactantes de origem bacteriana não é adequada para utilização na indústria alimentícia, devido a sua possível natureza patogênica (SHEPERD et al., 1995). Na Tabela 3 nota-se distintas espécies de leveduras que estão sendo estudadas quanto a produção de biossurfactantes de diversos tipos.

Microrganismos isolados de regiões extremas como a Antártica também vêm sendo extensamente estudados para a produção de biossurfactantes, no entanto, são mais relatados em bactérias. Quanto as leveduras convém mencionar a *Pseudozyma antarctica*, a qual produziu um glicolípídio caracterizado como manosileritritol, porém este apresenta composição química distinta (FUKUOKA et al., 2007a). Esta biomolécula apresenta maior hidrofobicidade que os convencionais "manosileritritol di-acilados", que possui dois ésteres de ácido graxo na porção de manose. Bednarski et al. (2004) relataram a síntese de biossurfactantes por *Candida antarctica* no cultivo em meio suplementado com resíduos de ácido graxo da refinaria de petróleo. O enriquecimento do meio com estes resíduos resultou numa concentração de glicolípídeos 7,5-8,5 vezes maior em comparação com a formulação sem adição de resíduos da refinaria de petróleo.

Tabela 3 - Leveduras produtoras de biossurfactantes de classes distintas.

Biossurfactante	Microrganismo	Referências
Glicolipídio	<i>Absidia corymbifera</i> F-295	Batrakov et al. (2003)
	<i>Sympodiomyopsis paphiopedili</i>	Santos et al. (2016)
	<i>Candida sphaerica</i> UCP0995	Sobrinho et al. (2013)
	<i>Candida bombicola</i>	Solaiman et al. (2004)
	<i>Trichosporon mucoides</i> CLM 42.4 (SSS11)	Marcelino, (2016)
Soforose	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Rau et al. (2005)
Monoacilglicerol	<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	Jing, Xin, Hui (2006)
Manosileritritol	<i>Candida ishiwadae</i>	Thanomsub et al. (2004)
Fosfolipídio e ácidos graxos		
	<i>Candida sp.</i> SY16	Kim et al. (2006)
	<i>Candida Antarctica</i>	Kim et al. (2002)
	<i>Pseudozyma sp.</i>	Fukuoka et al. (2007b)
Glicerofosfolipídios	<i>Absidia corymbifera</i>	Batrakov et al. (2004)
Ácido oléico	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Katamai et al. (2008)
Poliméricos		
Proteínas-carboidratos e complexos lipídicos	<i>Candida glabrata</i> UCP 1002	Sarubbo, Luna e Takaki (2006)

Fonte: Adaptado de (KATEMAI, 2011)

2.3.7 Antártica

2.3.7.1 Ecossistema Antártico

De acordo com Martínez-Rosales et al. (2012) a Antártica compreende todas as terras ao sul do paralelo de 60°S, tendo cerca de 14 milhões Km². O tamanho deste continente é um pouco menor que duas vezes o tamanho do Brasil (8 milhões Km²). A região possui a maior camada de gelo do mundo, que cobre cerca de 98% do continente Antártico. Essa capa tem uma espessura média de 1,6 Km e o gelo equivale a 60-70% do abastecimento de água doce da Terra (WILKINS et al. 2013), este não só cobre a Antártica, mas também a circunda. Na Figura 10 observa-se o continente Antártico em destaque.

Figura 10 - Antártica e Oceano Antártico. Frente Polar (linha completa); extensão de gelo marinho (linha pontilhada), regiões da Antártica e lagos são destacados.

Fonte: (WILKINS et al. 2013)

De acordo com Ruisi et al. (2006) a separação da Antártica dos demais continentes, por mares tempestuosos, faz dela a mais isolada região do planeta e ajuda a explicar a falta de uma fauna superior. Por outro lado, em contraste com a massa continental, os mares Antárticos abrigam uma das mais abundantes

comunidades biológicas do planeta. Então, muitas pesquisas científicas ainda deverão ser realizadas à fim de explorar esta diversidade.

O clima da Antártica é caracterizado por temperaturas extremamente baixas nas altitudes centrais, temperatura mínima registrada de -89°C e em altitudes mais baixas, próximo ao litoral e com a influência das águas, a temperatura média anual é de -10°C (COWAN et al., 2004). A maioria dos microambientes antárticos não apresenta temperatura acima de 10°C , mesmo durante o verão austral (RUISI et al., 2006). Fortes e freqüentes ventos, com intensidade de até 327 Km/h a maior velocidade do vento registrada, afetam as condições climáticas e, no conjunto, contribuem para a rarefação da vida natural terrestre (MARTÍNEZ-ROSALES et al., 2012).

Em 1º de dezembro de 1959, estabeleceu-se o Tratado da Antártica que entrou em vigor apenas em 1961. Este foi assinado por 47 países para garantia da substancial atividade de pesquisa científica. A área, abrangida pelo Tratado da Antártica, situa-se ao sul do paralelo de 60°S , na qual se aplicam os seus 14 artigos, que consagraram princípios como: a liberdade para a pesquisa científica, a cooperação internacional para este fim e a utilização pacífica da Antártica, proibindo a militarização da região e sua utilização para explosões nucleares ou como depósito de resíduos radioativos.

Segundo Martínez-Rosales et al. (2012) este continente pode ser considerado de grande importância por várias razões dentre elas, pois este é um reservatório para novos recursos genéticos que podem ser utilizados no desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos. Ainda segundo estes autores, a Antártica é um laboratório natural para compreensão da base estrutural genética e de adaptação de células eucarióticas e procarióticas em condições extremas.

2.3.7.2 Microrganismos

Solos e lagos salinos estão amplamente distribuídos na Antártica (NICHOLS; NICHOLS, P.; MCMEEKIN, 1993), e este é o único ecossistema no qual os microrganismos sobrevivem e crescem em condições de altas concentrações salinas, frio e ausência de oxigênio. Os primeiros relatos sobre a microflora Antártica foram publicados somente em 1908 por TSIKLINSKY

(BRATCHKOVA; IVANOVA, 2011), que recolheu dados durante uma expedição a Antártica em 1903-1905.

De acordo com a temperatura ótima de crescimento celular os microrganismos do continente antártico podem ser classificados em dois grupos: psicrófilos que crescem entre 0 °C a 18-20 °C, com um ótimo crescimento em 10-12 °C e os psicrotróficos que crescem a 5 °C ou temperaturas inferiores, mas são psicrotolerantes capazes de crescer a uma temperatura tão elevada como 30-32°C (MORITA; BAROSS, 1978). Este último grupo de microrganismos são as formas dominantes na Antártica continental e apresentam crescimento ótimo a 20-24 °C em condições controladas no laboratório (CHATTOPADHYAY et al., 1995). Neste ecossistema os microrganismos psicrófilos e psicrotróficos desempenham um papel importante na biodegradação da matéria orgânica (BRATCHKOVA; IVANOVA, 2011).

A maioria dos fungos filamentosos e leveduras presentes no ecossistema Antártica são cosmopolitas, ou seja, podem ser encontrados em distintas regiões do mundo; alguns destes fungos são psicrófilos, havendo também representantes de psicrotróficos. Enquanto condições áridas em superfícies de rochas da Antártida geralmente levam ao predomínio de organismos xerotolerantes, os quais podem crescer em baixo potencial de água (RUISI et al., 2006). Assim, convém ressaltar que, a maioria dos ambientes da Antártica continuamente recebe propágulos microbianos de outras regiões, esta dispersão de longa distância depende de vetores tais como ventos e animais (KAPPEN, 1993).

2.3.7.3 Estratégias adaptativas realizadas pelas células microbianas do continente Antártico e potencial biotecnológico

A Antártica é caracterizada por alguns dos principais fatores de estresse ambientais, e os microrganismos desse ecossistema são resistentes mostrando diferentes estratégias adaptativas morfológicas e fisiológicas, como por exemplo, adaptações bioquímicas em suas proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e osmorregulação (NICOLAUS; LAMA; ESPOSITO, 2001).

Em ambientes de baixa temperatura, a energia cinética reduzida impõe muitas restrições sobre a atividade celular, por exemplo, as taxas de reações catalisadas por enzimas são reduzidas, as membranas tornam-se rígidas,

transporte de solutos torna-se comprometido e os ácidos nucléicos adquirem estruturas secundárias que afetam a expressão gênica e a síntese de proteínas (FELLER, GERDAY, 2003; CAVICCHIOLI, 2006; SIDDIQUI et al., 2013). A baixa disponibilidade de água neste continente devido ventos fortes que promovem a evaporação e conseqüentemente elevada salinidade afetam a osmorregulação (RUISI et al., 2006). Outra condição de estresse característica desta região é a alta incidência de radiação UV que provoca danos de DNA, proteínas, incluindo lipoproteínas da membrana celular, e organelas (KARENTZ et al., 1994) e pode afetar os ecossistemas e evolução biológica (COCKELL; BLAUSTEIN et al., 2001).

Para enfrentar as condições de estresse desfavoráveis ao crescimento celular e conseguir sobreviver os microrganismos criaram distintos mecanismos. As membranas das células microbianas devem ser fluidas para facilitar os movimentos das proteínas na membrana (SUETIN et al., 2009). De acordo com Biasi et al. (2005) em baixas temperaturas o estado funcional da membrana celular muda de uma fase de cristal líquido para uma fase de gel, o que resulta na perda da integridade da membrana. Sabe-se há muito tempo que os microrganismos, quando são submetidos à alteração de alta para baixa temperatura respondem aumentando o nível de ácidos graxos insaturados na membrana (CROWE et al., 1987).

Outra estratégia adaptativa é realizada nas proteínas destes microrganismos, estas são adaptadas ao frio para melhorar a sua mobilidade estrutural a baixas temperaturas. De acordo com Vatsurina et al. (2008) a elevada atividade das proteínas a baixas temperaturas pode ser conseguida devido a desestabilização do sítio ativo, ou da proteína total, o que permite que o centro catalítico seja flexível a temperaturas que congelam os movimentos moleculares. De acordo com Suetin, et al. (2009) proteínas anticongelantes protegem a célula diminuindo o ponto de congelamento da água, impedindo a nucleação do gelo ou inibindo a formação de cristais de gelo nas moléculas de água.

Estratégias para regular o volume celular e o balanço de fluidos durante a osmose também são determinantes para a sobrevivência dos microrganismos no continente Antártico, uma vez que desertos com pouquíssima água e altas concentrações salinas são comuns nessa região. Assim, os osmólitos são sintetizados pelos microrganismos mantendo-os em equilíbrio fluido (SLEATOR;

HILL, 2002). Eles estão presentes na solução dentro ou fora de uma célula. Os osmólitos podem funcionar como osmoprotetores e são particularmente importantes para a sobrevivência em ambientes hipersalinos e temperaturas inferiores a zero (SLEATOR; HILL, 2002).

Em relação à alta incidência de radiação, como característica adaptativa os microrganismos produzem diferentes pigmentos potencialmente protegendo contra danos da UV-B (RUISI et al., 2006).

Devido a todas as estratégias adaptativas apresentadas nota-se que estes microrganismos apresentam potencial para a produção de biomoléculas com propriedades e estruturas químicas distintas, capazes de se adaptar as diversas condições de estresse, sendo que estas biomoléculas podem ser aplicadas em diferentes segmentos industriais (Tabela 4). Os microrganismos isolados da Antártica produzem bioprodutos de alto valor agregado que são desde enzimas que oferecem benefícios econômicos potenciais devido à sua elevada atividade a temperaturas baixas e moderadas, até antibióticos com atividade antitumoral.

Tabela 4 - Biomoléculas produzidas a partir de microrganismos isolados do continente Antártico.

Microrganismo	Bioproduto	Referências
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L7	Protease	Chaud et al. (2016)
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> AL(1)	Emulsificante, ergosterol, torularodin, toruleno, β -caroteno, coenzima Q(10)	Dimitrova, et al. (2013)
<i>Pichia pastoris</i>	β -D-galactosidase	Hildebrandt, Wanarska e Kur (2009)
<i>Cryptococcus albidus</i> AS ₅₅ , <i>Cryptococcus laurentii</i> AS ₅₆ ,	β -caroteno	Dimitrova et al. (2010)
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> AL ₁ , <i>C. albidus</i> AS ₅₅ ,	Coenzima Q ₁₀	Dimitrova et al. (2010)
<i>Pseudomonas</i> sp AMS3	Lipase termotolerante	Latip et al. (2016)

(Continua)

(Conclusão)

Microrganismo	Bioproduto	Referências
<i>Hymenobacter sp.</i>	Pigmento vermelho	Órdenes-Aenishanslins, et al. (2016)
<i>Chryseobacterium sp</i>	Pigmento amarelo	Aenishanslins, et al. (2016)
<i>Pseudozyma Antarctica</i>	Manosileritritol	Konishi, et al. (2007)
<i>Janthinobacterium sp. SMN</i>	Atividade antibacteriana	Asencio, et al. (2014)
33.6		
<i>Microbispora aerata</i> imbas	Alcalóide (atividade antitumoral)	Ivanova et al. (2007)
11 ^a		

Fonte: Autoria própria.

2.3.8 Mercado, produção comercial e seus desafios

Em 2011, o mercado dos biossurfactantes globais foi avaliado em US \$ 1.735,5 milhões e está projetado para atingir US \$ 17,5 milhões em 2020. Em volume, o mercado de biossurfactantes global deverá atingir até 2018 a produção de 476.512,2 toneladas (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2012).

Quanto à diversidade de biomoléculas produzidas no mercado de biossurfactantes globais há representantes de ésteres de sacarose, sulfonatos de éter metílico, derivados aniônicos, ésteres de metil glicosídeo, ramnolipídeos, soforolipídios, ácidos graxos, ésteres de sorbitano, alquil poliglicosídeos e outros (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2012). A aplicação destes no mercado dos biossurfactantes globais é dividida em diferentes áreas como: têxteis, cuidados pessoais, processamento de alimentos, detergentes domésticos, produtos químicos do campo petrolífero, produtos químicos agrícolas, produtos de limpeza industrial e institucionais (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2012). Na Tabela 5 há exemplos do emprego comercial destes biossurfactantes nos mais diversos segmentos industriais.

Tabela 5 - Exemplos de produtos comercializados que contêm em sua composição biossurfactantes.

Biossurfactante	Origem	Fornecedor	Aplicação
BioFuture	Ramnolipídio bacteriano	BioFuture Ltd, Ireland	Biorremediação de solo contaminado com hidrocarboneto.
EC-601	Ramnolipídio bacteriano	Ecochem Ltd, Canada	Agente dispersante de hidrocarbonetos insolúveis em água.
EC-1800	Consortio bacteriano	Ecochem Ltd, Canada	Limpeza de derramamento de óleo no solo, areia e cascalho
EC-2100W	Consortio bacteriano	Ecochem Ltd, Canada	Degrada compostos baseados em hidrocarbonetos em estações de tratamento de águas residuais, lagoas, tanques de armazenamento e outros ambientes aquosos.
JBR products	Ramnolipídio microbiano	Jeneil Biosurfactant Co., LTC, USA	Usado em diferentes segmentos industriais, como alimentos e agro-indústria
Petrosolv	Bactéria desconhecida	Enzyme Technologies Inc, USA	Remoção de óleo, recuperação e processamento de petróleo.
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC, USA	Atividade antifúngica, antibactericida e antitumoral.

Fonte: Adaptado de (REIS et al., 2013)

De acordo com Mukherjee, Das e Sen (2006), apesar das propriedades serem comercialmente atrativas e apresentarem claras vantagens em comparação com os seus homólogos sintéticos, a produção de biossurfactantes em escala comercial apresenta dificuldades devido aos baixos rendimentos e elevados custos de produção - para tais fins, é necessário que estes sejam produzidos e recuperados de forma rentável em larga escala. Assim de acordo com estes autores, considerando as restrições econômicas associadas com a

produção de biossurfactante, três estratégias básicas foram adotadas em todo o mundo para tornar este processo de custo competitivo: (i) o uso de substratos de menor custo e de resíduos para reduzir os custos das matérias-primas iniciais envolvidos no processo; (ii) desenvolvimento de bioprocessos eficientes, incluindo a otimização das condições de cultivo e processos de separação de baixo custo para a produção e recuperação máxima do biossurfactante; e (iii) desenvolvimento e utilização de estirpes mutantes ou recombinantes para obtenção de rendimentos aprimorados.

De acordo com Sourav, et al. (2015) melhorias recentes na tecnologia de produção de biossurfactantes já permitiram o aumento de 10 a 20 vezes na produtividade. Uma vez que os custos de processamento são importantes, avanços na produção de biossurfactante em ambientes não estéreis são necessários. Segundo Youssef et al. (2007) se este processo se tornar viável, reduziria significativamente os elevados custos de produção. Se a biorremediação pode ser executada *in situ*, a produção também poderia ser realizada. Assim, o processo seria ecologicamente e economicamente favorável. Alguns estudos já estão sendo realizados em reservatórios de petróleo, os dados obtidos demonstram a viabilidade desta técnica para recuperação de petróleo, no entanto, os resultados não foram tão eficientes quanto os obtidos em escala laboratorial (YOUSSEF et al., 2007).

2.3.9 Produção em fontes de carbono não convencionais

Enquanto os altos custos de produção de biossurfactantes podem ser aceitáveis quando estes são usados em baixo volume em produtos de alto valor agregado (por exemplo, cosméticos e medicamentos), elevados custos de produção são incompatíveis com outras aplicações, tais como recuperação melhorada de petróleo, que requerem grandes volumes de tensioativos de preço baixo (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Resíduos agroindustriais com alta concentração de carboidratos podem ser empregados como substrato. O espectro disponível de matérias-primas inclui vários subprodutos agrícolas e resíduos industriais. Na Tabela 6 observa-se resíduos com potencial aplicação para a produção de biossurfactantes e os respectivos microrganismos envolvidos nessa bioconversão com seus respectivos rendimentos finais na produção.

Tabela 6 - Matérias-primas de baixo custo para a produção de biossurfactantes por várias estirpes microbianas.

Matéria-prima	Tipo de biossurfactante	Microrganismo	Rendimentos (g/L)	Referências
Óleo de babaçu	Soforolipídios	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055	-	Vance-Harrop et al. (2003)
Óleo de milho turco	Soforolipídios	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	400	Pekin, Vardar-Sukan e Kosaric (2005)
Óleo de girassol e de soja	Ramnolipídio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS1 0-129	4,31 / 2,98	Rahman et al. (2002)
Óleo de soja	Manosileritritol lipídico	<i>Candida</i> sp. SY 16	95	Kim et al. (2006)
Resíduos de óleos de fritura (girassol e azeite de oliva)	Ramnolipídio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T 2 NCIB 40044	2,7	Haba et al. (2000)
Resíduos de Soja soapstock	Ramnolipídio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	11,72	Nitschke et al. (2005)
Resíduos da refinaria de petróleo	Glicolipídios	<i>Candida antarctica</i> e/ou <i>Candida Apicola</i>	10,5 / 13,4	Bednarski et al. (2004)
Resíduos da refinaria de óleo de soja	Ramnolipídio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT1 0	9,5	Abalos et al. (2001)
Soro de leite, coalhada e resíduos de destilaria	Ramnolipídio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2	0,92	Dubey et al., (2001)
Efluentes do processamento de batata	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	-	Thompson et al. (2000); Noah et al. (2005)
Águas residuais de farinha de mandioca	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 e <i>Bacillus subtilis</i> LB5a	2,2-3,0	Nitschke e Pastore (2006)

Fonte: (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e bioetanol, com perspectiva de colher 691 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2016/2017 (PORTAL BRASIL, 2017). Assim, a produção a partir de subprodutos de cana se apresenta com uma grande perspectiva de expansão do conceito de biorrefinaria. Esforços para utilizar alguns dos subprodutos agroindustriais disponíveis já podem ser observados, como pesquisas com melaço, para produção de biossurfactante (DUBEY et al., 2004), bagaço de cana para a produção de etanol (MARTINIANO et al., 2013; CHENG et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2000), xilitol (SILVA et al., 2014), celulasas (CAMASSOLA; DILON, 2014; AIELLO et al., 1996), xilanases (MAYORGA-REYES et al., 2002), bioplásticos (JIAN; HEIKO, 2008), biossurfactantes (MARCELINO, 2016) dentre outros bioprodutos.

