

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

BRUNA CURRY CARNEIRO

Conversão de bagaço de cana-de-açúcar em biossurfactante por
***Aureobasidium pullulans* LB83 utilizando fermentação em estado sólido**

Lorena

2019

BRUNA CURRY CARNEIRO

**Conversão de bagaço de cana-de-açúcar em biossurfactante por
Aureobasidium pullulans LB83 utilizando fermentação em estado sólido**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Versão Corrigida

Lorena

2019

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

Carneiro, Bruna Curry

Conversão de bagaço de cana-de-açúcar em biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* LB83 utilizando fermentação em estado sólido / Bruna Curry Carneiro; orientador Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
97 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. 2019

1. Biossurfactante. 2. Fermentação em estado sólido. 3. Biomassa. I. Título. II. da Silva, Prof. Dr. Silvio Silvério, orient.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Neima e Victor por sempre incentivarem meus estudos. Obrigada por todo amor, apoio, incentivo, preocupação, valores e princípios.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, por toda confiança depositada, pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho, pela base científica que me proporcionou e por acreditar na minha capacidade.

Ao Dr. Paulo Franco Marcelino e ao Prof. Dr. Júlio César dos Santos, pela extrema paciência, sugestões, correções e boas conversas indispensáveis para a conclusão deste projeto.

Ao João, aluno de iniciação científica, pois, sem sua ajuda, certamente o trabalho teria sido mais difícil.

Agradeço também aos meus amigos de laboratório e da pós-graduação por toda a ajuda e os momentos de risos e descontração durante tantos dias difíceis.

Agradeço também à equipe do departamento de bioquímica pelo apoio e resolução das dúvidas sempre que necessário.

A Ana Karine e Alessandro pela paciência e companhia ao longo do mestrado.

Aos meus amigos de Vitória, de Lorena e espalhados pelo resto do Brasil.

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

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

RESUMO

CARNEIRO, B. C. **Conversão de bagaço de cana-de-açúcar em biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* LB83 utilizando fermentação em estado sólido.** 2019. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019

Surfactantes são moléculas com estruturas anfipáticas que são capazes de reduzir a tensão superficial de um líquido e/ou emulsificar substâncias de diferentes polaridades. São aplicados em diversos setores industriais; porém, quando produzidos a partir de matérias-primas não-renováveis, seu uso pode resultar em sérios danos ao meio ambiente. Dessa forma, biossurfactantes (BS), surfactantes naturais, são substitutos interessantes para os surfactantes sintéticos devido a sua biodegradabilidade e baixa toxicidade. No entanto, o custo de produção dos BS ainda não é competitivo quando comparado aos sintéticos. Outro problema na produção de BS é a formação de espuma; entretanto, pode ser evitado ao se utilizar fermentação em estado sólido (FES). Além disso, a FES permite a conversão direta de subprodutos agroindustriais em BS, consequentemente levando à redução de gastos com matéria-prima. Dessa forma, a FES soluciona dois gargalos da produção de BS. Alguns microrganismos produtores de BS não possuem a capacidade de degradar a lignina, o que dificulta o acesso destes às fibras de celulose e hemicelulose. Contudo, o pré-tratamento alcalino da biomassa pode auxiliar o processo, pois pode provocar a redução da quantidade de lignina e intumescimento das fibras, facilitando a degradação da biomassa pelos microrganismos. No presente trabalho utilizou-se o fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* como agente fermentativo, uma vez que este microrganismo não é patógeno como as bactérias geralmente utilizadas para a produção de BS. Como matriz sólida e fonte de carbono para a produção de BS em FES utilizou-se o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado em meio alcalino (PTA). O pré-tratamento do bagaço resultou em remoções de lignina de até 80 %. Nas FES foram alcançados índices de emulsificação superiores a 50 % após 96 e 720 h de cultivo para o bagaço PTA e *in natura*, respectivamente. Por meio de um planejamento de experimentos fatorial 2^2 com quatro pontos axiais e triplicata no ponto central foi possível encontrar a melhor condição de pré-tratamento do bagaço para a produção de BS em FES. Com a condição escolhida foi possível realizar fermentações de 96 h em reator de coluna segmentada obtendo índices de emulsificação variando de 40 a 63 %. Também foi notado um aumento da viscosidade e escurecimento do extrato bruto da fermentação, relacionados à produção de pululana e melanina, respectivamente. Desta maneira, o bagaço PTA mostra-se uma matéria-prima promissora para a produção de BS por *A. pullulans*.

Palavras-chave: Biossurfactante. Fermentação em estado sólido. Biomassa.