O Brasil também está entre os principais produtores de óleos vegetais, tais como óleo de soja, óleo de babaçu e óleo de palma (OLIVEIRA et al., 2009). O alto teor de gorduras, óleos e outros nutrientes presentes nos resíduos destas indústrias os tornam matérias-primas de baixo custo para as indústrias envolvidas na produção de metabólitos secundários úteis (MAKKAR; CAMEOTRA, 2011).

2.3.10 Biomassa vegetal: Palha de cana-de-açúcar

2.3.10.1 Plantio e características estruturais da biomassa lignocelulósica

A palha de cana é um subproduto da indústria sucroalcooleira que está se tornando um material abundante e disponível a partir da substituição gradual da colheita com queima pela colheita mecanizada da cana, a qual tem como finalidade reduzir os prejuízos ambientais, agrônômicos e econômicos da colheita com queima, aumentando a sustentabilidade do processo (PIPPPO et al., 2011).

De acordo com Mariani et al. (2006) a palha da cana-de-açúcar constitui-se de tudo que é retirado antes do processo de esmagamento que extrai o caldo da cana (utilizado para produzir o açúcar e o álcool). Isso inclui não somente as folhas secas, mas também as verdes e o "ponteiro" (ponta) da planta. Ainda segundo este autor, em cada tonelada de cana, 140 Kg é palha. A produtividade média de cana-de-açúcar no Brasil é de 85 toneladas por hectare, 12 toneladas de palha e 12 toneladas de bagaço (SANTOS et al., 2012).

Quanto à estrutura da palha de acordo com Jayaraman et al. (2003), as fibras vegetais podem ser consideradas compósitos de fibras de celulose

mantidas coesas por uma matriz constituída de lignina e hemicelulose, cuja função é agir como barreira natural à degradação microbiana e servir como proteção mecânica. A utilização da biomassa como fonte de carboidratos para obtenção de combustíveis e produtos químicos de alto valor agregado tem sido severamente dificultada pela sua recalcitrância (SANTOS et al., 2012). Na Figura 11 há um esquema que representa a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica com a estrutura química das moléculas que constituem a maior proporção da parede celular.

A composição química da biomassa lignocelulósica geralmente varia de acordo com o tipo de biomassa, podendo ser encontrada 40 a 80% de celulose, 10 a 40 % de hemicelulose e 5 a 25 % de lignina (CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011).

A celulose é um polissacarídeo constituído por uma cadeia linear de várias centenas a mais de dez mil unidades de D-glicose, ligadas por ligações glicosídicas β 1,4. Esta possui regiões amorfas ou solúveis, nas quais as moléculas são menos compactas e mais facilmente hidrolisadas pelas celulasas (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012) (Figura 11).

A hemicelulose também é um dos principais constituintes da palha, é um polímero de cadeia heterogênea com variações significativas na composição entre os tipos de colheita (SAHA, 2003). Os polímeros de hemicelulose podem consistir em cinco e seis açúcares de carbono diferentes, principalmente xilose, manose, arabinose, glicose e galactose. Não só os açúcares, mas também os ácidos urónicos, ferulados e cumarinas podem fazer parte da estrutura da hemicelulose. Além disto, até 70% das moléculas de xilose presentes no esqueleto da hemicelulose são acetiladas (HATFIELD; RALPH; GRABBER, 1999; SAHA 2003). Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). A estrutura da hemicelulose pode ser observada na Figura 11.

A lignina é uma estrutura complexa que se desenvolve principalmente a partir de compostos fenólicos, com tamanhos variando de 1 a 100 kDa (TOLEDANO et al., 2010). Diferentemente da celulose e hemicelulose que têm estruturas bem definidas e conhecidas, as ligninas são biopolímeros tri-dimensionais amorfos com uma estrutura molecular complexa. Além do mais, a composição de lignina difere entre as espécies e as alterações durante a maturação da planta, quando as paredes celulares mais lignificadas são desenvolvidas (GRABBER et al., 2005). A complexa estrutura da lignina pode ser observada na Figura 11.

2.3.10.2 Potencial da palha de cana para produção de bioprodutos e bioenergia

Com o aumento anual da produção de cana, há crescente necessidade de estudar um destino para os resíduos que devido sua alta concentração de açúcares podem ser empregados em cultivos para a produção de distintos bioprodutos. Em 2017 a área colhida deverá ser de cerca de 9 milhões de hectares, com um aumento de 468,2 mil hectares em relação à última safra, quando ocupou 8,6 milhões de hectares. Se confirmada, esta será a maior área colhida no Brasil com a cultura (PORTAL BRASIL, 2017).

O setor sucroenergético tem exibido uma demanda de retirar a palha do campo e levar para indústria para geração de bioenergia e etanol de 2ª geração (LOMBARDI et al., 2012). No entanto, milhões de toneladas de uma rica fonte de energia são desperdiçadas ou queimadas todos os anos no Brasil. Aliado à disponibilidade dessa fonte de energia e bioprodutos abundantes, existe outro motivo que impõe aos produtores a tarefa de utilizar esta biomassa no lugar de queimá-la antes da colheita (MARIANI et al., 2006). Este é o projeto de Lei 0380/2001, do Estado de São Paulo, que proíbe a queima da cana-de-açúcar na lavoura, gradativamente até 2021, para área mecanizável, e até 2031 para área não mecanizável (MARIANI et al., 2006).

Algumas utilizações da biomassa palha de cana-de-açúcar têm sido estudadas, havendo pesquisas direcionadas para a combustão de palha de cana para geração de eletricidade (LEAL et al., 2013), emprego desta na produção de bioetanol, xilitol (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016), acetato de celulose e carboximetilcelulose (CANDIDO; GONÇALVES, 2016).

O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, etapa para "desmontar" a parede celular liberando os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis pode ser realizado por processos biológicos, químicos, físico-químicos, físicos ou a combinação destes métodos (KUMAR et al., 2009).

Segundo Mussatto e Roberto (2004) materiais lignocelulósicos quando hidrolisados liberam açúcares (D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, e L - arabinose) e diversos compostos derivados de açúcar (furfural, hidroximetilfurfural), ocorre degradação da celulose, hemicelulose (libera açúcares e ácido acético) e degradação da lignina (ácido siríngico, *p*- ácido hidroxibenzóico, vanilina, e outros compostos).

A hidrólise ácida diluída afeta principalmente a fração hemicelulósica, tornando-a solúvel, enquanto exerce um impacto mínimo na degradação da lignina (BINOD et al., 2010). O uso dessa técnica altera a estrutura da biomassa permitindo a recuperação dos açúcares da fração hemicelulósica. Esta tem sido utilizada em diversos estudos envolvendo uma variedade de biomassas agrícolas como bagaço de maçã (DALANHOL, 2014), palha de sorgo (SENE et al., 2011), palha de trigo (CANILHA; CARVALHO; FELIPE, 2008), palha de arroz (HSU et al., 2010), palha de cana-de-açúcar (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015) e bagaço de cana (CANILHA et al., 2010; ARRUDA, 2011).

No entanto, os subprodutos da degradação do açúcar e a lignina afetam negativamente a eficiência de fermentação, porque alguns destes são tóxicos para os microrganismos fermentativos inibindo o seu metabolismo. Os tipos de compostos tóxicos e a sua concentração em hidrolisados lignocelulósicos dependem das condições operacionais utilizadas para a hidrólise e da matéria-prima utilizada (MUSSATTO; ROBERTO, 2004). Os compostos tóxicos formados da hidrólise podem inibir o crescimento dos microrganismos por afetar a sua taxa de absorção de açúcar e simultaneamente diminuir a sua velocidade de formação de bioprodutos (PALMQVIST; NILVEBRANT; HAHN-HÄGERDAL, 1998). Na Figura 12, observa-se os mais importantes produtos da degradação de açúcares, os compostos cíclicos furfural e 5-hidroximetilfurfural.

Figura 12 - Formação de furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido levulínico e ácido fórmico a partir dos monossacarídeos glicose e xilose em meio ácido.

Fonte: (NABARLATZ, 2006)

Um inibidor comumente liberado na hidrólise ácida diluída é o ácido acético. A liberação deste não pode ser evitada uma vez que o mesmo pertence à fração hemicelulósica (LAKSHMANASWAMY et al., 2011). Estudos reportam que apenas as formas não dissociadas dos ácidos difundem no citosol das células dos microrganismos, onde ocorre a dissociação devido ao pH neutro intracelular. Conseqüentemente há uma diminuição do pH interno que deve ser compensada por ATPase de membrana (enzima que catalisa a hidrólise de ATP) que bombeia os prótons para fora da célula, na tentativa de manter o pH intracelular em valores fisiológicos à custa de hidrólise de ATP (VERDUYN, et al., 1992). Quando a concentração de ácido é elevada, a capacidade de bombeamento de prótons da célula é esgotada fato que origina acidificação do citoplasma e perda de viabilidade celular (VIEGAS, SA-CORREIA, 1991). Em *Candida guilliermondii* FTI20037 foi constatado que o efeito deste ácido presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar é dependente de sua concentração no meio e do tempo de fermentação em que este ácido é adicionado, uma vez que a concentração de até 3,5 g/L deste favoreceu a bioconversão de xilose em xilitol por esta levedura (SILVA et al., 2004).

Ainda sobre os compostos tóxicos formados durante a hidrólise ácida diluída, nesta etapa os compostos fenólicos são gerados a partir da decomposição da lignina e apresentam efeito inibidor considerável sobre a fermentação de hidrolisados, aqueles com baixo peso molar são os mais tóxicos. Além destes compostos, outras substâncias são formadas durante a hidrólise. Por

isso, eles devem ser removidos ou neutralizados antes da fermentação. A estrutura química destes compostos fenólicos está representada na Figura 13.

Nascimento (2015) relatou que em cultivo das leveduras da Antártica *Cryptococcus laurentii* (L62), *Cryptococcus adeliensis* (L95), *Candida davisiana* (L101 e 107) e *Guehomyces pullulans* (L109) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado ocorreu a redução na concentração de todos os compostos tóxicos, bem como a de açúcares, ao mesmo tempo em que se notou redução progressiva destes compostos com o aumento do fator de diluição do hidrolisado e consequente diminuição da concentração destes. No entanto, ainda não se sabe se estes microrganismos são capazes de tolerar altas concentrações de tóxicos, pois, na literatura não há mais relatos sobre a tolerância de leveduras isoladas da Antártica á tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos.

Figura 13 - Compostos químicos originados da degradação da lignina pela hidrólise ácida diluída.

Fonte: Autoria própria.

Para tornar os substratos lignocelulósicos mais adequados para o metabolismo dos microrganismos realiza-se a destoxificação. Dentre os tipos de destoxificação têm-se: física (mediada por membrana, evaporação), química (supercalagem, hidróxido de cálcio, neutralização, resinas de permuta iônica, coluna de carvão ativado e a extração com acetato de etila), biológico (microbiana

e enzimática), e desintoxicação microbiana *in situ*, aplicada para remediar inibidores da fermentação (PARAWIRA; TEKERE, 2011). Os métodos químicos baseiam-se em processos de alteração do pH e na adição de substâncias redutoras, que podem modificar a estrutura química dos compostos inibidores, alterando o grau de toxicidade (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, J., 1998).

Na utilização de hidrolisado hemicelulósico em bioprocessos o carvão ativado vegetal tem sido bastante empregado como agente de destoxificação, a exemplo da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de xilitol por leveduras da Antártica (NASCIMENTO, 2015; APOLINARIO, 2014) e hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016). Segundo Marton, (2005) este adsorvente possui uma estrutura carbônica a qual é submetida a processos de ativação para adquirir principalmente a melhoria da propriedade de adsorção causada pelo enorme aumento da área superficial de suas partículas podendo chegar de 600 a 1200m²/g (CARBOMAFRA, sd.).

Na literatura encontram-se pesquisas que exploram a potencial aplicação de hidrolisados hemicelulósicos para a produção de biossurfactantes. Há estudos com hidrolisado hemicelulósico de casca de uva destilada, (RIVERA et al., 2007), cascas de farelo de cevada, galhos de videira, espiga de milho e eucalipto (MOLDES et al., 2007). Nota-se nestas pesquisas que a partir do cultivo de *Lactobacillus pentosus* nestes distintos hidrolisados obteve-se resultados diferentes quanto a produção de biossurfactante. O maior fator de conversão relatado na pesquisa de Moldes et al. (2007) foi de 0,71 g de biossurfactante por grama de biomassa na fermentação em hidrolisado de galhos de videira. Ainda segundo Moldes et al. (2007) os diferentes fatores de conversão obtidos foram atribuídos a composição diferente dos hidrolisados.

2.3.11 Extração e caracterização de biossurfactantes

Como etapa importante para o desenvolvimento de tecnologia de produção de biomoléculas, a exemplo dos biossurfactantes, se encontra o processo de recuperação e/ou purificação. Esta etapa requerida para obtenção de produtos biotecnológicos normalmente representa cerca de 60% dos custos totais de produção, o que torna a comercialização e produção de biossurfactantes um processo de elevado custo tornando atrativo o uso de substratos renováveis e de

baixo custo (DESAI; BANAT, 1997; MAKKAR, CAMEOTRA, 1997). Ainda neste contexto, convém ressaltar alguns métodos a serem utilizados para a análise química e estrutural das biomoléculas isoladas no meio de cultivo, os quais dependem do quanto de informação é requerida, estes podem ser desde ensaios colorimétricos até métodos mais sofisticados como espectrometria de massas e RMN (Ressonância magnética nuclear) (SMYTH et al., 2010). Ainda segundo estes autores, um procedimento experimental recomendado é seguir os seguintes passos: (1) a extração do meio de cultura, (2) detecção do melhor método de extração, (3) separação e purificação do produto bruto (4) análise estrutural.

Segundo Desai e Desai, A. (1993); Sen e Swaminathan (2005) a carga iônica (cromatografia), a solubilidade (água/solventes orgânicos) e a localização (intracelular, extracelular, ligado a células) determinam o procedimento de purificação para o biossurfactante a ser extraído. Quanto à recuperação dos biossurfactantes utilizando uma combinação de técnicas tradicionais obtêm-se altos rendimentos, tais como precipitação, cristalização, centrifugação, extração com solvente e liofilização. Quanto à técnica de extração por solvente, empregada neste estudo, como os lipídios têm uma grande faixa de relativa hidrofobicidade, é praticamente inviável a utilização de um único solvente universal para a extração dos lipídios (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1998). Lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos por solventes apolares, enquanto lipídios polares, os quais estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D´ARCE, 2009). Exemplos de solventes largamente utilizados incluem misturas de clorofórmio-metanol (KIM et al.; 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2006), clorofórmio-etanol (ZHANG; MILLER, 1992; COSTA et al., 2006), diclorometano (COOPER et al., 1981; JOSHI et al., 2008), acetato de etila (DÉZIEL et al., 1999; CHAYABUTRA; WU; JU, 2001) e metanol (OHNO; ANO; SHODA, 1995; GHOSAVAND et al., 2008). No entanto, é necessário desenvolver uma técnica mais econômica e ecologicamente correta para recuperar os biossurfactantes (SEN; SWAMINATHAN, 2005; CHEN; WEI; CHANG, 2007). Na Tabela 7, destacam-se alguns dos diferentes solventes já utilizados e rendimentos na extração de biossurfactantes produzidos a partir de distintas leveduras. Pode-se notar que assim como nesta pesquisa, na extração de muitos biossurfactantes os maiores rendimentos também são obtidos com a mistura clorofórmio/metanol.

Os biossurfactantes apresentam massa molar de 500 a 1500 Da (BOGNOLO,1999), os de elevada massa molar são enormes e estruturalmente complexos (FONTES et al., 2012). Portanto, estes podem ser analisados por ensaios colorimétricos por método de Lowry para dosagem de proteínas totais (LOWRY et al.,1951), açúcares pelo método fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER et al., 1959) e fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteau (SINGLETON; ROSSI, 1965). A combinação de todas estas diferentes metodologias é importante para prever a estrutura destas biomoléculas.

Tabela 7 - Quantidades de biossurfactantes produzidos por diferentes leveduras e mistura de solventes utilizados na extração.

Microrganismo	Fonte de carbono	Solvente para extração (proporção)	Rendimento (g/L)	Referência
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicerina	Clorofórmio/ Metanol (8:8)	7,9	Fontes, et al. (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Suco de caju	Clorofórmio/ Metanol (1:1)	6,9	Fontes, et al. (2012)
<i>Candida lipolytica</i>	Óleo de canola/ Glicose	Acetato de etila	8,0	Sarubbo, Farias e Campos-Takaki (2007)
<i>Candida sphaerica</i>	Óleo de amendoim (Resíduo de refinaria)	Clorofórmio/ Metanol (1:2)	4,5	Sobrinho et al. (2008)
<i>Candida lipolytica</i>	Efluente industrial	-	4,5	Rufino et al. (2007)
<i>Candida Glabrata</i>	Óleo de semente de algodão/ glicose	Clorofórmio (1:1)	10	Sarubbo, Luna e Takaki (2006)
<i>Candida antarctica</i>	Soapstock	-	15,9	Bednarski et al. (2004)
<i>Candida utilis</i>	Óleo de milho	-	0,9	Sheperd et al. (1995)

Fonte: Adaptado de (FONTES et al., 2012)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar a partir de 24 leveduras provenientes do continente da Antártica aquelas com capacidade de produzir biossurfactantes em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar e caracterizar parcialmente a biomolécula que apresentar maior propriedade tensoativa e emulsificante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de biossurfactantes por leveduras da Antártica em meio semi-definido contendo xilose ou glicose como principal fonte de carbono.
- Selecionar dentre as leveduras que são positivas para a produção de biossurfactantes em meio semi-definido, aquelas com capacidade de produção destes biocompostos em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar.
- Caracterizar parcialmente o bioproduto.
- Testar a estabilidade da emulsão frente a diferentes fatores ambientais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para compreensão de todo processo de seleção da levedura produtora de biossurfactante e caracterização parcial da biomolécula a Figura 14 destaca os principais procedimentos envolvidos.

Figura 14 - Representação esquemática dos processos envolvidos para a seleção da levedura e caracterização parcial do biossurfactante.

Fonte: Autoria própria.

4.1 MICRORGANISMOS

Neste trabalho 24 leveduras isoladas do continente Antártico provenientes de diferentes fontes (Tabela 9), foram estudadas quanto à produção de biossurfactantes. Estas foram previamente isoladas em meio BDA (batata dextrose ágar) a 15 °C, na Divisão de Recursos Microbianos (DRM) do Centro

Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (CPQBA/UNICAMP).

Tabela 8 - Linhagens de leveduras da Antártica isoladas no CPQBA/ UNICAMP e suas respectivas fontes de isolamento (*).

Levedura (Código da Linhagem)	Fontes
<i>Metschnikowia australis</i> (L02)	Sedimento marinho
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L121)	
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> (L94)	Estrela do mar
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95)	
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L108)	
<i>Guehomyces pullulans</i> (L109a)	
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L110)	
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> (L112)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L07)	Alga marinha
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L26)	Líquen
<i>Tremella indecorata</i> (L99)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L34)	Nacella
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L49a)	Salpa
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L52)	Ascídia
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L59)	Ouriço do mar
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L62)	
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L63)	
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L64)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L65)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L67b)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L69)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L73)	
<i>Candida davisiana</i> (L101)	Rocha com líquen
<i>Candida davisiana</i> (L107)	

* A coleta foi realizada em março de 2010.

Estes isolados foram identificados pela equipe da Profa. Dra. Lara D. Sette (UNESP/Rio Claro) e encontram-se depositados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e da Indústria (CBMAI) da UNICAMP. Dentre estas leveduras L62, L95, L101, L107, L109 foram identificadas como xilanolíticas (NASCIMENTO, 2015), e L02, L07, L26, L34, L38, L49, L52, L65, L67b, L69, L73, L95, L109, L110 foram identificadas como proteolíticas (CHAUD, 2014). Convém ressaltar que, devido a levedura *Candida guilliermondii* ser amplamente pesquisada por metabolizar a xilose (SENE et al., 2011; CANILHA; CARVALHO; FELIPE, 2008; SILVA et al., 2005) e apresentar alta assimilação deste açúcar pentose, esta também foi estudada para a produção de biossurfactantes.

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO SEMI-DEFINIDO PARA AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE BIOTENSOATIVA E BIOEMULSIFICANTE

O preparo do inóculo para os cultivos foi realizado a partir de células preservadas por congelamento (ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) em criotubos (1mL) com solução de glicerol 10% (v/v). O conteúdo dos criotubos foi transferido assepticamente para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio caldo Sabouraud e incubados a 150 rpm, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h. As células recém ativadas foram semeadas utilizando alça de platina em tubos de ensaio contendo Agar Sabouraud inclinados e mantidos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48h. Alçadas destas culturas recém repicadas foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio descrito por Kitamoto et al. (1990), o qual é constituído de KH_2PO_4 (2 g/L), extrato de levedura (10 g/L), NaNO_3 (20 g/L) e MgSO_4 (2 g/L), 4% de fonte de carbono, xilose ou glicose, em agitação de 150 rpm, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Após 48 horas de cultivo centrifugou-se todo o conteúdo dos frascos, desprezou-se o sobrenadante. A seguir, a partir do cultivo de 48 horas descrito anteriormente inoculou-se um volume de suspensão de células para se obter 10^6 células/mL no início da fermentação. Este cultivo foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio descrito por Kitamoto et al. (1990) contendo xilose ou glicose (mesmo meio utilizado para preparo do inóculo), por 72 horas, em agitação de 150 rpm, 25°C . Ao fim da fermentação realizou-se a contagem de células viáveis por câmara de Neubauer com o corante azul de metileno (solução de 0,01 % de azul de metileno em 2% de citrato de sódio).

Os sobrenadantes foram obtidos a partir da centrifugação a 1008 g por 15

minutos, dos quais se analisou consumo dos açúcares glicose e xilose por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), aferição do pH, testes de propriedade emulsificante e tensoativa. As leveduras que apresentaram consumo de xilose maior ou igual a 80% e índice de emulsificação maior que 40% foram empregadas para a produção de biossurfactante em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar destoxificado.

4.3 TESTES PARA DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTE E TENSOATIVA

4.3.1 Determinação do índice de emulsificação

O ensaio de emulsificação foi realizado utilizando-se 1 mL do sobrenadante obtido após centrifugação a 1008 g e 1 mL de querosene, estes foram transferidos para tubos de ensaio (100mm x 15mm) e agitados em vórtex durante 2 minutos. Foram realizados ensaios apenas com o meio de cultivo não inoculado e o querosene como controle negativo. Após 2 horas da agitação a altura das fases da emulsão foi medida sendo esta realizada novamente após 24 horas para verificar a estabilidade da emulsão formada (FRANCY et al. 1991). O índice de emulsificação (IE) corresponde à razão entre a altura da camada de emulsão e a altura total da fase oleosa. $IE = 0$ indica que não houve emulsificação, $IE = 1$, 100% de emulsificação. Um emulsificante é considerado promissor se tiver IE superior a 0,4 (40% de emulsificação da fase oleosa) duas horas após agitação (BOSCH et al. 1998). A emulsão é considerada estável se o IE após 24h corresponder a 50% ou mais do IE medido com duas horas (GARCIA, 2011). Os testes foram realizados com os sobrenadantes obtidos dos cultivos em triplicata.

4.3.2 Teste de espalhamento da Gota: propriedade tensoativa

Para determinação da propriedade tensoativa foram pipetados 100 µL de óleo lubrificante automotivo sobre uma superfície de 50 mL de água destilada em uma placa de Petri para formar uma fina camada de óleo. Em seguida um volume de 100 µL do sobrenadante obtido após centrifugação foi adicionado sobre o centro da mesma placa na região em que o óleo estava presente. A formação de uma zona clara indica o tamanho da zona de dispersão. Esta é uma adaptação do método desenvolvido por Morikawa, Hirata e Imanaka (2000).

4.4 CULTIVO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR DESTOXIFICADO

Para o cultivo primeiramente foi necessário a caracterização da palha de cana-de-açúcar e do hidrolisado hemicelulósico concentrado e destoxificado. Os processos envolvidos para caracterização e obtenção do hidrolisado estão apresentados na Figura 15.

Figura 15 - Representação esquemática do processo que envolve o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar destoxificado.

* A caracterização química foi realizada ao fim de cada processo da obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria.

4.4.1 Caracterização da palha de cana-de-açúcar

A palha de cana-de-açúcar utilizada no presente trabalho foi cedida pela usina sucroalcooleira de Pederneiras localizada na cidade de Tietê, SP. Esta inicialmente apresentava umidade de 40%. Com a finalidade de evitar a deterioração da palha durante a armazenagem, a mesma foi submetida à secagem ao ar livre, até umidade menor ou igual a 10%. A metodologia empregada durante toda a caracterização foi a adotada por Ferraz, (2000).

4.4.1.1 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade da palha de cana-de-açúcar foi determinado por meio de secagem de amostra em balança com infravermelho, a 105°C, até massa

constante. Este teor foi determinado pela diferença de massa calculada pela balança obtida antes e após o aquecimento e conseqüente secagem de toda a água presente na amostra.

4.4.1.2 Remoção de extrativos

Aproximadamente 3 g de amostras de palha de cana-de-açúcar moída e peneirada a 28 mesh sofreram o processo de extração por um período de 6 h, em extrator Soxhlet com etanol 95%.

4.4.1.3 Hidrólise ácida

A caracterização química da palha de cana foi realizada da seguinte forma: 300 mg de amostra de palha de cana seca e sem extrativos foram pesadas em tubos de ensaio (triplicata) nos quais foram adicionados 3 mL de H₂SO₄ 72% (m/m). O experimento foi conduzido em banho-maria a 30 °C, por uma hora. Durante este período a amostra foi homogeneizada a cada 10 minutos com auxílio de bastão de vidro. Após uma hora a amostra foi transferida, cuidadosamente, para frascos Erlenmeyer de 250 mL e acrescida de 84 mL de água destilada, de modo que o ácido atingisse concentração final de 3%. Os frascos foram levados à autoclave a 121 °C durante uma hora. O material resultante foi resfriado e em seguida filtrado, em filtro de vidro de placa porosa.

4.4.1.4 Teor de lignina insolúvel

A lignina, retida no filtro de placa porosa, foi lavada com aproximadamente 100 mL de água destilada, os filtros foram dispostos em estufa a 105°C, até atingir massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel presente na amostra foi obtida de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ Lignina insolúvel: } \frac{m_{CA} - m_{CV}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: m_{CA} e m_{CV} correspondem à massa do funil com amostra após secagem e massa do funil vazio, m_{amostra} equivale à massa seca.

4.4.1.5 Teor da lignina solúvel

Uma alíquota que foi obtida da hidrólise foi utilizada para análise de lignina solúvel. Esta solução foi analisada em espectrofotômetro a 276 nm. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 2.

$$\% \text{ Lignina solúvel} = \frac{ABS \times Vol \times Dil}{\epsilon \times m_{amostra} \times Cubeta} \times 100 \quad (2)$$

Onde: ABS= absorbância da amostra a 276 nm; ϵ = absortividade molar da lignina da biomassa a 276 nm ($25 \text{ Lg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); D= Fator de diluição; $M_{amostra}$ = Massa da amostra seca; Cubeta = passo óptico da cubeta (1 cm).

A concentração de lignina total pode ser obtida a partir da equação 3.

$$\% \text{ Lignina total} = \% \text{ Lignina solúvel} + (\% \text{ Lignina insolúvel} - \% \text{ Cinzas}) \quad (3)$$

4.4.1.6 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina

Uma alíquota da fração líquida que foi obtida da hidrólise ácida da palha foi diluída e filtrada em cartucho Sep-Pak e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para obter a concentração de glicose, xilose, celobiose e arabinose, assim como de ácido acético, que foi utilizado no cálculo da porcentagem de celulose e hemicelulose presentes na amostra pelas equações 4 e 5.

$$\% \text{ Celulose} = \frac{C_{Glicose} \times Vol \times Fc}{m_{amostra}} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \frac{(C_{xil} \times Vol \times Fc_{xil}) + (C_{ara} \times Vol \times Fc_{ara}) + (C_{AA} \times Vol \times Fc_{AA})}{m_{amostra}} \times 100 \quad (5)$$

Onde: C_{Glicose} , C_{xil} , C_{ara} , e C_{AA} correspondem às concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, respectivamente. F_c = fator de conversão de celulose em glicose (0,9), $F_{c_{\text{xil}}}$ = fator de conversão de hemicelulose em xilose (0,88), $F_{c_{\text{ara}}}$ = fator de conversão de hemicelulose em arabinose (0,88) e $F_{c_{\text{AA}}}$ = fator de conversão de hemicelulose em ácido acético (0,983), Vol = volume obtido da filtração em filtro de placa porosa e m_{amostra} = massa seca da amostra.

4.4.1.7 Determinação de cinzas

A biomassa livre de extrativos foi pesada em triplicata (0,500 g em base seca) em cadinhos previamente tarados. Os cadinhos com a amostra foram levados a mufla a 575 °C por 24h. Após resfriamento em dessecador, os cadinhos foram novamente pesados e a massa de cinzas totais determinada utilizando-se a equação 6.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (6)$$

Onde: m_{cinzas} e m_{amostra} correspondem à massa das cinzas após secagem na mufla e massa da amostra antes deste procedimento, respectivamente.

4.4.2 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de planta de cana-de-açúcar destoxificado

A hidrólise ácida diluída da palha e ponta proveniente da colheita de cana é o processo utilizado para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico empregado conforme metodologia já descrita por Hernández-Pérez (2015) nas seguintes condições: 20 minutos, 121 °C, 1% (m/v) de H_2SO_4 e relação matéria seca: solução ácida 1:10 (m/v). Posteriormente realizou-se concentração à vácuo em um concentrador de aço inox à temperatura de 70 °C $\pm$ 5 °C, com capacidade de 30L para alcançar a concentração aproximada de 40 g/L de xilose no hidrolisado. A destoxificação do hidrolisado é realizada mediante ajuste de pH e adsorção em carvão ativo, segundo a metodologia estabelecida por Marton et al. (2006). Sendo assim, primeiramente o pH do hidrolisado foi ajustado a 7,0 com CaO mediante agitação para a solução permanecer homogênea e na sequência, o pH foi ajustado a 2,5 com H_3PO_4 também mediante agitação. Adicionou-se carvão ativado (pó refinado) 1,0% (m/v) ao hidrolisado e a mistura foi mantida sob agitação de 100rpm por 30 min a 60 °C. Todos os precipitados formados durante

o processo foram removidos mediante filtração a vácuo. O pH do hidrolisado hemicelulósico foi ajustado para 5,5 com micro pérolas de NaOH e autoclavado a 110 °C por 15 minutos.

4.4.3 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar

4.4.3.1 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético e tóxicos

Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (HPLC) foi realizada para determinação da concentração de D-glicose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético, furfural, 5-HMF. Nas seguintes condições: coluna “Bio-Rad Aminex” HPX-87H mantida a 45 °C; detector de índice de refração RID 6A; eluente ácido sulfúrico 0,05M, fluxo de 0,6 mL/min.; volume da amostra injetada, 20 µL. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pack” C18 (MILLIPORE). As concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural também foram determinadas por HPLC, nas seguintes condições: coluna Hewlett-Packard RP18 mantida a 25 °C; detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS; eluente, solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL/min; volume da amostra injetada 20µL. As amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart 0,22 µm (MILLIPORE).

4.4.3.2 Determinação de compostos fenólicos totais no hidrolisado hemicelulósico pelo método de Folin-Ciocalteu

Inicialmente foi realizada a curva analítica, e para esta preparou-se solução padrão de ácido tânico na concentração de 0,1 g/L e esta foi diluída nas seguintes concentrações 0,05g/L, 0,03g/L 0,02g/L, 0,0133g/L e 0,01g/L. A seguir preparou-se a solução de carbonato de sódio (75g/L) e o reativo de Folin-Ciocalteu diluído numa proporção 1:2 em álcool etílico (98%). Este reativo foi mantido em frasco âmbar. Foram pipetados 500µL da solução de ácido tânico, 1250µL de carbonato de sódio e por fim 250µL de Folin-Ciocalteu diluído, o qual foi pipetado no escuro. A mistura foi agitada em vortéx e esta reação foi mantida no escuro por 30 minutos e a leitura das absorbâncias foi realizada por espectrofotometria (Espectrofotômetro Biospectro SP-220) a 755nm. Para a leitura das amostras

foram pipetados 500µL de amostra em substituição a solução de ácido tânico (SINGLETON; ROSSI, 1965).

4.4.3.3 Determinação da concentração de saponinas no hidrolisado hemicelulósico destoxificado

De acordo com a metodologia empregada por Vigo, Narita e Marques (2003) primeiramente preparou-se uma curva analítica de saponina com cinco distintas concentrações: 0,08, 0,12, 0,16, 0,20 e 0,28 mg/mL. Posteriormente, realizou-se a extração e purificação da fração saponina do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar destoxificado. Este foi submetido à extração com três alíquotas de 10 mL de metanol-água (4:1) utilizando funil de separação e adição de NaCl até visualização da formação da fase aquosa e orgânica. Concentrou-se o extrato metanólico, extraiu-se este com três porções de 10 mL de n-butanol saturado com água. Recolheu-se a fração butanólica que foi concentrada até a secura em estufa a 40°C. Dissolveu-se o resíduo em 10 mL de água. Uma alíquota de 1mL desta solução foi adicionada em 1 mL de cloreto de cobalto 0,2% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Realizou-se a leitura da solução por espectrofotometria a 284 nm para verificar a absorbância das amostras.

4.4.3.4 Condições de cultivo das leveduras da Antártica em hidrolisado hemicelulósico de palha e ponta de cana-de-açúcar

Nesta etapa apenas as leveduras cultivadas em meio descrito por Kitamoto et al. (1990) que apresentaram propriedade tensoativa e índice de emulsificação acima de 40%, além de, consumo de xilose superior ou igual a 80% foram selecionadas para serem cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar. Sendo assim, o hidrolisado concentrado e destoxificado foi suplementado com os nutrientes KH_2PO_4 (2 g/L), extrato de levedura (10 g/L), NaNO_3 (20 g/L) e MgSO_4 (2 g/L) conforme descrito por Kitamoto et al. (1990). Os cultivos foram realizados a partir de células preservadas por ultracongelamento em criotubos (1mL) com solução de glicerol 10% (v/v) a $-80^\circ\text{C} \pm 2$. Estas foram ativadas conforme mencionado no item 4.2. O cultivo ocorreu em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio, em triplicata, agitador rotatório a 150 rpm, 25 °C, concentração inicial de células de 10^6 células/mL (correspondente

a 6 log.células/mL), por um período de até 96 horas, amostras foram retiradas no intervalo de 24 horas. Para cada amostra obtida do cultivo avaliou-se a viabilidade celular, por câmara de Neubauer com o corante azul de metileno. A seguir as amostras foram centrifugadas a 1077 g por 15 minutos, e o sobrenadante utilizado nos testes de propriedade emulsificante e tensoativa, (estes já foram descritos nos itens 4.3.1 e 4.3.2), concentração de açúcares e aferição do pH. A tensão superficial (TS) do sobrenadante da levedura selecionada foi determinada pelo método da gota pendente utilizando-se 200 µL de amostra, á partir de um tensiômetro digital (*Kruss FM40 – Easy Drop*) e o software *DropShape analysis*.

4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PARCIAL DO BIOSSURFACTANTE

Nesta fase do estudo a levedura com maior índice de emulsificação e tensoatividade dentre as três que foram cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar destoxificado, foi cultivada em Erlenmeyers de 1L contendo 200 mL de hidrolisado suplementado com os nutrientes descritos por Kitamoto et al., (1990) por 72 horas, 25°C, 150 rpm para obter sobrenadante suficiente para extração e posterior caracterização parcial bioquímica da biomolécula.

4.5.1 Extração dos biossurfactantes

O pH do sobrenadante obtido após 72 horas de cultivo da levedura foi ajustado para 2,0 (HCl 6 mol·L⁻¹). O sobrenadante acidificado foi mantido a 4°C por 12 horas para a precipitação do biossurfactante. O precipitado foi separado por centrifugação a 12500·g por 10 minutos (GHOJAVAND et al., 2008). A solução resultante foi submetida a diferentes métodos de extração para determinação do método de maior rendimento para a extração da biomolécula. Estes foram os seguintes, clorofórmio/metanol (4:1), clorofórmio/metanol (2:1), hexano/acetato de etila (7:3) e acetato de etila. Em cada um dos métodos foi realizada a extração com três alíquotas de 30 mL da mistura de solventes a ser empregada utilizando funil de separação e adição de NaCl até visualização da formação da fase aquosa e orgânica. Após a extração realizada por 3 vezes consecutivas evaporou-se a fase orgânica a 50°C sob pressão reduzida obtendo-se a fração residual, em rotaevaporador, denominada extrato bruto e o volume foi ressuspensionado com água destilada (BUGAY, 2009). Para avaliar se houve

diferença significativa entre os rendimentos de extração obtidos nos diferentes métodos de extração utilizou-se o teste de Tukey a 95% de confiança. Para tanto, o Software SISVAR 5.3 foi utilizado (FERREIRA, 2011).

4.5.2 Métodos analíticos para a determinação da composição bioquímica parcial do biossurfactante

O extrato bruto foi analisado quanto à presença de porções tais como proteínas, carboidratos e lipídeos. A concentração de proteína total foi quantificada pelo método de Lowry, (LOWRY et al., 1951) açúcares totais pelo método de fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER et al., 1959) e fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), como já descrito no item 4.4.3.2. Diante dos resultados destas análises determinou-se a composição bioquímica parcial do biossurfactante.

4.5.3 Determinação de açúcar total pelo método de fenol sulfúrico

A determinação de açúcar total foi realizada pelo método descrito por Dubois et al. (1956). Primeiramente preparou-se uma curva analítica e para isto as seguintes soluções foram realizadas: solução de fenol 5 % (5 mL de fenol liquefeito foi diluído em uma proporção de água destilada e completou-se o volume para 100mL), solução de glicose 0,1g % (m/v), a qual foi diluída numa proporção 1:10 para obter uma solução de 100µL/mL. Em tubos de ensaio foram pipetados os diferentes volumes da solução de glicose diluída e água destilada, estes e os demais reagentes com seus respectivos volumes estão apresentados na Tabela 1 (Apêndice A). As leituras foram realizadas por espectrofotometria a 490 nm. Para a leitura da amostra foi pipetado 500 µL de amostra e as demais soluções e realizada a leitura espectrofotométrica.

4.5.4 Determinação de açúcar redutor total pelo método do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)

De acordo com a metodologia estabelecida por Miller et al. (1959) para o preparo da solução de DNS foram adicionados 5,3 g de ácido, 3,5 dinitrosalicílico e 9,9 g de NaOH em 700 mL de água destilada. Após a dissolução destes reagentes foram adicionados 153 g de tartarato de sódio e potássio, 2,8 mL de

fenol aquecido a 50°C e 4,15 g de metabissulfito de sódio. Dissolveu-se todos estes reagentes e completou-se o volume para 1000 mL em balão volumétrico. Para testar o reagente de DNS foi titulado 3 mL do reagente DNS com HCl (0,1 M) utilizando indicador de fenolftaleína. Foi preparada uma solução padrão de glicose (1mg/mL) para a curva de calibração, a qual apresenta cinco diferentes concentrações de glicose obtidas a partir dos volumes pipetados na Tabela 2 (Apêndice B). Após pipetar em tubos de ensaio as soluções estes foram agitados em vortéx e colocados em banho-maria 100°C por 10 minutos, resfriou-os e adicionou-se 7,5 mL de H₂O destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Para a determinação da concentração de glicose ou xilose na amostra pipetou-se 1 mL da mesma em substituição ao padrão de glicose.

4.5.5 Determinação quantitativa de proteínas: Método de Lowry

A partir da metodologia estabelecida por Lowry et al. (1951) preparou-se os reagentes a, b, e c, o reagente a contém carbonato de sódio anidro (20g/L), hidróxido de sódio (4g/L), o reagente b solução de CuSO₄ (20 g/L) e o reagente c solução de tartarato de sódio (40g/L). Adicionou-se 1mL do reativo b e 1 mL do reativo c em 100 mL do reativo a. Posteriormente, o reativo de Folin-Ciocalteu foi diluído na proporção 1:3 e realizou-se uma solução padrão de albumina bovina (400 µg/mL). Foi realizada uma curva analítica com dez concentrações de soroalbumina bovina, as quais estão apresentadas na Tabela 3 (Apêndice C). Primeiramente foi adicionado o padrão de soroalbumina, água e a mistura reativa contendo os três reagentes. Agitou-se essa mistura em vortéx e deixou-a no escuro por 10 minutos, em sequência foi adicionado 0,500 µL do reagente de Folin. Para análise das amostras foram pipetados 1mL de solução reativa, 1mL da amostra, 1 mL do reagente de Folin, e estes foram analisados por espectrofotometria a 750 nm.

4.5.6 Teste de Blue Ágar

Visando a determinação parcial das estruturas dos biossurfactantes produzidos realizou-se o teste de *Blue-Agar* específico para a detecção de glicolipídeos extracelulares. Primeiramente as células foram cultivadas em meio semi-definido descrito por Kitamoto et al. (1990), contendo xilose ou glicose como

fontes de carbono, por 48 horas, 25°C, 150 rpm (inóculo). A seguir inoculou-se estas células em meio semi-definido descrito por Kitamoto et al., 1990 contendo xilose ou glicose adicionou-se brometo de cetil trimetil amônio ($C_{19}H_{42}BrN$) (CTAB) (0,2 g/L), azul de metileno (0,005 g/L), e ágar (12 g/L) estas concentrações foram determinadas pela metodologia estabelecida por Siegmund e Fritz (1991). Seguindo o procedimento melhorado de Gunther et al. (2005), após despejar os meios em placas de Petri foram cortados poços nestas com o auxílio da ponta aquecida de uma pipeta de 5 mL. Foram adicionados 200 µL de inóculo em cada poço. As placas foram incubadas durante 48 h a 25°C e depois armazenadas a 4°C durante 48 h. O armazenamento a frio escurece a cor azul, permitindo o reconhecimento do halo (GUNTHER et al., 2005). Os microrganismos positivos a este teste exibem um halo mais intenso que o meio, indicando a produção de glicolípídeos extracelulares, sendo o diâmetro do halo proporcional à concentração do ramnolípídeo na cultura.

4.6 ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE EM DIFERENTES CONDIÇÕES

Para avaliar a estabilidade do biossurfactante foi utilizado o sobrenadante da levedura selecionada a partir da fermentação em hidrolisado hemicelulósico destoxificado de palha de cana-de-açúcar, em distintas condições ambientais. A estabilidade do biossurfactante produzido foi avaliada em diferentes temperaturas (0°C, 4°C, 30°C, 40°C, 60°C, 80°C, 100°C), pHs (2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10, 12,0) e concentrações salinas (2%, 4%, 6%, 8%, 10% m/V). O ajuste de pH foi realizado com ácido acético 98% e hidróxido de amônio 0,1M, e a salinidade utilizando NaCl P.A. Os tubos com querosene e o sobrenadante foram agitados e obtida a emulsão de acordo com o método já descrito no item 4.3.1 e estas foram testadas quanto às diferentes condições. Ao testar o efeito da temperatura, os tubos com as emulsões foram mantidos em banho termostático por 15 minutos e deixados à temperatura ambiente para estabilização da mesma. O índice de emulsificação foi determinado após 24 horas de repouso da emulsão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DAS LEVEDURAS

Nesta pesquisa foram empregados 6 diferentes gêneros de leveduras, as quais foram isoladas de fontes distintas do continente antártico. Estas são divididas em oito espécies, *Metschnikowia australis*, *Cryptococcus adeliensis*, *Cryptococcus albidosimilis*, *Cryptococcus laurentii*, *Guehomyces pullulans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Tremella indecorata*, *Candida davisiana* como apresentado anteriormente na Tabela 8.

Com relação às características morfológicas e reprodutivas destas espécies (Figura 16), após análise microscópica pode-se inferir que *Metschnikowia australis* (L02) e as leveduras do gênero *Cryptococcus*, *C. adeliensis* (L121, L95, L108, L110), *C. albidosimilis* (L59, L94, L112) e *C. laurentii* (L59, L62, L63, L64), apresentaram reprodução por brotamento multilateral, embora esta não se encontre nitidamente visualizada na Figura 16. No entanto, quanto à morfologia estas são distintas, sendo que *M. australis* (L02) apresenta forma esferoidal, as leveduras das espécies *C. adeliensis* e *C. albidosimilis* forma ovóide e *C. laurentii* forma esférica e alongada.

As espécies de *Guehomyces pullulans* (L121, L108, L110) apresentam forma ovóide e brotamento duplo polar. Enquanto *Tremella indecorata* (L99), apresenta forma elipsoidal e presença de hifas, além do mais, nota-se que o tamanho destas células é reduzido confirmando o que foi descrito por Pippola e Kotiranta (2008). Sobre as leveduras da espécie *Candida davisiana* (L101, L107) estas apresentam forma esferoidal alongada e reprodução por brotamento.

Figura 16 - Características morfológicas das leveduras. Lâminas a fresco ampliação de 400 vezes.

Fonte: Autoria própria.

Quanto às representantes da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* (L07, L26, L34, L49a, L52, L65, L67b, L73, L69) estas apresentam forma esférica alongada, a qual é semelhante às cepas de *C. adeliensis*. As leveduras da espécie *R. mucilaginosa* apresentam formação de blastoconídeo, reprodução por brotamento multilateral. Estas são caracterizadas pela coloração das colônias alaranjada, como resultado da acumulação de pigmentos carotenóides de interesse industrial, como torularodina, toruleno e β -caroteno (LIBKIND; VAN BROOCK, 2006). A coloração alaranjada pode ser observada na Figura 17.

Figura 17 - Meio de cultivo semi-definido contendo xilose como fonte de carbono (controle) (A) e após fermentação por 72 horas pelas leveduras da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* L02 (B), L07 (C), L67 (D) L73 (E).

Fonte: Autoria própria.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Na Tabela 9 têm-se os percentuais de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, constituintes da palha, a qual foi inicialmente seca até atingir 7,91% de umidade. Estes valores podem ser comparados com os obtidos em outros estudos conforme apresentado nesta tabela.

Tabela 9 - Caracterização química da palha e bagaço de cana-de-açúcar.

Componentes da biomassa (% m/m)					
Matéria-prima	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Referências
Palha de cana	29,98	29,54	15,87	14,18	Presente estudo
Palha de cana	31,7	27,0	31,1	1,5	Hernández-Pérez (2015)
Palha de cana	33,8	27,4	21,3	6,2	Szczerbowski et al. (2014)
Palha de cana (folhas verdes)	40,84	30,79	25,80	2,56	Moutta et al. (2012)
Bagaço de cana	43,1	28,6	20,8	2,9	Arruda (2011)
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19	13-2,4	Cortez, (2010)
Palha de arroz	38,7	20,8	17,2	12,9	Hou et al. (2017)

Fonte: Adaptado de (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015)

Na Tabela 9 diferentes monocotiledôneas são comparadas quanto a sua composição estrutural, nota-se variações dentre as proporções de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas. Sendo que, a celulose e hemicelulose compõem o maior percentual constituinte da biomassa palha. Os valores obtidos neste estudo e os relatados por Hernández- Pérez (2015) também em palha de cana são similares quanto à proporção de celulose e hemicelulose. Observa-se que, quando comparados os teores de lignina e cinzas deste estudo com os valores obtidos por Hernández- Pérez (2015) e Szczerbowski et al. (2014), neste presente estudo a proporção de lignina foi mais baixa e obteve-se maior porcentagem de cinzas. Ao relacionar estes resultados com os relatados com palha apenas com folhas verdes nota-se valores distintos quanto aos teores de celulose que são 10,86 % mais altos que neste estudo, no qual foi utilizado

mistura de folhas secas, verdes e ponteiros de cana. A lignina em folhas verdes também se encontra 10% mais elevada. Convém destacar que, a composição de lignina difere entre as espécies e principalmente quanto às alterações durante a maturação da planta, quando as paredes celulares mais lignificadas são desenvolvidas (GRABBER et al., 2005).

Quanto aos teores de cinza presentes no material lignocelulósico da palha utilizada neste estudo em comparação com a caracterização desta parte da planta em outros estudos, nota-se que os teores de cinzas que compõem esta palha caracterizada são maiores que os relatados nas demais pesquisas (Tabela 9). Segundo Almeida (2008) teores elevados de cinzas na palha da cana-de-açúcar podem ser decorrentes do manuseio da palha durante a colheita e o transporte, fatores que possivelmente contribuem para a obtenção de valores divergentes de cinzas. A diferença no conteúdo de lignina e cinzas entre a palha de cana caracterizada neste estudo frente às outras proporções citadas nas demais plantas pode estar associada não só às características de cada material, similar ao caso dos teores de celulose, hemicelulose e lignina (SAKA, 2001), mas também às propriedades do solo, uso de fertilizantes, metodologias de colheita, lavagem e/ou armazenamento destas plantas (BAEZA; FREER, 2001; PIPPO et al., 2011).

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os resultados referentes aos teores de açúcares, tóxicos e saponinas presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana após hidrólise, concentração e destoxificação se encontram na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentração (g/L) de açúcares, saponinas e compostos tóxicos (ácido acético, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), furfural e fenólicos totais) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar (HHPC) original, e após etapas de concentração e de destoxificação.

	HHPC Original (g/L)	HHPC Concentrado (g/L)	HHPC Concentrado Destoxificado (g/L)
Glicose	1,40	8,20	6,76
Xilose	17,90	55,9	45,75
Arabinose	2,75	9,47	7,78
Ácido acético	1,90	3,32	3,01
5-HMF	-	0,67	0,37
Furfural	-	0,16	0,13
Fenólicos totais	-	24,91	2,14
Saponina	-	-	0,29

(-) concentrações não determinadas

Fonte: Arquivo próprio.

Após hidrólise ácida diluída para solubilização dos açúcares monossacarídeos que compõem a fração hemicelulósica da biomassa palha de cana, nota-se de acordo com a Tabela 10 que a xilose é o carboidrato que se apresenta em maior proporção (aproximadamente 70%) em relação à glicose e arabinose. Pela comparação dos resultados desta hidrólise ácida diluída com os já reportados na literatura também para palha de cana-de-açúcar, nota-se que nas mesmas condições de hidrólise maiores concentrações de açúcares foram obtidas por Hernández-Pérez (2015). Os teores destes no hidrolisado original relatado por Hernández-Pérez (2015) foram de 3,70 g/L de glicose, 18,6 g/L de xilose, 3,90 g/L de arabinose. No caso dos compostos tóxicos avaliados em HHPC concentrado, o maior teor relatado foi dos compostos fenólicos, porém, após a etapa de destoxificação a concentração deste foi menor em relação ao teor quantificado de ácido acético. Convém destacar que, a presença de ácido acético é proveniente da quebra dos grupos acetil presentes na hemicelulose. Os compostos fenólicos totais são provenientes da degradação da lignina presente no hidrolisado (ALMEIDA et al., 2007) e os

compostos 5-hidroximetilfurfural e furfural da degradação de açúcares. Quanto aos tóxicos após hidrólise, embora neste estudo apenas ácido acético foi quantificado, no trabalho de Hernández-Pérez (2015), obteve-se 0,18 g/L 0,40g/L 3,00 g/L de furfural, 5-HMF, compostos fenólicos, respectivamente. A concentração relatada no presente trabalho após destoxificação para furfural e 5-HMF foi inferior a considerada tóxica para outras leveduras (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996; KELLY et al., 2008).

Quanto à dosagem de saponinas, esta foi conduzida neste estudo, pois estas são um grupo grande e estruturalmente diversificado de produtos naturais bioativos encontrados em cerca de 500 variedades de plantas (WOJCIECHOWSKI et al., 2014). Dentre as diversas atividades que esta molécula apresenta se destaca a atividade emulsificante. No entanto, esta se encontra em baixa concentração em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana concentrado e destoxificado como observado na Tabela 10. A presença em elevadas concentrações poderia interferir na produção de biossurfactante pelas leveduras e/ou mascarar a produção destes pelos microrganismos.

5.4 CULTIVO DAS LEVEDURAS DA ANTÁRTICA EM MEIO SEMI-DEFINIDO CONTENDO GLICOSE OU XILOSE COMO FONTES DE CARBONO: ANÁLISE DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Nesta fase do estudo buscou-se avaliar em cultivos de 72 horas em meio semi-definido descrito por Kitamoto, et al. (1990) contendo glicose ou xilose como as fontes de carbono, a concentração de células viáveis, as propriedades emulsificantes e tensoativas, o consumo de açúcares e o pH. Na Tabela 11, os resultados referentes à fermentação em meio semi-definido contendo glicose como única fonte de carbono podem ser observados.

Tabela 11 - Seleção de leveduras da Antártica produtoras de biossurfactante em meio semi-definido contendo glicose.

Células	Glicose consumida (%)	Biomassa final (cels/mL)	pH final	Propriedade tensoativa	Índice de emulsificação (%)	
					(2 h)	(24 hs)
<i>Candida davisiana</i> (L101)	100 ± 1,02	6,95 x10 ⁸ ± 6,20 x10 ⁷	4,91 ± 0,05	++	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00
<i>Candida davisiana</i> (L107)	100 ± 1,43	6,68 x10 ⁸ ± 7,42 x10 ⁷	4,95 ± 0,03	++	45,52 ± 0,09	43,43 ± 0,06
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	100 ± 1,23	8,33 x10 ⁸ ± 2,95 x10 ⁸	4,17 ± 0,06	+	42,15 ± 0,06	42,15 ± 0,06
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> (L94)	100 ± 0,28	2,33 x10 ⁸ ± 1,88 x10 ⁸	6,84 ± 0,08	+++++	70,17 ± 0,02	54,54 ± 0,00
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> (L112)	100 ± 0,67	3,22 x10 ⁸ ± 4,53 x10 ⁷	4,20 ± 0,07	+	45,48 ± 0,20	41,00 ± 0,30
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95)	100 ± 0,33	1,26 x10 ⁹ ± 1,01 x10 ⁸	4,67 ± 0,04	-	35,42 ± 0,03	0,00 ± 0,00
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L108)	100 ± 1,45	3,33 x10 ⁸ ± 1,76 x10 ⁷	4,58 ± 0,06	+	46,58 ± 0,40	40,40 ± 0,10
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L110)	100 ± 1,53	1,72 x10 ⁸ ± 7,00 x10 ⁶	4,56 ± 0,08	++++	49,28 ± 0,20	49,00 ± 0,20
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L121)	100 ± 0,80	6,00 x10 ⁸ ± 1,66 x10 ⁸	6,24 ± 0,24	++	38,97 ± 0,08	38,97 ± 0,08
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L59)	100 ± 1,23	3,33 x10 ⁸ ± 1,15 x10 ⁷	5,23 ± 0,04	+	51,23 ± 0,07	43,18 ± 0,10
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L62)	100 ± 1,37	6,47 x10 ⁸ ± 7,23 x10 ⁷	4,90 ± 0,02	++++	61,67 ± 0,01	53,03 ± 0,05
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L63)	100 ± 1,04	6,92 x10 ⁸ ± 9,00 x10 ⁷	3,69 ± 0,03	+	51,00 ± 0,01	49,12 ± 0,01
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L64)	100 ± 0,36	6,85 x10 ⁸ ± 1,18 x10 ⁸	3,67 ± 0,01	++	59,00 ± 0,00	49,77 ± 0,04
<i>Guehomyces pullulans</i> (L109)	100 ± 0,56	6,82 x10 ⁸ ± 5,53 x10 ⁷	4,52 ± 0,02	++++	44,00 ± 0,07	40,80 ± 0,05
<i>Metschnikowia australis</i> (L02)	100 ± 0,25	6,20 x10 ⁸ ± 2,64 x10 ⁷	4,07 ± 0,08	+	41,10 ± 0,00	35,10 ± 0,70
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L65)	100 ± 0,35	7,70 x10 ⁸ ± 1,29 x10 ⁸	4,65 ± 0,03	++	46,40 ± 0,03	39,80 ± 0,03
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L52)	100 ± 0,88	1,09 x10 ⁹ ± 5,85 x10 ⁷	4,42 ± 0,09	-	58,33 ± 0,03	58,33 ± 0,03
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L07)	100 ± 0,82	8,52 x10 ⁸ ± 1,75 x10 ⁷	4,56 ± 0,04	+	52,94 ± 0,08	53,00 ± 0,00
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L67)	100 ± 0,65	4,57 x10 ⁸ ± 4,04 x10 ⁷	4,98 ± 0,05	+	54,96 ± 0,03	54,96 ± 0,03
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L69)	100 ± 0,38	8,17 x10 ⁸ ± 1,05 x10 ⁸	4,61 ± 0,13	-	51,67 ± 0,030	50,20 ± 0,13
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L26)	100 ± 2,27	9,87 x10 ⁸ ± 2,07 x10 ⁸	4,34 ± 0,09	+++	47,28 ± 0,20	41,40 ± 0,10
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L73)	100 ± 1,48	5,78 x10 ⁸ ± 2,75E+07	4,89 ± 0,06	+	53,88 ± 0,00	52,92 ± 0,03
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L49)	100 ± 2,27	8,70 x10 ⁸ ± 2,02 x10 ⁸	4,92 ± 0,02	+++	60,97 ± 0,05	52,20 ± 0,06
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L34)	100 ± 0,16	9,67 x10 ⁸ ± 2,45 x10 ⁸	4,33 ± 0,06	++	61,00 ± 0,01	47,73 ± 0,01
<i>Tremella indecorata</i> (L99)	100 ± 2,45	7,98 x10 ⁸ ± 1,75 x10 ⁷	4,00 ± 0,05	+	48,88 ± 0,23	47,92 ± 0,02

* pH inicial de 5,5

Nota-se na tabela 11 que as leveduras estudadas em sua totalidade produziram biossurfactantes em meio semi-definido contendo glicose. Alguns índices de emulsificação podem ser destacados por serem os mais elevados nesta fase do estudo. O índice de emulsificação máximo obtido em meio semi-definido contendo glicose ocorreu no cultivo da levedura *Cryptococcus albidosimilis* (L94) este índice foi de 70,17% após 2 horas de repouso da emulsão, o qual diminuiu para 54,54% após 24 horas de repouso (IE₂₄), não se mostrando estável. De acordo com Panilaitis et al. (2007); Abouseoud et al. (2008) os biossurfactantes de baixa massa molar são utilizados como floculantes e não suportam emulsões estáveis, contudo os biossurfactantes de elevada massa molar atuam como estabilizadores de emulsão. Desse modo, uma justificativa para a instabilidade desta emulsão e em outros resultados semelhantes relatados neste estudo pode ser devido à baixa massa molar da emulsão. Quanto à tensoatividade avaliada pelo teste de espalhamento da gota, o qual é um método semi-quantitativo, pode-se notar que a maior tensoatividade obtida também foi no cultivo de *C. albidosimilis* (L94). Desta levedura não se conhece estudo a respeito.

O sobrenadante obtido do cultivo da levedura *Cryptococcus laurentii* (L62) também merece destaque quanto ao índice de emulsificação (61,67%), pois neste sobrenadante a emulsão se manteve mais estável havendo um decréscimo de apenas 5,42% no IE₂₄ como pode ser observado na Tabela 11. Este também apresenta uma das maiores atividades tensoativas (Tabela 11) quando comparadas as relatadas em meio semi-definido contendo glicose, sendo que esta foi a segunda maior relatada em meio semi-definido contendo glicose.

Quanto ao consumo de glicose nota-se (Tabela 11) que 100% das leveduras foram capazes de consumir toda a glicose em 72 horas de cultivo. Enquanto que em relação ao crescimento celular neste tempo de cultivo, notou-se aumento da concentração celular em todas as espécies avaliadas, atingindo a concentração máxima de $1,26 \times 10^9 \pm 1,01 \times 10^8$ células/mL no cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95). No entanto, o sobrenadante deste cultivo não apresentou atividade tensoativa e o índice de emulsificação foi muito baixo (35,42%) quando comparado aos demais, e esta emulsão formada não se manteve estável após 24 horas (Tabela 11). Assim,

provavelmente o crescimento celular não está associado com a produção de biossurfactante nesta levedura em meio descrito por Kitamoto et al. (1990) contendo glicose. No entanto, a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (L52) também apresentou crescimento celular na escala de 10^9 células/mL, atingindo em 72 horas de cultivo a concentração celular de $1,09 \times 10^9 \pm 5,85 \times 10^7$ células/mL, porém, esta apresentou IE de 58,33%, o qual não sofreu alteração após 24 horas e não apresentou propriedade tensoativa. Para as demais leveduras o crescimento atingiu 10^8 células/mL não havendo muitas variações. Ainda nesta Tabela verifica-se que o pH variou de 3,67 até 6,84, sendo possível notar que mesmo em iguais condições de cultivo estas leveduras apresentam características diferentes em relação ao pH.

Na literatura há algumas pesquisas quanto à produção de biossurfactantes em meio semi-definido contendo apenas glicose como fonte de carbono. A levedura *Candida lipolytica* IA 1055 foi cultivada em glicose e seu sobrenadante apresentou uma alta atividade de emulsificação (SARUBBO et al., 2001). Segundo Amaral et al. (2006), também foi observada a produção de biossurfactante com alta atividade de emulsificação e capacidade de estabilização de emulsões óleo/água, pela levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 quando cultivada em meio contendo glicose. Estes autores assim como nesta pesquisa mostraram que não é necessária a presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de surfactantes.

Em estudos recentes realizados com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 (VARJANI; UPASSANI, 2016) foram testadas diferentes fontes de carbono para a produção de biossurfactante. Segundo estes autores o cultivo desta bactéria em meio com glicose (1%, m/v), favoreceu a produção da biomolécula, a qual apresentou índice de emulsificação de $88,50 \pm 1,96\%$. Onwosi e Odibo (2012) também observaram a variação da concentração de biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas nitroreducens* quando cultivada em distintas fontes de carbono, como glicose, sacarose, glicerol, diesel e óleo de palma, sendo a glicose considerada a fonte de carbono preferencial.

Na tabela 12 pode-se notar os resultados obtidos quanto à concentração de células viáveis, propriedade emulsificante e tensoativa, consumo de xilose e pH referentes ao cultivo das leveduras da Antártica em

meio semi-definido descrito por Kitamoto et al. (1990) contendo apenas xilose como única fonte de carbono.

Quanto ao cultivo em meio semi-definido contendo xilose observa-se distintos índices de emulsificação nas diferentes espécies de microrganismos estudadas, embora estas apresentem as mesmas condições de cultivo (Tabela 12). Comportamentos diferentes também foram observados quanto à produção de biossurfactante quando comparados com os resultados obtidos em meio semi-definido contendo glicose como única fonte de carbono. O que sugere que a produção de biossurfactante além de dependente da espécie do microrganismo também está associada à fonte de carbono. Como já descrito por Panilaitis et al. (2007); Abouseoud et al. (2008), a fonte de carbono utilizada para a produção de biossurfactantes tem demonstrado exercer grande influência tanto na composição química, quanto no tipo e quantidade de biossurfactantes a serem produzidos.

Nota-se na Tabela 12 que os maiores IE_{24} observados em meio semi-definido contendo xilose como única fonte de carbono foram obtidos a partir do cultivo das leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* (L65) e *Metschnikowia australis* (L02), os quais são $61,43 \pm 0,024\%$ e $58 \pm 0,040\%$, respectivamente. De modo geral, os índices de emulsificação em meio semi-definido contendo xilose variaram de $42 \pm 0,073\%$ (*Cryptococcus adeliensis* L108) à $61,43 \pm 0,024\%$ (*Rhodotorula mucilaginosa* L65), com exceção do cultivo em L101 no qual este foi de $25 \pm 0,226\%$ e no caso da *Rhodotorula mucilaginosa* (L69) que foi observada coalescência.

Tabela 12 - Seleção de leveduras produtoras de biossurfactante em meio de cultivo semi-definido contendo xilose.

Células	Xilose consumida (%)	Biomassa final (cels/mL)	pH final	Propriedade tensoativa	Índice de emulsificação (%)	
					(2 h)	(24 h)
<i>Candida davisiana</i> (L101)	34,94 ± 12,94	2,28 x10 ⁸ ± 1,15 x10 ⁷	5,49 ± 0,18	++	36,89 ± 0,11	25 ± 0,22
<i>Candida davisiana</i> (L107)	64,45 ± 1,85	2,82 x10 ⁸ ± 1,24 x10 ⁸	5,17 ± 0,08	-	54,90 ± 0,06	52,94 ± 0,10
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	79,44 ± 0,00	4,27 x10 ⁸ ± 6,37 x10 ⁷	4,48 ± 0,06	++	56,40 ± 0,03	51,95 ± 0,04
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> (L94)	28,44 ± 4,44	4,13 x10 ⁸ ± 3,18 x10 ⁷	5,19 ± 0,04	++	62,50 ± 0,08	56,25 ± 0,10
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> (L112)	86,37 ± 7,27	2,93 x10 ⁸ ± 1,89 x10 ⁷	4,57 ± 0,17	-	Coalescência	Coalescência
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95)	99 ± 0,00	1,63 x10 ⁹ ± 7,81 x10 ⁷	5,32 ± 0,07	+++	55,69 ± 0,02	53,94 ± 0,02
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L108)	72,02 ± 2,37	1,23 x10 ⁹ ± 1,21 x10 ⁹	5,00 ± 0,04	+	51,11 ± 0,07	42 ± 0,07
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L110)	66,60 ± 11,15	2,17 x10 ⁸ ± 8,60 x10 ⁷	6,0 ± 0,25	+++	42,67 ± 0,12	42,50 ± 0,09
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L121)	83,75 ± 6,73	3,43 x10 ⁸ ± 4,93 x10 ⁷	4,9 ± 0,14	+	43,97 ± 0,00	43,97 ± 0,00
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L59)	48,23 ± 3,49	5,22 x10 ⁸ ± 8,32 x10 ⁷	4,32 ± 0,06	++	57,54 ± 0,01	52,94 ± 0,13
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L62)	79,44 ± 0,00	3,45 x10 ⁸ ± 4,50 x10 ⁷	4,17 ± 0,05	+++	58,48 ± 0,04	48,03 ± 0,07
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L63)	68,65 ± 2,22	4,53 x10 ⁸ ± 4,61 x10 ⁷	4,20 ± 0,09	+	60,82 ± 0,06	50,00 ± 0,03
<i>Cryptococcus laurentii</i> (L64)	77,27 ± 1,27	7,18 x10 ⁸ ± 1,10 x10 ⁸	4,39 ± 0,02	++	55,86 ± 0,07	44,12 ± 0,07
<i>Guehomyces pullulans</i> (L109)	26,44 ± 2,17	3,20 x10 ⁸ ± 3,27 x10 ⁷	4,58 ± 0,08	++	54 ± 0,04	52 ± 0,016
<i>Metschnikowia australis</i> (L02)	69,25 ± 1,40	1,50 x10 ⁸ ± 1,50 x10 ⁷	4,38 ± 0,01	-	58 ± 0,04	58 ± 0,040
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L65)	70,33 ± 6,35	3,32 x10 ⁸ ± 8,83 x10 ⁷	5,27 ± 0,10	++++	63,65 ± 0,03	61,43 ± 0,02
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L52)	82,12 ± 1,19	5,82 x10 ⁸ ± 8,32 x10 ⁷	4,93 ± 0,07	+++	54,02 ± 0,06	52,06 ± 0,04
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L07)	71,95 ± 10,27	3,83 x10 ⁸ ± 4,16 x10 ⁷	5,00 ± 0,06	++	54 ± 0,11	51 ± 0,07
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L67)	75,87 ± 3,38	3,40 x10 ⁸ ± 4,58 x10 ⁷	5,17 ± 0,08	++	47 ± 0,17	44,40 ± 0,19
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L69)	52,66 ± 3,26	1,62 x10 ⁸ ± 2,30 x10 ⁷	7,06 ± 0,24	+	Coalescência	Coalescência
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L26)	55,69 ± 13,22	5,08 x10 ⁸ ± 1,72 x10 ⁹	4,59 ± 0,10	+++	45,95 ± 0,12	45,96 ± 0,12
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L73)	58,22 ± 7,18	3,97 x10 ⁸ ± 6,42 x10 ⁷	4,85 ± 0,03	++	53,18 ± 0,03	53,18 ± 0,03
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L49)	79,44 ± 0,00	6,10 x10 ⁸ ± 7,56 x10 ⁷	4,2 ± 0,09	++	49,02 ± 0,06	48,90 ± 0,04
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L34)	49,06 ± 0,99	3,00 x10 ⁸ ± 1,98 x10 ⁸	4,27 ± 0,03	+	46,27 ± 0,03	46,27 ± 0,03
<i>Tremella indecorata</i> (L99)	73,52 ± 0,61	1,33 x10 ⁹ ± 4,60 x10 ⁸	5,04 ± 0,04	++++	44,97 ± 0,04	47 ± 0,08

* pH inicial de 5,5

Quanto aos distintos valores de IE_{24} relatados nos meios de cultivo contendo as diferentes fontes de carbono, a cepa *Cryptococcus adeliensis* (L95) se destaca, pois o sobrenadante desta obtido após cultivo em meio contendo glicose não apresenta emulsão, no entanto, em xilose o IE_{24} foi de $53,94 \pm 0,020\%$ (Tabela 12). Outro exemplo no qual nota-se a influência da fonte de carbono na produção de biossurfactante é observado no cultivo da *Metschnikowia australis* (L02) que em glicose o IE_{24} foi apenas de $35,10 \pm 0,70\%$ e em xilose foi um dos mais elevados deste estudo, atingindo $58 \pm 0,040\%$. O oposto também foi notado no cultivo das leveduras *Cryptococcus albidosimilis* (L112) e *Rhodotorula mucilaginosa* (L69), as quais não apresentaram propriedade emulsificante quando cultivadas em xilose, o que não aconteceu em glicose onde o índice de emulsificação correspondeu a 42% e 55,67%, respectivamente (Tabela 11). Assim, pode-se afirmar que a fonte de carbono está associada na determinação da produção de biossurfactantes produzidos por leveduras da Antártica.

Na Figura 19 nota-se em destaque as leveduras *Cryptococcus albidosimilis* (L94), *Cryptococcus laurentii* (L62) e *Rhodotorula mucilaginosa* (L52) com os respectivos índices de emulsificação em glicose e xilose, estas se destacaram com os maiores índices de emulsificação no estudo em glicose e nesta Figura estes valores estão sendo comparados com os obtidos em meio semi-definido contendo xilose.

Ainda de acordo com a Figura 18, observa-se que o índice de emulsificação após 24 horas de repouso da emulsão (IE_{24}) obtido do cultivo de *C. albidosimilis* (L94) em meio contendo xilose foi de 56,25% o qual é próximo ao relatado em glicose. Porém, a propriedade tensoativa manteve-se baixa em relação ao cultivo das outras leveduras em meio semi-definido contendo xilose. No entanto, no cultivo de *R. mucilaginosa* (L52) diferentes índices de emulsificação foram observados nas distintas fontes de carbono estudadas. No cultivo de *C. laurentii* (L62) em meio contendo xilose nota-se ligeira diminuição no índice de emulsificação em relação ao reportado em glicose. Observando os resultados da Figura 18 apenas a levedura *C. albidosimilis* (L94) dentre as três apresentou maior índice de emulsificação em xilose. Todavia, nestas leveduras não foi observada discrepante alteração no IE nas fontes de carbono estudadas.

Figura 18 - Índices de emulsificação obtidos após 24 horas de repouso obtidos dos cultivos de L94 (A), L62 (B) e L52 (C) em meios semi-definidos contendo glicose (■) ou xilose (■) como fontes de carbono.

Fonte: Autoria própria.

Diferentes fontes de carbono para a produção de biossurfactantes também foram empregadas no cultivo da bactéria *Klebsiella* sp e foram observados diferentes índices de emulsificação em glicose e xilose sendo 70% e 50%, respectivamente. O rendimento também variou sendo de 2,75g/L em meio contendo glicose e maior em xilose atingindo 3,25 g/L (JAIN et al., 2013). Ainda há poucos estudos sobre a obtenção de biossurfactantes por leveduras utilizando como fonte de carbono os açúcares pentoses. Joshi-Navare e colaboradores (2014) relataram a produção de um xilolipídio por *Pichia caribbica* quando cultivada em meio sintético contendo 100 g/L de xilose, com um rendimento de aproximadamente 7,5%. Jain e colaboradores (2013)

avaliaram o potencial de produção de biossurfactante por *Klebsiella sp.* RJ-03 em xilose e glicose, sendo que, os índices de emulsificação foram de 60% e 70%, respectivamente. Neste presente estudo foram relatados valores próximos a estes obtidos em meio sintético contendo xilose, porém, deve-se salientar que os índices de emulsificação não foram obtidos em condições de cultivo otimizadas, sendo que após este processo estes valores podem aumentar.

Nas Tabelas 11 e 12 as leveduras e os respectivos resultados estão agrupados por gêneros, pode-se perceber que mesmo leveduras do mesmo gênero e até mesma espécie apresentam valores diferentes quanto ao consumo de xilose e índice de emulsificação. As leveduras do gênero *Candida* (*C. davisiana* (L101), *C. davisiana* (L107), *C. guilliermondii*) apresentaram valores distintos de índice de emulsificação em xilose, como por exemplo, *C. davisiana* (L101) e *C. guilliermondii* 25% e 51% respectivamente, sendo também diferentes quanto a assimilação de xilose, sendo esta de $34,94 \pm 12,94\%$ (*C. davisiana* (L101)) e $79,44 \pm 0,00\%$ (*C. guilliermondii*). No entanto, em glicose estes gêneros apresentam valores semelhantes quanto ao consumo deste açúcar e índice de emulsificação. Quanto às leveduras do gênero *Cryptococcus* (*C. adeliensis* (L95), *C. adeliensis* (L121), *C. albidosimilis* (L94), *C. albidosimilis* (L112), *C. adeliensis* (L108), *C. adeliensis* (L110), *C. laurentii* (L59), *C. laurentii* (L62), *C. laurentii* (L63), *C. laurentii* (L64)) tanto em xilose quanto glicose os resultados foram discrepantes quanto ao índice de emulsificação. Observa-se que o sobrenadante resultante do cultivo em meio semi-definido contendo xilose da levedura *C. albidosimilis* (L112) não emulsionou enquanto em *C. albidosimilis* (L94) mesmo sendo da mesma espécie, porém isolada de outra região da Ántartica, em meio contendo xilose apresentou o maior índice de emulsificação deste gênero (56,25%). Outro gênero estudado foi *Rhodotorula*, todas as leveduras deste gênero são da mesma espécie *Rhodotorula mucilaginosa*. Embora, estas sejam da mesma espécie, resultados discrepantes foram relatados, como 61,43% de emulsificação no sobrenadante de *R. mucilaginosa* (L65) obtido do cultivo em xilose e coalescência em *Rhodotorula mucilaginosa* (L69) nas mesmas condições de cultivo.

Faria, et al. (2014) estudaram a capacidade de assimilação de xilose e glicose por leveduras do mesmo gênero (*Pseudozyma*) para a produção de manosileritritol. Assim, como no presente estudo estes autores também relataram que em distintas fontes de carbono ocorreu comportamento diferente quanto à produção de biossurfactantes, e ainda que estas fossem do mesmo gênero apresentaram comportamento distinto quando cultivadas na mesma fonte de carbono.

Em relação ao consumo de xilose (Tabela 12), este variou de $26,44 \pm 2,17\%$ a $99,9 \pm 0,00\%$. O fato destes microrganismos serem isolados de distintas regiões da Antártica possivelmente altera o metabolismo destes, por isso nota-se uma variedade de comportamentos. Observa-se na Tabela 12 que todas as leveduras conseguiram assimilar a xilose. Os menores consumos deste açúcar relatados neste estudo ocorreram no cultivo de *Guehomyces pullulans* (L109) ($10,57 \pm 0,871$ g/L) ($26,44 \pm 2,17\%$), *C. albidosimilis* (L94) ($28,44 \pm 4,44\%$) e *Candida davisiana* (101) ($34,94 \pm 12,94\%$). Todavia, embora estes tenham sido baixos, os IE₂₄ obtidos dos sobrenadantes de *G. pullulans* (L109) ($52 \pm 0,016\%$) e *C. albidosimilis* (L94) ($56,25 \pm 0,103\%$) estão dentre os maiores IE₂₄ relatados neste estudo. Já o IE₂₄ do sobrenadante do cultivo de *C. davisiana* (L101) ($25 \pm 0,22\%$) foi o mais baixo obtido em meio semi-definido contendo xilose. De um modo geral, a maioria das leveduras assimilou mais de 50% de xilose, porém a minoria atinge pelo menos 80% de consumo.

As leveduras *Cryptococcus albidosimilis* (L94), *Cryptococcus laurentii* (L62) e *Rhodotorula mucilaginosa* (L52) que apresentaram maiores IE₂₄ em meio semi-definido contendo glicose (Figura 19) foram relacionadas na Figura 20 quanto ao consumo de açúcares, nas fontes de carbono estudadas.

Ainda de acordo com a Figura 20 observa-se que, na fermentação de *R. mucilaginosa* (L52) e *Cryptococcus laurentii* (L62) em meio semi-definido contendo xilose o consumo deste também foi elevado quando comparado aos resultados obtidos neste estudo (acima de 80%). No entanto, o consumo de xilose por *Cryptococcus albidosimilis* (L94) foi de apenas $28,44 \pm 4,44\%$. Embora as leveduras não tenham consumido totalmente a xilose estas apresentaram altos IE₂₄ como mostrado anteriormente na Figura 19.

Figura 19 - Assimilação de glicose (■) e xilose (□) durante os cultivos de L94 (A), L62 (B) e L52 (C) nos meios semi-definidos contendo glicose ou xilose como fontes de carbono.

Fonte: Autoria própria.

Quanto ao crescimento celular em meio semi-definido contendo xilose (Tabela 12) como única fonte de carbono este variou de $1,50 \times 10^8 \pm 1,50 \times 10^7$ células/mL (*Metschnikowia australis* (L02)) á $1,63 \times 10^9 \pm 7,81 \times 10^7$ células/mL (*Cryptococcus adeliensis* (L95)), embora L02 tenha apresentado crescimento celular inferior a L95 o sobrenadante de L02 apresentou maior IE₂₄ ($58 \pm 0,040\%$). Os pHs dos sobrenadantes obtidos do cultivo em meio semi-definido contendo xilose apresentaram variação de $4,17 \pm 0,050$ á $7,06 \pm 0,245$.

Diante dos resultados foi possível selecionar dentre as 24 leveduras três das quais, *Cryptococcus adeliensis* (L95), *Cryptococcus laurentii* (L62) e *Rhodotorula mucilaginosa* (L52) se destacaram em função dos índices de

emulsificação obtidos acima de 40% e consumo de xilose superior ou igual a 80%.

Dentre as leveduras selecionadas *Cryptococcus adeliensis* (L95) e *Cryptococcus laurentii* (L62) são xilanolíticas e já foram estudadas para a produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (APOLINÁRIO, 2014; NASCIMENTO, 2015). A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (L52) foi relatada apenas em estudo realizado por Chaud (2014) por apresentar atividade proteolítica de 25 U/mL em 72 horas de cultivo, porém em meio sintético de cultivo contendo glicose como fonte de carbono. Sendo a presente pesquisa a primeira a relatar o cultivo desta em hidrolisado hemicelulósico. Todavia, ainda em cultivo em meio sintético contendo glicose as leveduras *R. mucilaginosa* (L69) e *R. mucilaginosa* (L104) também isoladas do continente Antártico produziram biossurfactante com índices de emulsificação de 98% e 94%, respectivamente (SOUZA, 2016).

5.5 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE BISSURFACTANTE EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

As três leveduras selecionadas para cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha (HHPC) foram cultivadas por 96 horas. Foram avaliadas células viáveis, propriedade emulsificante e tensoativa, consumo de xilose e pH no intervalo de 24 horas de fermentação como pode ser observado nas Tabelas 13 e 14.

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (L52) embora tenha apresentado elevada assimilação de xilose ($82,12 \pm 1,19\%$) e crescimento celular ($5,82 \times 10^8 \pm 8,32 \times 10^7$ células/mL) em meio semi-definido, não cresceu em HHPC. Isto possivelmente ocorreu devido a intolerância desta levedura a baixas concentrações de tóxicos presentes no HHPC. No entanto, as outras duas selecionadas *Cryptococcus laurentii* (L62) e *Cryptococcus adeliensis* (L95) apresentaram crescimento celular e consumo de xilose em HHPC.

Como pode ser observado na Tabela 13, o sobrenadante obtido do cultivo da levedura *Cryptococcus laurentii* (L62) em HHPC foi capaz de emulsionar apenas com 96 horas de cultivo e apresentou baixa propriedade tensoativa. Na figura 20, está representada a coalescência obtida em um destes sobrenadantes e emulsão formada pelo sobrenadante de 96 horas de

cultivo. Esta levedura consumiu no hidrolisado 28,05 g/L de xilose (70,12%) em 96 horas de cultivo (Tabela 13). Esta em meio semi-definido consumiu 80% de xilose e IE₂₄ de 48,03% em 72 horas de fermentação, observando-se ainda que a resposta foi positiva quanto a tensoatividade (Tabela 12). Em 48 horas de cultivo esta levedura consumiu apenas $4,33 \pm 0,854$ g/L de xilose em HHPC (Tabela 13). Todavia, esta mesma levedura quando cultivada em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (HHBC) consumiu 8,17 g/L, correspondendo a 94,45% em 48 horas de cultivo em hidrolisado diluído (NASCIMENTO, 2015). A concentração de tóxicos no HHPC concentrado é maior do que em HHBC, estes possivelmente afetaram o consumo de xilose.

Quanto ao crescimento celular da levedura *Cryptococcus laurentii* (L62) em hidrolisado este atingiu a concentração máxima de $1,05 \times 10^9 \pm 2,24 \times 10^8$ células/mL em 96 horas de fermentação (Tabela 13). Em 48 horas de cultivo a concentração celular foi de $4,67 \times 10^8 \pm 2,32 \times 10^8$ células/mL, esta foi superior ao obtido em cultivo em hidrolisado de bagaço (NASCIMENTO, 2015). Com relação ao pH este não sofreu grandes alterações no decorrer da fermentação, variando de 4,94 a 5,26 (Tabela 13). No cultivo desta levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço esta variou de 4,97 a 7,14 (NASCIMENTO, 2015).

O sobrenadante da levedura *C. adeliensis* (L95) emulsionou a partir de 48 horas de cultivo, e o IE₂₄ máximo foi de $56,25 \pm 0,00\%$ em 96 horas de cultivo (Tabela 14), o que correspondeu a um aumento de aproximadamente 4% em relação ao resultado obtido em 72 horas de cultivo. Na figura 21 pode-se observar a formação da emulsão durante a fermentação no intervalo de 24 horas de cultivo.

Em relação à propriedade tensoativa do sobrenadante do cultivo de *C. adeliensis* (L95) na Figura 22 fica evidenciado a positividade do teste quanto a esta propriedade. No entanto, estes sobrenadantes obtidos do cultivo de *C. adeliensis* (L95) em HHPC foram testados em tensiômetro pelo método da gota pendente e neste não foi observada redução da tensoatividade da água.

Tabela 13 - Resultados de concentração de biomassa, consumo de xilose, pH e propriedades surfactantes obtidos a partir do cultivo de *Cryptococcus laurentii* (L62) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana até 96 horas de cultivo.

	Biomassa final (cels/mL)	Consumo de xilose (%)	pH final	Tensoatividade	Índice de emulsificação (%)	
					(2h)	(24h)
24 horas	$3,43 \times 10^6 \pm 6,02 \times 10^5$	$7,90 \pm 2,74$	$4,94 \pm 0,03$	+++	Coalescência	Coalescência
48 horas	$4,67 \times 10^8 \pm 2,32 \times 10^8$	$10,83 \pm 0,85$	$5,26 \pm 0,08$	+++	Coalescência	Coalescência
72 horas	$7,78 \times 10^8 \pm 7,52 \times 10^7$	$36,87 \pm 0,35$	$5,31 \pm 0,10$	+	Coalescência	Coalescência
96 horas	$1,05 \times 10^9 \pm 2,24 \times 10^8$	$70,12 \pm 0,60$	$5,26 \pm 0,08$	+	43%	Coalescência

*pH inicial de 5,5

Fonte: Autoria própria.

Tabela 14 - Resultados de concentração de biomassa, consumo de xilose, pH e propriedades surfactantes obtidos a partir do cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha até 96 horas de cultivo.

	Biomassa final (cels/mL)	Consumo de xilose (%)	pH final	Tensoatividade	Índice de emulsificação (%)	
					(2h)	(24h)
24 horas	$4,56 \times 10^6 \pm 2,62 \times 10^5$	$14,80 \pm 0,89$	$4,96 \pm 0,03$	+++	$41,67 \pm 0,13$	Coalescência
48 horas	$5,03 \times 10^8 \pm 3,08 \times 10^8$	$64,50 \pm 2,35$	$5,54 \pm 0,01$	++++	$56,41 \pm 0,08$	$47,92 \pm 0,09$
72 horas	$1,05 \times 10^9 \pm 5,67 \times 10^7$	$93,65 \pm 0,07$	$5,53 \pm 0,01$	+++++	$60,42 \pm 0,03$	$52 \pm 0,03$
96 horas	$2,45 \times 10^9 \pm 1,13 \times 10^8$	$94,27 \pm 0,28$	$5,79 \pm 0,02$	++++	$56,25 \pm 0,06$	$56,25 \pm 0,00$

*pH inicial de 5,5

Figura 20 - Teste para determinação do índice de emulsificação do sobrenadante obtido do cultivo de *Cryptococcus laurentii* (L62) em 48 (A) e em 96 (B) horas de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Teste para determinação de índice de emulsificação após 24 horas de repouso em hidrolisado hemicelulósico de palha (A) e nos sobrenadantes obtidos do cultivo de L95 em hidrolisado hemicelulósico de palha em 24 (B), 48 (C), 72 (D), 96 (E) horas de cultivo.

Fonte: Autoria própria.

Ainda sobre a propriedade tensoativa, resultados semelhantes aos relatados neste estudo foram obtidos do cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por Marcelino, (2016). Segundo este autor antes da otimização dos fatores nutricionais do meio de cultivo o índice de emulsão em querosene relatado foi 65 % e tensoatividade próxima da água. Porém, após

otimização das concentrações de fatores nutricionais obteve-se IE_{24} de 86 – 90 % e TS de 34 mN/m. Deste modo, uma alternativa para se obter IE_{24} mais elevados e sobrenadante com propriedade tensoativa seria a otimização das condições de cultivo.

Figura 22 - Teste de espalhamento da gota nos sobrenadantes obtidos do cultivo da levedura L95 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana em 24 horas de cultivo (A), 48 horas (B), 72 horas (C), 96 horas (D).

Fonte: Autoria própria.

Verifica-se na Tabela 14 que quanto ao consumo de xilose em HHPC, a levedura *Cryptococcus adeliensis* (L95) apresentou maior consumo de xilose dentre as leveduras estudadas. Este consumo foi de 37,46 g/L (93,65 %) após 72 horas de cultivo, sendo que em 96 horas este permaneceu constante (94,27 %). Enquanto, em meio semi-definido o consumo de xilose foi superior em 72 horas de cultivo (99%) (Tabela 12). O valor de consumo de xilose obtido em 48 horas de cultivo de *C. adeliensis* (L95) em HHPC (Tabela 14) foi aproximadamente 38% superior ao consumo de xilose da mesma levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em 48 horas (11,99 g/L, que corresponde a 28,95%) (NASCIMENTO, 2015). Analisando os resultados referentes aos cultivos de *C. adeliensis* (L95) em HHPC e em meio semi-definido contendo xilose ou glicose (Figura 23), nota-se que, os resultados referentes ao consumo de xilose e

IE₂₄ em meio semi-definido contendo xilose e o HHPC foram similares. Todavia, embora a glicose tenha sido totalmente consumida os melhores resultados quanto ao índice de emulsificação foram obtidos em meio semi-definido contendo xilose (53,94% de IE₂₄) e em HHPC (52% de IE₂₄), uma vez que em meio contendo glicose o emulsificante produzido era instável. De acordo com estes resultados pode-se afirmar que dentre as fontes de carbono estudadas nesta pesquisa o HHPC é a mais adequada para a produção de biossurfactantes a partir da levedura *C. adeliensis* (L95), pois nesta fonte de carbono notou-se índice de emulsificação tão elevado quanto em meio semi-definido contendo xilose e além do mais, esta se trata de uma fonte biossustentável, contribuindo para biossíntese de um bioproduto ecologicamente correto.

Figura 23 - Consumo de açúcares (%) (■) e IE₂₄ (%) (■) obtidos em função do meio de cultivo empregado em 72 horas de cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95).

Fonte: Autoria própria.

Quanto aos resultados obtidos referentes ao crescimento celular em HHPC, a maior concentração celular obtida foi de $9,38 \pm 0,08$ log.células/mL em 96 horas de cultivo (Tabela 14). Segundo Desai, Desai, A. (1993) a produção de determinado biossurfactante pode estar ou não associada ao crescimento celular. Na Tabela 15 com os dados obtidos de biomassa celular não foi possível determinar no período de cultivo de 96 horas, no qual obteve-se maior índice de

emulsificação, a fase de crescimento que a levedura se encontra. Segundo, Desai e Banat (1997) a produção do emulsificante pode ocorrer durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo ou sob condições de limitação de crescimento (fase estacionária).

Quanto ao pH do sobrenadante do meio de fermentação de *Cryptococcus adeliensis* (L95) em HHPC, este não sofreu grande alteração durante a fermentação, manteve-se bem próximo estando entre 4,96 e 5,79 (Tabela 14). Em cultivo desta levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço (NASCIMENTO, 2015), comportamento distinto foi observado, o pH variou de 5,18 a 6,26.

Tabela 15 - Crescimento celular da levedura *Cryptococcus adeliensis* (L95) e índice de emulsificação (IE₂₄) (%) em cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Tempo (h)	Biomassa (cels/mL)	Emulsificação (IE ₂₄) (%)
0	$2,12 \times 10^6 \pm 1,78 \times 10^5$	0%
24	$4,56 \times 10^6 \pm 2,62 \times 10^5$	Coalescência
48	$5,03 \times 10^8 \pm 3,08 \times 10^8$	$47,92 \pm 0,090$
72	$1,05 \times 10^9 \pm 5,67 \times 10^7$	$52 \pm 0,036$
96	$2,45 \times 10^9 \pm 1,13 \times 10^8$	$56,25 \pm 0,00$

Fonte: Autoria própria.

De acordo com Rivera et al. (2007) na ausência de glicose, a rota biossintética pode ser alterada de homo para a via heterofermentativa (via da fosfocetolase). Assim, além de biossurfactante são produzidos ácido acético e ácido láctico. Porém, na presente pesquisa não foi observada a coprodução destes concomitante com o biossurfactante no cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95).

As leveduras da Antártica suportam baixas concentrações de tóxico e até assimilam estes não havendo pesquisas destas em hidrolisado hemicelulósico não destoxificado (NASCIMENTO, 2015). Em estudo realizado por Marcelino, 2016 sobre a produção de biossurfactante em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar notou-se que os sobrenadantes de muitas leveduras apresentaram elevados índices de emulsificação em hidrolisado não destoxificado, sendo que a levedura SSS11 (*Trichosporon mucoides* CLM 42.4) apresentou o maior IE₂₄ ($59,6 \pm 4,7\%$) nesta condição. No entanto, esta mesma

levedura apresentou IE_{24} de $70 \pm 1,3\%$ em hidrolisado hemicelulósico destoxificado. Deve-se pesquisar futuramente o potencial destas leveduras da Antártica em resistir a altas concentrações de tóxicos e produzir biossurfactantes em hidrolisados hemicelulósicos não destoxificados.

5.6 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO BIOSSURFACTANTE

5.6.1 Produção de glicolípídeo extracelular: Teste Blue Ágar

Na presente pesquisa o teste de Blue Ágar foi realizado para identificação da biomolécula produzida a partir da formação de halo azul. O CTAB utilizado no teste é um surfactante catiônico que reage com ramnolípídeos (biossurfactante aniônico) (CHANDANKERE et al., 2013). Este complexo (CTAB - ramnolípídeo - azul de metileno) pode ser visualizado pela presença de halo azul escuro em torno do crescimento da colônia nas placas de Agar (Figura 26). Assim como pode ser visualizado na Figura 24, nos meios de cultivo contendo glicose (A) ou xilose (B) o teste foi positivo quanto à produção de glicolípídeo extracelular por apresentar discreto halo azul em volta da colônia de *Cryptococcus adeliensis* (L95).

Figura 24 - Determinação da produção de glicolípídios extracelulares por *Cryptococcus adeliensis* (L95): formação de discreto halo azul em meios semi-definidos contendo glicose (A) ou xilose (B) como únicas fontes de carbono.

Fonte: Autoria própria.

5.6.2 Extração do biossurfactante

Para a caracterização parcial da biomolécula optou-se pelo cultivo em 72 horas uma vez que o índice de emulsificação não obteve aumento em 96 horas de cultivo que justificasse o cultivo por mais 24 horas.

O estudo da condição adequada de extração da molécula de biossurfactante produzido foi conduzido com o objetivo de se obter a molécula para a caracterização bioquímica. Para tanto, foram testadas três diferentes misturas de solventes em diferentes proporções, desse modo a partir da composição que mais se assemelhou a polaridade do biossurfactante este pôde ser extraído. As misturas de solventes são utilizadas para facilitar o ajustamento da polaridade entre o solvente ou agente de extração e o biossurfactante a ser extraído (FONTES et al., 2012). Os solventes testados e as proporções utilizadas foram as seguintes: clorofórmio/metanol (4:1), clorofórmio/metanol (2:1), hexano/acetato de etila (7:3) e acetato de etila. Estes foram selecionados baseados nas distintas polaridades e por serem os mais usuais em extração de biossurfactantes. Na figura 25 tem-se a extração com a mistura de clorofórmio/metanol (4:1). Nesta pode-se observar as duas fases formadas no funil de separação (A), sendo que a fase aquosa se encontra na parte superior, e a fase orgânica com os solventes na parte inferior, em (B) observa-se o extrato bruto ainda misturado aos solventes.

Na Figura 26 têm-se os rendimentos (g/L) dos extratos brutos obtidos de cada um dos métodos de extração estudados. Nesta nota-se que o maior rendimento do extrato bruto (4,27g/L) foi obtido em clorofórmio/metanol (4:1). Este resultado poderia ser atribuído ao equilíbrio hidrofóbico/hidrofílico do sistema. No entanto, embora este seja o maior rendimento de acordo com análise da variância pelo teste de Tukey com 95% de confiança não foi possível observar diferença significativa entre os distintos rendimentos obtidos nos métodos de extração testados (Apêndice D). Na literatura foi reportado o rendimento de até 23%, $11,334 \pm 2,169$ g/L no extrato bruto, em pesquisa realizada com a levedura *T. mucoides* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço em condições de cultivo não otimizadas (MARCELINO, 2016). Este valor é superior aos relatados na presente pesquisa com as misturas de solventes testadas como se pode observar na Figura 28.

Figura 25 - Extração de biossurfactante com clorofórmio/metanol (4:1), A) fase aquosa (superior) e fase orgânica (inferior), B) fase orgânica com mistura de solventes.

Fonte: Autoria própria.

Figura 26 - Rendimentos (g/L) de biossurfactantes no extrato bruto das diferentes misturas de solvente utilizadas na extração.

Fonte: Autoria própria.

Embora não tenha sido observada diferença significativa entre as respostas das variáveis testadas (Apêndice D) apenas a proporção clorofórmio/metanol (4:1)

foi selecionada para obtenção do extrato bruto utilizado na caracterização da porção polar da biomolécula. Avaliou-se a presença de proteínas, carboidratos e de fenólicos pelos métodos espectrofotométricos já descritos anteriormente.

Como já discutido o biossurfactante produzido por *Cryptococcus adeliensis* (L95) foi caracterizado a partir do teste de *Blue Ágar* como glicolipídeo (Figura 26). No entanto, após caracterização bioquímica parcial do extrato bruto para análise qualitativa, os testes apontaram presença de açúcares redutores e proteínas. Na literatura é relatada a composição química estrutural de glicolipídeos purificados de meios de cultivo, e uma análise da composição do biossurfactante produzido por *Pseudomonas* sp. 2B revelou que este é constituído de uma mistura de lipídeo e carboidrato na proporção de 65%: 32% (m/m), respectivamente (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2012). Desse modo, os açúcares redutores detectados no extrato bruto são originados do meio de cultivo, estes em altas concentrações indicam que não foram separados do biossurfactante quando empregada a mistura de solventes clorofórmio/metanol (4:1). A presença de proteínas também é resultante de um método de extração ineficiente para o biossurfactante produzido pela levedura *C. adeliensis* (L95). Estas podem ter sido excretadas extracelularmente pela levedura ou podem ser originadas de estruturas celulares da levedura lisada.

Testes de índice de emulsificação foram realizados com o extrato bruto da extração clorofórmio/metanol (4:1) e estes não emulsionaram. O mesmo não ocorreu na pesquisa desenvolvida por Sarubbo et al. (2001), na qual o isolamento do surfactante aumentou a capacidade de emulsificação 111%.

5.7 ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE FRENTE À VARIAÇÕES DE pH, CONCENTRAÇÕES SALINAS E TEMPERATURA

Fatores ambientais como salinidade, pH e temperatura afetam a atividade do biossurfactante (ILORI et al., 2005). Sendo assim, estudou-se a estabilidade do biossurfactante frente aos diferentes fatores. Nas figuras 27 e 28 observa-se a estabilidade da emulsão em diferentes pHs. Nota-se que o maior índice de emulsificação foi no pH 8,0, próximo a neutralidade, mas mesmo em pHs baixos os valores se mantiveram constantes. Ao realizar o teste estatístico de Tukey, foi possível afirmar com 95% de confiança que não houve diferença significativa entre os diferentes índices de emulsificação obtidos nos distintos pHs testados

(Apêndice E). No entanto, sabe-se que valores acentuadamente baixos de pH podem causar alterações nas forças eletrostáticas envolvidas nas formações de emulsões, o que pode acarretar a coalescência das fases envolvidas (ANTUNES, 2007). A variação do pH no meio pode também afetar a estrutura e o tamanho das micelas formadas entre o biossurfactante e o sistema água-óleo. Knoblich et al. (1995) observaram que a variação do pH alterou o tamanho e o formato das micelas produzidas pela surfactina. De acordo com Santos et al. (2014) nos valores mais próximos à neutralidade, a micela apresenta uma estrutura globular e elipsoidal. Já em condições mais alcalinas, a estrutura passava para um formato globular e cilíndrico e com tamanho maior do que em pH mais ácidos ou neutros. Um tamanho de micela maior pode agregar uma maior quantidade material de um sistema água-óleo. No entanto, neste estudo como pode ser observado na Figura 27 em condição de alcalinidade extrema o índice de emulsificação foi o menor relatado diante dos outros pHs testados. As emulsões formadas podem ser observadas na Figura 30.

Figura 27 - Índice de emulsificação (IE24) do sobrenadante obtido do cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana por 72 horas de fermentação em diferentes pHs.

Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Emulsões obtidas a partir dos diferentes pHs testados (A) pH 2,0, (B) 4,0, (C) 6,0, (D) 8,0, (E) 10,0, (F) 12,0 do sobrenadante obtido do cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana no tempo de 72 horas de fermentação.

Fonte: Autoria própria.

Quanto à salinidade de acordo com os resultados apresentados na Figura 29 as emulsões mantiveram-se estáveis em todas as concentrações salinas testadas. Maiores concentrações de NaCl podem ser estudadas posteriormente para determinação a concentração salina a partir da qual a estabilidade da emulsão entra em colapso. Com o aumento da concentração de NaCl até 10% m/V não foi observado um efeito proporcional na força iônica no meio. De acordo com Rocha e colaboradores (2007), este resultado é interessante quando se considera o uso do biossurfactante na biorremediação em ambientes salinos, como por exemplo, na recuperação de derramamentos de petróleo em ambientes marinhos. Na literatura é reportado que concentrações salinas de 2 a 3 % são suficientes para inativar surfactantes convencionais (NITSCHKE; PASTORE, 2002). De acordo com Calderon e Poulin (1999) a concentração salina pode elevar a energia interna do sistema e, conseqüentemente, as emulsões tornam-se mais termodinamicamente instáveis. Ao realizar o teste estatístico de Tukey não foi possível notar diferença significativa nos índices de emulsificação obtidos nas diferentes concentrações salinas (Apêndice F). Na Figura 30 pode-se observar as emulsões.

Figura 29 - Índice de emulsificação do sobrenadante obtido do cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana por 72 horas de fermentação em diferentes concentrações de NaCl (%).

Fonte: Autoria própria.

Figura 30 - Emulsões obtidas a partir de diferentes concentrações salinas (A) 2%, (B) 4%, (C) 6%, (D) 8%, (E) 10% (m/V) do sobrenadante obtido do cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana no tempo de 72 horas de fermentação.

Fonte: Autoria própria.

Quanto à variação da temperatura para determinação da estabilidade da emulsão pode-se observar na Figura 31 que a partir de 40 °C o índice de

emulsificação diminuiu, tendendo a zero na temperatura de 100 °C. Segundo Kokal (2002) e Cunha (2007) o aumento da temperatura fornece energia ao sistema, tornando a emulsão ainda mais instável. Ainda de acordo com estes autores 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.

Na maioria das temperaturas testadas as emulsões formadas apresentaram coalescência como pode ser observado na Figura 32, convém ressaltar que esta é uma estrutura instável e tende a se separar em duas fases (DALTIM, 2011). Todavia, somente na temperatura de 30 °C pôde-se notar emulsão sem coalescência. Nota-se que, mesmo em baixas temperaturas 0 °C e 4 °C o índice de emulsificação não apresentou uma elevada variação quando comparado com o maior índice obtido em 30°C. Pela análise da variância (ANOVA) pelo método de Tukey, com 95% de confiança foi possível inferir que há diferença significativa nos índices de emulsificação obtidos nas distintas temperaturas testadas (Apêndice G).

Figura 31 - Índice de emulsificação do sobrenadante obtido do cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana por 72 horas de fermentação em diferentes temperaturas (°C).

Fonte: Autoria própria.

Figura 32 - Emulsões obtidas a partir de temperaturas (A) 0°C, (B) 4 °C, (C) 30 °C, (D) 60 °C, (E) 80 °C, (F) 100 °C do sobrenadante obtido do cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana no tempo de 72 horas de fermentação.

Fonte: Arquivo próprio.

Os resultados obtidos quanto a estabilidade da emulsão frente às diferentes condições ambientais foram relevantes quanto a resistência a elevadas concentrações salinas como 10% de NaCl e pH baixo (2,0), o que é interessante para aplicação industrial deste, uma vez que os biossurfactantes são usados como insumos em processos industriais. Ilori et al. (2005) avaliaram a estabilidade do biossurfactante produzido por *Aeromonas* sp., e verificou que este apresentava melhor atividade surfactante na concentração de 5 % (m/v) de NaCl, pH de 8,0 e temperatura de 40°C, e permaneceu com 77 % de sua atividade após exposição por 120 min a 100°C. Embora neste estudo o biossurfactante não tenha sido resistente a elevadas temperaturas a resistência quanto à salinidade e variações de pH torna este resultado muito promissor.

6 CONCLUSÕES

A partir do estudo do aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de biossurfactante a partir de leveduras isoladas da Antártica pôde-se inferir que:

- As leveduras do continente Antártico produziram biossurfactante em meio de cultivo semi-definido contendo glicose ou xilose como fontes de carbono em 72 horas de cultivo.
- A biomassa palha de cana-de-açúcar pode ser destinada para à obtenção de biossurfactantes a partir de leveduras da Antártica.
- O biossurfactante produzido por *Cryptococcus adeliensis* (L95) foi caracterizado como glicolipídeo a partir do método de *Blue Agar*.
- O método de extração testado não foi o mais seletivo para a purificação dos biossurfactantes.
- Dentre os parâmetros ambientais testados para avaliação da estabilidade da emulsão, após análise estatística pôde-se inferir que apenas a temperatura é um parâmetro determinante para a estabilidade da emulsão. As emulsões mantiveram-se estáveis em condições extremas de elevada concentração salina, pH e temperaturas baixos. Sendo que, estes resultados são interessantes uma vez que consagram o potencial da aplicação desta biomolécula na biorremediação, dentre outras aplicações industriais em que estes são utilizados em condições ambientais extremas.

Deste modo, pode-se inferir que o aproveitamento da biomassa palha de cana-de-açúcar para a produção de biossurfactante é um destino promissor para este subproduto da indústria sucroalcooleira. Vale destacar que, as características singulares que as leveduras da Antártica apresentam trazem ao biossurfactante produzido por *Cryptococcus adeliensis* (L95) notáveis particularidades que são consideráveis quanto à estabilidade.

7 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

Este trabalho apresenta uma gama de possibilidades a serem exploradas em estudos futuros:

- Otimizar as condições de cultivo com objetivo de obter maior rendimento na produção de biossurfactante.
- Realizar o cultivo de *Cryptococcus adeliensis* (L95) em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar não destoxificado e determinar se as propriedades tensoativa e emulsificante apresentaram alteração. A produção de biossurfactante nesta condição seria relevante, uma vez que uma etapa do processo poderia ser eliminada.
- Utilizar fontes de nutriente de custos mais baixos, como por exemplo, farelo de arroz e de soja como fontes de nitrogênio.
- Adicionar ao meio de cultivo óleos residuais dos mais diversos segmentos industriais, o que já foi reportado na literatura por apresentar efeito positivo no aumento da produção de biossurfactante.
- Testar outros métodos de extração mais eficientes para esta biomolécula, os quais devem apresentar polaridades distintas dos já testados para que assim possam ser mais seletivos e aumentar o rendimento do bioproduto.
- Testar concentrações salinas mais elevadas para determinar a concentração salina a partir da qual a emulsão perde a estabilidade.

REFERÊNCIAS

- ABALOS, A. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v.17, p.1367–1371, 2001.
- ABOUSEOUD M. et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v.223, p.143–151, 2008.
- 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.
- ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. Initial steps of sophoroselipid biosynthesis by *Candida bombicola* atcc 22214 grown on glucose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.46, p.67-73, 1996.
- ALMEIDA, J. R. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340–349, 2007.
- ALMEIDA, M. B. B. **Bio-óleo a partir da pirólise rápida, térmica ou catalítica, da palha da cana-de-açúcar e seu co-processamento com gasóleo em craqueamento catalítico. 2008. 149p.** Dissertação, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- AMARAL, P. F. F. et al. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochem.**, v.41, p.1894-1898, 2006.
- AMARAL, P. F. F. et al. Biosurfactants from yeasts: characteristics production and application. In: RAMKRISHNA, S. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York, Springer, 2010. p.236-249.
- 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.
- APARNA, A.; SRINIKETHAN G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B. **Colloids Surf B Biointerfaces**. v.15, p.23-29,2012.
- APOLINARIO, M. D. F. **Avaliação do cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar de leveduras xilanolíticas isoladas da Antártica. 2014. 81p.** Dissertação, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

ARRUDA, P. V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 163p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

ASENCIO, G. et al. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria, **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p.1–5, 2014.

BAEZA, J.; FREER, J. Chemical characterization of wood and its components. In: HON, D.N.S.; SHIRAISHI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**. New York: Marcel Dekker Inc., 2001. p. 367.

BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential, Mini-Review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.

BARTH, G.; GAILLARD, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, **Fems microbiol. rev.** v.19, p.219, 1997.

BATRAKOV, S. G. et al. Glycolipids of the filamentous fungus *Absidia corymbifera* F-295. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.123, p.157-164, 2003.

BATRAKOV, S. G. et al., Lipids of the zygomycete *Absidia corymbifera* F-965. *Phytochemistry*, v.65, 1239-1246, 2004.

BEDNARSKI, W. et al. Application of oil refinery waste in biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technol.**, v.95, p.15–18, 2004.

BIASI, C. et al. Temperature-dependent shift from labile to recalcitrant carbon sources of arctic heterotrophs. **Rapid Commun. Mass Sp.**, v.19, p.1401–1408, 2005.

BINOD, P. et al., Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767–74, 2010.

BODOUR, A.. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hidrocarbons. **Colloids and Surfaces**, n. 152, p. 41-52, 1999.

BOSCH, M. P., et al., Surface active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfactants Detergentes**, v.25, n. 4, p. 208-211, 1998.

BRATCHKOVA, A.; IVANOVA, V. Bioactive metabolites produced by microorganisms collected in Antarctica and the Arctic. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.25, p.1-7, 2011.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO D'ARCE, M. A. B. Método de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, 2009.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.***: estudos de produção e caracterização. 82p. 2009. Dissertação (Mestre em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

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.

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**., v. 214, p.1-9, 2014.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R .S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.7, p.262–266, 2004.

CANDIDO, R. G.; GONCALVES, A. R. Synthesis of cellulose acetate and carboxymethylcellulose from sugarcane straw, **Carbohydrate Polymers**, v.152 p.679–686, 2016.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 333–6, 2008.

CANILHA, L. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 84–92, 2010.

CAVICCHIOLI, R. Cold adapted Archaea. **Nat Rev Microbiol.**, v.4, p.331–343, 2006.

CHANDANKERE, R. et al. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTB a isolated from petroleum reservoir. **Biochem. Eng. J.**, 74, p.46–53, 2013.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioconversion of bioethanol. **Biofuel production-recent developments and prospects. InTech**, p. 225–246, 2011.

CHATTOPADHYAY, M. K. et al. Thermolabile alkaline phosphatase from *Sphingobacterium antarcticus*, a psychrotrophic bacterium from Antarctica. **Polar Biol.**, v.15, p.215-219, 1995.

CHAUD, L. C. S. et al. Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **New Biotechnology**, v.33 p.807–814, 2016.

CHAUD, L. C. S. **Estabelecimento de condições de cultivo de leveduras isoladas da Antártica visando à produção de proteases**. 2014. 124 p. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L. K. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under de nitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates, **Biotechnology Bioengineering**, v.72, p.25-33, 2001.

CHEN, S.Y.; WEI, Y.H.; CHANG J.S. Repeted pH- stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Applied Microbiol. Biotechnology**, v.76, p.67-74, 2007.

CHENG K., et al., Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochem Eng J**, v.38, p.105–109, 2008.

CIRIGLIANO, M. C.; G. M. CARMAN. 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.50, p.846–850, 1985.

COCKELL, C. S.; BLAUSTEIN, A. **Ecosystems, evolution and UV radiation**. New York, Springer, 2001.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v.13, p.85-103, 2003.

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

COSTA, S. G. V. A. O. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 rhamnolipids following growth on Brazilian native oils, **Process Biochemistry**, v.41, p.483-488, 2006.

COOPER, D. G. et al. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408-412, 1981.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Appl Environ Microbiol.** v.1, p.4–10, 1979.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F. Production of surface active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.37, p.4–10, 1978.

COWAN, D. A.; TOW, L. A. Endangered Antarctic environments **Annu. Rev. Microbiol**, v.58, p.649-690, 2004.

CROWE, J. H. et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochem J**, v.242, p.1–10, 1987.

CRUZ, J. M. et al. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. **Food Biotechnol**, v.14, p.79– 97, 2000.

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

DALANHOL, K. C. F. **Avaliação do desempenho das leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã**. 2014. 71 p. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

DALTIN, D, **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Editora Blucher, 1ª Ed, 2011.

DANIEL H. J. et al. Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.51, p.40–45, 1999.

DAVILA, A. M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.47, p.496–501, 1997.

DES, M. D. J. The biogeochemistry of hypersaline microbial mats. **Adv Microb Ecol**, v.14, p.251–274, 1995.

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

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of Biosurfactants. In: KOSARIC, N. **Biosurfactants: Production, proprieters, applications**, New York: Mercel Decker, 1993. p.65-97.

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.

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresour Technol**, v.54 p.143-50, 1995.

DÉZIEL, E. et al. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57 RP grown on manitol or naphthalene. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1440, p.244–252, 1999.

DIMITROVA S. et al. Production of metabolites with antioxidant and emulsifying properties by antarctic strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.1, p.301-311, 2013.

DIMITROVA, S. et al. Synthesis of coenzyme Q10 and beta-carotene by yeasts isolated from antarctic soil and lichen in response to ultraviolet and visible radiations, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, p.795-804, 2010.

DOS SANTOS, S. C. **Prospecção de linhagens bacterianas produtoras de biossurfactantes com potencial biotecnológico no semi-árido baiano**, p.69, 2008. (Dissertação), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2008.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. **Indian J. Biotechnol**, v.3, p.74–81, 2004.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal Microbiol. Biotechnol**, v.17, p.61–69, 2001.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, **Anal. Chem.**, v.28, p.350-356, 1956.

FARIA, N. T. et al. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, from pentoses and D-glucose/D-xylose mixtures by *Pseudozyma* yeast strains. **Process Biochemistry**, v.49, p.170-1799, 2014.

FATTOM, A.; SHILO, M. Production of emulcyan by *Phormidium* J-1: its activity and function. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.31, p.3–9, 1985.

FELIPE, M. G. et al. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, p. 171–177, 1995.

FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nat Rev Microbiol.**, v.1, p.200–208, 2003.

FERRAZ, A. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by drift spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 201–212, 2000.

FERRAZ, C. et al. The influence of vegetable oils on biosurfactant production by *Serratia marcescens*. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 98, p.841–847, 2002.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends Biotechnology**, v.10 p. 208-217, 1992.

MARIANI, L. F., Utilização da palha de cana-de-açúcar para aumento da capacidade energética de plantas de utilidades, 2006. Disponível em: <http://biton.uspnet.usp.br/pme/wp-content/uploads/2014/03/Art_TCC_027_2006.pdf> Acesso em: 2 Fev. 2016.

FONTES, G. C.; AMARAL P. F. F. E.; COELHO, M, A, Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, 31:8, 2091-2099, 2008.

FONTES, G. C. et al. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p.483 - 493, 2012.

FORTES, C. **Produtividade de cana-de-açúcar em função da adubação nitrogenada e da decomposição da palhada em ciclos consecutivos**, 2010. 147p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2010.

FRANCY, D. S. et al. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v.8 p.237-246, 1991.

FUKUOKA, T. et al. Structural characterization and surface-active properties of a new glycolipid biosurfactant, mono-acylated mannosylerythritol lipids, produced from glucose by *Pseudozyma Antarctica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, p.801-810, 2007a.

FUKUOKA, T. et al. Characterization of new glycolipid biosurfactants, tri-acylatedmannosylerythritol lipids, produced by *Pseudozyma* yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 29, p.1111-1118. 2007b.

GARCIA, A. K., **Avaliação da atividade lipolítica dos fungos filamentosos da costa brasileira**, 2011. 56p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo - Instituto Butantan, 2011.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: a review. **J Oleo Sci.**, v.3, p.155–166, 2006.

GEORGIU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Nature Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GESHEVA, V.; STACKEBRANDT, E.; VASILEVA-TONKOVA, E. Biosurfactant Production by Halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, Antarctica. **Curr. Microbiol.**, v.61, p.112–117, 2010.

GHOJAVAND, H., et al., Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, p. 172-176, 2008.

GRABBER, J. H. et al. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science**, v.45, p.820-831, 2005.

GUERRA-SANTOS, L. H.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.48, p.301-305, 1984.

GUNTHER N. W. et al. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.2288–2293, 2005.

GUPTA, R. et al. Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of celluloses. **Biodeg**, v.22, p.797–804, 2011.

HABA, E. et al. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **J. Appl. Microbiol.** v.88, p.379–387, 2000.

GUTNICK, D. L. et al. Emulsan production in *Acinetobacter* RAG-1. **Adv. Biotechnol.** v.11, p.455–459, 1980.

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

HARMSSEN, P. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. **Bio Synergy**, v. 1, p. 1–49, 2010.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **Journal Science Food and Agriculture**, v.79, p.403–407, 1999.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. H. et al. Biochemical conversion of sugarcane straw hemicellulosic hydrolyzate supplemented with co-substrates for xylitol production. **Bioresource Technology**. v. 200, p. 1085-1088, 2016.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. **Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol**: estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana celular. 2015. 129p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

HILDEBRANDT, P.; WANARSKA, M.; KUR, J. A new cold-adapted beta-D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c - gene cloning, overexpression, purification and properties. **BMC Microbiology**, v.9, p. 1-11, 2009.

HIRATA, Y. et al. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. **J. Biosci. Bioeng.**, v.108, p.142–146, 2009.

HOMMEL R. K., et al., Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*, **Appl Microbiol Biotechnol**, v.42, p.192–197, 1994.

HOU, Y. et al. Selective conversion of rice straw to xylose, glucose, and other products in H₂O-SO₂ system by two-step treatment. **Journal of Molecular Liquids**, v.234, p.88-93, 2017.

HSU, G. L. et al. 2010, Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource. Technology**, v.101, p. 4907–4913, 2010.

ILORI, M.O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v.61, p.985-992, 2005.

IVANOVA V, et al. Microbiaeratin, a new natural indole alkaloid from a *Microbispora aerata* strain, isolated from Livingston Island, Antarctica. **Prep. Biochem. Biotech.**, v.37, p.161-168, 2007.

JADHAV, V. V. et al. Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic sea water **Desalination**, v.318 p.64–71, 2013.

JAIN, R. M. et al. Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p.199-204, 2013.

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

JAYARAMAN, K. Manufacturing sisal-polypropylene composites with minimum fibre degradation, **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 367-374, 2003.

JING, C.; XIN, S.; HUI, Z.; Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 501-506, 2006.

JOSHI, S., et al., Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v.99, p.195–199, 2008.

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

KAPPEN, L. Lichens in the Antarctic region. **Antarctic microbiology**, p. 433–490, 1993.

KARENTZ, D., Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. **Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects**, p. 92–110, 1994.

KATEMAL, W. et al. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Issatchenkia orientalis* SR4. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 54, p.79-82, 2008.

KATEMAL, W. Biosurfactants from Yeasts, MiniReview. **Walailak Journal**, v.9, p.1-8, 2011.

KELLY, C. et al. Effect of furfural, vanillin and syringaldehyde on *Candida guilliermondii* growth and xylitol biosynthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 97–108, 2008.

KIM, Y. B.; YUN, H. S.; KIM, E. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture, **Bioresour Technology**, v.100, p.6028–6032, 2009.

KIM, H. et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida sp.* SY16 using fed batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.70, p.391–396, 2006.

KIM, H. S. et al. Surface and physiochemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, from *Candida antárctica*. **Biotechnology Letters**, v.24, p.1637-1641, 2002.

KIM, H. et al. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.

KITAMOTO, D. et al. Production of Mannosylerythritol Lipids by *Candida antarctica* from vegetable oils agric. **Biol. Chem.** v.54, p.37-40, 1990.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal Bioscience and bioengineering**, v. 94, p.187-201, 2002.

KNOBLICH, A. et al. Electron Cryo-Microscopic Studies on Micellar Shape and Size of Surfactin, an Anionic Lipopeptide. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 5, p. 43-48, 1995.

KOKAL, S. Crude oil emulsions: a state-of-the-art review. In: ANNUAL TECHNICAL CONFERENCE AND EXHIBITION. **Proceedings**. 2002, San Antonio, Texas, EUA, 2002.

KONISHI, M. et al. Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by the newly isolated yeast strains belonging to the genus *Pseudozyma*, **Appl. Microbiol Biotechnol**, v.75, p.521–531, 2007.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L. **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p. 21-46, 1987.

KRETSCHNER, A.; BLOCK, H.; WAGNER, F. Chemical and physical characterisation of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. **Applied Environmental Microbiology**, v.44, p.864-870, 1982.

KRONEMBERGER, F. D. A. et al., Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.147, p.33–45, 2008.

KULAKOVSKAYA, T. V. et al. Ustilagic acid secretion by *Pseudozyma fusiformata* strains, **FEMS Yeast Research**, v.5, p.919–923, 2005.

KULAKOYSKAYA, T. V. et al. Characterization of an antifungal glycolipid secreted by the yeast *Syngedomyces paphiopedili*, **FEMS Yeast Research**, v. 5, p.247-252, 2004.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48,p. 3713–3729, 2009.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. New York: Springer, 2005.

LAKSHMANASWAMY, A. et al. Microbial removal of acetate selectively from sugar mixtures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1477–1484, 2011.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Curr Opin Colloid Interface Sci**, v.7, p.12–20, 2002.

LARSSON, S. et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. **Appl. Biochemistry Biotechnology**, v. 77–79, p. 91–103, 1999.

LATIP, W. et al. Expression and characterization of thermotolerant lipase with broad pH profiles isolated from an Antarctic *Pseudomonas sp* strain AMS3. **PeerJ**, v. 20, p.1-20, 2016.

LEAL, M. R. V. et al. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review, **Biomass and bioenergy**, v.53, p.11-19, 2013.

LIBKIND, D.; VAN BROOCK, M. R. Biomass and carotenoid pigments production by Patagonian native yeasts. **World J Microbiol Biotechnol**, v.22, p.687-692, 2006.

LIMA, A. S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica***. 1996. 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 1996.

LIN, S.C. Biosurfactant: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.63, p.109-120, 1996.

LOMBARDI, G. M. R., et al., Uso da palha de cana de açúcar como fonte de bioenergia versus a sua contribuição nutricional quando mantida no solo. CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOENERGIA. 7º, São Paulo, Sp, Universidade Federal de Lavras.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265–275, 1951.

MACDONALD, C. R.; COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E. Surface-Active Lipids from *Nocardia erythropolis* Grown on Hydrocarbons. **Appl Environ Microbiol**. v.1, p.117–123, 1981.

MAKKAR R. M.; CAMEOTRA S. S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal Ind. Microbiol. Bioeng.**, v.18, p.37–42, 1997.

MAKKAR, R .S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl Microbiol. Biotechnol.**, v.58, p.428–434, 2002.

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

MALAY, K. R. et al. Adaptation to low temperature and regulation of gene expression in antarctic psychrotrophic bacteria. **Journal of Biosciences**, v. 23, p.423-435, 1998.

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

MARTÍNEZ-ROSALES, C. et al. Antarctic DNA moving forward: genomic plasticity and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Letters**, v.331, p.1- 9, 2012.

MARTINIANO, S. E. et al. 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 um sistema contínuo composto por colunas de carvão ativo e resinas de troca iônica para o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar**. 2005. 131p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2005.

MARTON, J. M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 9–21, 2006.

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal Chromatogr. A**, v.864, p.211-220, 1999.

MAYORGA-REYES, L. et al. *Cellulomonas flavigena*: characterization of an endo-1,4-xylanase tightly induced by sugarcane bagasse. **FEMS Microbiology Letters**, v.214, p.205–209, 2002.

MCINERNEY, M. J.; JAVAHERI, M.; NAGLE JR, D. P. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. **J. Ind. Microbiol.**, v.5, p.95–101, 1990.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Anal.Chem.** v.11, p.426-428, 1959.

MOLDES, A. B. et al. Evaluation of biosurfactant production from various agricultural residues by *Lactobacillus pentosus*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.55, p.4481-4486, 2007.

MOHAN, P. K.; NAKHLA, G.; YANFUL, E. K. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Res.**, v.40, p.533–540, 2006.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure function relationship of lipopeptide Biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, p.211-218, 2000.

MORITA R. Y.; BAROSS, J. A. Microbial life at low temperatures: ecological aspects. **Microbial life in extreme environments**, p. 9–71, 1978.

MOUTTA, R. O. et al. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. **Sugar Tech**, v. 14, p. 53-60, 2012.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. v. 24, p. 509–515, 2006.

MULLER, M. M.; HAUSMANN, R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engeneering towards biotechnological production. **Applied Microbiology andBiotechnology**, v.91, p.251-264, 2011.

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

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v.93, p.1–10, 2004.

NABARLATZ, D. A. **Autohydrolysis of agricultural by-products for the productions of xylo-olygosaccharides**. 2006. 248p. Tese (Doutorado) - Universidade Rovira e Virgili, Tarragona, 2006.

NASCIMENTO, P. M. M. **Avaliação da tolerância das leveduras xilanolíticas isoladas da Antártica ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar visando à utilização de pentoses**. 2015. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

NAVONVENEZIA, S. Z. et al. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.3240–3244, 1995.

NEU, T. R.; PORALLA, K. Emulsifying agent from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.32, p.521–525, 1990.

NICHOLS, D. S.; NICHOLS P. D.; MCMEEKIN, T. A., Polyunsaturated fatty acid in Antarctic bacteria, **Antarctic Science**, v.5, p.149-160, 1993.

NICOLAUS, B.; LAMA, M. C. M. L.; ESPOSITO, E. Lipid modulation by environment stress in two models of extremophiles isolated from Antarctica. **Polar Biology**, v.24, p.1-8, 2001.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia e Desenvolvimento**, v.31, p.63-67, 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactant production by *B. subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.112, p.163–172, 2004.

NITSCHKE, M. et al. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1. **Biotechnology**, v.21, p.1562–1566, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v.97, p.336–341, 2006.

NOAH, K. S. et al. Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.122, p.465–474, 2005.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of temperature on production of lipopeptides antibiotics, iturin A and surfactant by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. **Journal Fermentation Bioengineering**, v.80, p.517-519, 1995.

OLIVEIRA F. J. S. et al. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process Biochemistry**, v.44, p.383–389, 2009.

ONWOSI, C. O.; ODIBO, F. J. Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.28, p.937–942, 2012.

ÓRDENES-AENISHANSLINS, N. et al. Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in Dye Sensitized Solar Cells. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.162, p.707-714, 2016.

PACHECO, G. J. **Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos.** 2008 95p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

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

PALMQVIST, E.; NILVEBRANT, N. O.; HAHN-HÄGERDAL, B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.49, p.691–697, 1998.

PANILAITIS, B. et al. Biosynthesis of emulsion biopolymers from agro-based feedstocks. **J. Appl. Microbiol.**, v.102, p.531-537, 2007.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3. Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates, **Bioresour Technology**, v.66, p.25–40, 1998.

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Critical Reviews Biotechnology**, v.31, p.20–31, 2011.

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

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.51, p.553-563, 1999.

PIPPO, W. et al. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part1: current situation and Environmental Aspects. **Waste Biomass Valor**, v.2, p.1-16, 2011.

PIPPOLA, E.; KOTIRANTA, H. The genus Tremella (Basidiomycota, Tremellales) in Finland, **Ann Bot. Fennici.**, v.45, p.401-434, 2008.

PORTAL BRASIL. **Economia e Emprego, Safra de cana 2016/17 cresce em produção e em área.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/04/safra-de-cana-2016-17-cresce-em-producao-e-area>> Acesso em: 25 jan. 2017.

RAHMAN, K. S. M. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology**, v.18, p.1277–1281, 2002.

RAMANI, K. et al., Microbial induced lipoprotein biosurfactant from slaughterhouse lipid waste and its application to the removal of metal ions from aqueous solution. **Colloids Surf B Biointerfaces**. v.1, p.254-263, 2012.

RAU, U. et al. Fed-batch bioreactor production of monnosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.607-613, 2005.

REIS, R. S. et al. **Biodegradation. Life of science, Biosurfactants: Production and applications.** 2013 Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/biosurfactants-production-and-applications>. Acesso em: 03 fev. 2017.

REZNIK, G. O. et al. Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. **Applied Microbiology Biotechnology**, V.86, p.1387–1397, 2010.

RINALDI, R. et al. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química nova**, v. 30, n. 5, p. 1374, 2007.

RIVERA, O. M. P. et al., Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. **Process Biochemistry**, v.42, p.1010–1020, 2007.

ROBERT, M. et al. Effect of carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.11, p.871-874, 1989.

ROCHA, M. V. P. et al. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju, In: 14º PDPETRO, Universidade Federal do Ceará, 2007.

RODRIGUES, L. et al., Biosurfactants: potential applications in medicine. **J. Antimicrob. Chemother.** v.57, p.609–618, 2006.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.52, p.154–162, 1999.

ROSENBERG, E. C. et al. 1988. Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 biodispersant. **Appl. Environ. Microbiol.** v.54, p.323–326, 1988.

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

RUISI, S. et al. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1-3, p. 127–141, 2006.

SAHA, B. C., Hemicellulose bioconversion, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279–291, 2003.

SAKA, S. Chemical composition and distribution. Chapter 2. In: HON, D.N.S.; SHIRAIISHI, N. (Eds.) **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2nd Edition. New York. Marcel Dekker Inc., p. 72, 2001.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v.35, p.1004-1010, 2012.

SANTOS, B. N. et al. Estabilidade de biossurfactante bacteriano do tipo lipopeptídeo frente às variações de temperatura, pH e concentrações salinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. 2014. Florianópolis.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17 p.1-30, 2016.

SANZ-MEDEL, A. et al., Organised surfactant assemblies in analytical atomic spectrometry. **Spectrochimica Acta**, v.54, p.251-287, 1999.

SARUBBO, L. A., et al., Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.95, p.59-67, 2001.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M.; Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.400-406, 2006.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr Microbiol.* v.54, p.68-73, 2007.

SATPUTE, S. K. et al., Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review, REVIEW, **Critical Reviews in Biotechnology**, v.30, p.1–18, 2010.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin, **Process Biochemistry**, v.40, p. 2953–2958, 2005.

SENE, L. et al. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1141–1146, 2011.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, J. P. D. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. New York:Marcel Dekker, 1998.

SHEPERD, R. et al., Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods, **Journal Biotechnology**, v.40, p.207-217, 1995.

SIDDIQUI, K. S. et al. 'Psychrophiles', **Annual Review of Earth and Planetary Science**, v. 41, p. 87 – 115, 2013.

SIEGMUND, I.; FRITZ, W. New method for detecting rhamnolipids excreted by pseudomonas species during growth on mineral agar, **Biotechnology Techniques**, v. 5, p.265-268, 1991.

SILVA, D. D. V. et al. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 248-254, 2004.

SILVA, D. D. V. et al. Evaluation of inoculum of *Candida guilliermondii* grown in presence of glucose on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities and xylitol production during batch fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 427–437, 2005.

SILVA, D. D. V. et al. New culture medium for bioconversion of C5 fraction from sugarcane bagasse using rice bran extract. **Braz. J. Microbiol.**, v. 45, p. 1469-1475, 2014.

SIM, L.; WARD, O. P.; LI, Z. Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.232-238, 1997.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. **Application aspects. Biotechnology Advances**, v.25, p. 99– 121, 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnology**, v.22, p.142–146, 2004.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, I. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

SLEATOR, R. D.; HILL, C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiol Rev.** v.26, p.49-71, 2002.

SMYTH, T. J. P. et al. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants, In: MCGENITY, T. J. et al. Handbook of Hydrocarbon and Lipid microbiology. Berlin: Springer-Verlag, 2010 p. 3689–3704, 2010.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.718-725, 2005.

SOBRINHO, H. B. S. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 912-917, 2008.

SOBRINHO, H. B. S. et al., Application of Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 in Removal of Petroleum Derivative from Soil and Sea Water, **Journal of Life Sciences**, v. 7, p. 559-569, 2013.

SOLAIMAN, D. K. Y. et al. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. **Biotechnology Letters**, v.26, p. 1241-1245, 2004.

SOURAV, D. et al. A review on natural surfactants. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 65757–65767, 2015.

SOUZA, T. G. C. **Seleção das leveduras do gênero *Rhodotorulas* do ambiente Antártico para a produção de biossurfactante**. 2016. 72p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, 2016

SUETIN, S. V. et al. *Clostridium tagluense* sp. nov., a psychrotolerant, anaerobic, spore-forming bacterium from permafrost. **Internacional Journal of Systematic. Evol. Microbiol.**, v.59, p.1421–1426, 2009.

SYLDATK, C. et al. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species. **A Journal of Biosciences**, v.40, p.61-67, 1987.

SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of biosurfactants, In: BIOSURFACTANTS AND BIOTECHNOLOGY, New York: Marcel Dekker, 1987. v. 25, p. 89–120.

SZCZERBOWSKI, D., et al. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw, **Carbohydrate Polymers**, v.114, p.95-101, 2014.

TAKAHASHI, C. M. et al. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.16, p. 829–834, 2000.

THANOMSUB, T. et al. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p.588-592, 2004.

THOMPSON, D. N. et al. Biosurfactants from potato process effluents, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84, p.917–930, 2000.

TOLEDANO, A., et al., Lignin separation and fractionation by ultrafiltration, **Separation and Purification Technology**, v. 71, p.38–43, 2010.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, **Biosurfactants market - global scenario, raw material and consumption trends, industry analysis, size, share and forecasts 2011 – 2018**, 2012, Disponível em: <<http://www.transparencymarketresearch.com/biosurfactants-market.html>>. Acesso: 20 fev. 2016.

VAN BOGAERT, I. N. A.; SOETAERT, W. **Biosurfactants: from genes to applications**, Berlim: Springer-Verlag, 2011.

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**, v.24, p. 604-620, 2006.

VANCE-HARROP, M. H. et al. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-Glucose and Babassu oil as carbon sources. **Journal Microbiology**, v.34, p.120–123, 2003.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant, **Bioresource Technology**, v.221, p.510-516, 2016.

VATSURINA, A. et al. *Desulfosporosinus hippei* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium isolated from permafrost, **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, p. 1228-1232, 2008.

VERDUYN, C. et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v.7, p.501–517, 1992.

VIEGAS, C. A.; SA-CORREIA, I. Action of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.645-651, 1991.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen -Amaranthaceae, Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 13, p. 46-49, 2003.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications, **Res. J. Microbiol.**, v.10, p.181–192, 2015.

WHANG, L. M. et al. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **J Hazard Mater.** v.28, p.155-163, 2008.

WILKINS, D. et al. Key microbial drivers in Antarctic aquatic environments, **FEMS Microbiol. Rev.**, v.37, p. 303–335, 2013.

WOJCIECHOWSKI, K. et al. Effect of β -casein on surface activity of Quillaja bark saponin at fluid/fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, v.34, p.208-216, 2014.

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

YOUSSEF, N. et al. In situ biosurfactant production by *bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. **Appl. environ. microbiol.**, v. 73, p.41239-41247, 2007.

ZAJIC, J. E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews Biotechnology**, v. 1, p. 87-107, 1984.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrant. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses, **Biofuels Bioproducts & biorrefining**, v.6, p.465–482, 2012.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). **Appl Environ Microbiol.** v.10, p.3276-82, 1992.

ZOSIM, Z.; GUTNICK, D. L.; ROSENBERG, E. Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilised by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, 281-292, 1982.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Concentrações dos reagentes utilizados para a realização da curva de calibração para dosagem de açúcares totais pelo método fenol sulfúrico

Tabela 1: Curva de calibração para determinação de açúcar total pelo método de fenol sulfúrico.

Tubo	Padrão (100µg/mL)	H ₂ O destilada (mL)	Fenol 5% (mL)	H ₂ SO ₄ (mL)	Concentração µg/ML
Branco	-	0,5	0,5	2,5	0
1	0,1	0,4	0,5	2,5	20
2	0,2	0,3	0,5	2,5	40
3	0,3	0,2	0,5	2,5	60
4	0,4	0,1	0,5	2,5	80
5	0,5	-	0,5	2,5	100

Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE B

Concentrações dos reagentes utilizados para a realização da curva de calibração para dosagem de açúcares redutores pelo método DNS.

Tabela 2: Curva de calibração para a determinação de glicose pelo método DNS.

Tubos	Padrão de glicose (mL)	H ₂ O destilada (mL)	Reativo DNS (mL)	Concentração (mg/mL)
Branco	-	1,0	1	-
1	0,1	0,9	1	0,1
2	0,2	0,8	1	0,2
3	0,4	0,6	1	0,4
4	0,6	0,4	1	0,6
5	0,8	0,2	1	0,8
6	1,0	-	1	1

Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE C

Concentrações dos reagentes utilizados para a realização da curva de calibração para dosagem de proteínas totais

Tabela 3: Curva de calibração para quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry.

Tubos	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[] µg/mL	0	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400
Padrão (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
H2O (mL)	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
M. Reativa (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE D

Resultados obtidos após análise da variância pelo teste estatístico de Tukey

Tabela 4: Coeficiente de variação (CV), Erro padrão do teste de Tukey e média para análise da significância estatística dos métodos de extração.

Métodos de extração	Cloroformio/ Metanol (4:1)	Cloroformio/ Metanol (2:1)	Hexano/Acetato de etila (7:3)	Acetato de etila
	3,50 a1	4,00 a1	4,00 a1	1,00 a1
CV (%)	40,79%			
Erro padrão	4			

Fonte: Autoria própria.

*Médias seguidas de letras distintas minúsculas nas linhas, indicam diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

APÊNDICE E

Resultados obtidos após análise da variância pelo teste estatístico de Tukey

Tabela 5: Coeficiente de variação (CV), Erro padrão do teste de Tukey e média para análise da significância estatística da estabilidade da emulsão em diferentes pHs.

Estabilidade	pH					
	2	4	6	8	10	12
	44,8 a1	27,3 a1	31,02 a1	30,2 a1	45,5 a1	10,9 a1
CV (%)	59,76					
Erro padrão	12					

Fonte: Autoria própria.

*Médias seguidas de letras distintas minúsculas nas linhas, indicam diferenças estatísticas ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Apêndice F

Resultados obtidos após análise da variância pelo teste estatístico de Tukey

Tabela 6: Coeficiente de variação (CV), Erro padrão do teste de Tukey e média para análise da significância estatística da estabilidade da emulsão em diferentes concentrações de NaCl.

Estabilidade	Concentração salina (%)				
	2	4	6	8	10
	45,23 a1	45,76 a1	42,39 a1	29,18 a1	44,43 a1
CV (%)	31,68				
Erro padrão	10				

Fonte: Autoria própria.

*Médias seguidas de letras distintas minúsculas nas linhas, indicam diferenças estatísticas ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Apêndice G

Resultados obtidos após análise da variância pelo teste estatístico de Tukey

Tabela 7: Coeficiente de variação (CV), Erro padrão do teste de Tukey e média para análise da significância estatística da estabilidade da emulsão em diferentes temperaturas.

Estabilidade	Temperatura (°C)						
	0 °C	4 °C	30 °C	40 °C	60 °C	80 °C	100 °C
	31,50 a3	40,62 a4	51,00 a5	21,87 a2	21,50 a2	21,50 a2	0
CV (%)	9,45						
Erro padrão	14						

Fonte: Autoria própria.

*Médias seguidas de letras distintas minúsculas nas linhas, indicam diferenças estatísticas ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.