ABSTRACT

CARNEIRO, B. C. Conversion of sugarcane bagasse in biosurfactant by ***Aureobasidium pullulans* LB83 using solid-state fermentation**. 2019. 97 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019

Surfactants are molecules with amphipathic structures capable of reducing liquids superficial tension or emulsifying substances with different polarities. These compounds are applied in diverse industrial sectors, but when produced from non-renewable feedstocks, their use can result in serious environmental damages. Therefore, biosurfactants (BS), which are natural surfactants, are interesting substitutes for synthetic surfactants, due to its low toxicity and biodegradability. However, BS production costs are not yet economically competitive with synthetic surfactants. Another problem in BS synthesis is foam formation. Yet, this problem can be avoided by the use of solid-state fermentation process (SSF). Beyond that, SSF also allows direct conversion of agroindustry's residues in BS, leading consequently to raw material costs reduction. Thus, SSF solves two bottlenecks of BS production. Some BS producers' microorganisms are not able to degrade lignin, which hinder their access to cellulose and hemicellulose fibers. Nonetheless, biomass alkaline pretreatment can facilitate the process, since it causes the reduction of lignin amount and fibers swelling; this way, biomass degradation by microorganisms is eased. Thereby, at the present work, the microorganism *Aureobasidium pullulans* was chosen as fermentative agent, since it is not a pathogen as the bacteria commonly used for BS production. Raw and alkaline pretreated (APT) sugarcane bagasse were used as solid matrix and carbon source. Bagasse alkaline pretreatment resulted in up to 80 % lignin removal. In SSF, it was possible to reach emulsification indexes for the produced BS higher than 50 % after 96 h and 720 h for APT and raw bagasse, respectively. By means of a factorial design of experiments 2^2 with four axial points and triplicate in the center point it was possible to find the best pretreatment condition for sugarcane bagasse. With the ideal biomass pretreatment condition, it was possible to perform the SSF in a segmented column reactor during 96 h, resulting in emulsification indexes of 60,7%. It was also observed an increase in medium viscosity and darkening of the solid matrix, related to pullulan and melanin production, respectively. Therefore, APT bagasse shows itself as a promising raw material for BS production by *A. pullulans*.

Keywords: Biosurfactant. Solid-state fermentation. Biomass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de tensoativo composta pela cabeça polar e cauda apolar	24
Figura 2 - (A) Tensão superficial em uma gota de água pura; (B) Redução da tensão superficial da água provocada pela presença de tensoativo.....	25
Figura 3 - Ilustração esquemática da ação tensoativa e formação de micelas	25
Figura 4 - Formação de micelas (A) em meio aquoso e (B) em meio orgânico (micelas reversas).....	26
Figura 5 - Formação de emulsão a partir de água e óleo	26
Figura 6 - (A) Formação de espuma no rio Tietê e (B) Processo de eutrofização.....	27
Figura 7 - Aplicação de BS (em kton) no mercado norte americano em 2017 e previsão para 2024	29
Figura 8 - Principais tipos de glicolipídeos	30
Figura 9 - Principais tipos de lipopeptídeos.....	31
Figura 10 - Emulsan.....	32
Figura 11 - Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de BS a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: (A) fosfofrutoquinase; (B) Piruvato quinase; (C) isocitrato desidrogenase; (D) citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos). (E) piruvato desidrogenase; (F) piruvato carboxil	37
Figura 12 - Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de BS a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves: (A) isocitrato liase; (B) malato sintase; (C) fosfoenolpiruvato carboxilase; (D) frutose-1,6 bifosfatase.....	38
Figura 13 - Reator de coluna de escala laboratorial. No lado esquerdo diversas colunas em banho termostático para controle da temperatura. No lado direito ampliação de uma das colunas.	44
Figura 14 - Reator de bandeja do tipo Koji (1) Câmara, (2) válvula de água, (3) tubo com luz ultravioleta, (4, 8, 13) sopradores de ar, (5, 11) filtros de ar, (6) saída de ar, (7) humidificador, (9) Aquecedor, (10) recirculação de ar, (12) entrada de ar, (14) bandejas e (15) suportes das bandejas.	45
Figura 15 - Reator de tambor rotativo (1) entrada de ar, (2) eixo de rotação, (3) engate (4) bicos de ar, (5) linha de ar, (6) rolamentos, (7) tambor rotativo e (8) meio sólido.	46
Figura 16 - Reator de coluna de leito fixo segmentado	46
Figura 17 - Biomassa antes e após pré-tratamento	51

Figura 18 - <i>A. pullulans</i> na forma de levedura (A) e na forma filamentosa (B).....	52
Figura 19 - Fluxograma das atividades desenvolvidas	56
Figura 20 - Reator segmentado (A) sistema montado com 5 módulos desde a válvula de ar até o fluxímetro (explicado na Figura 21); (B) Vista lateral do módulo do reator; (C) vista superior do módulo e (D) Reator com 8 módulos após 96 h de fermentação.....	60
Figura 21 - Sistema de fermentação em reator de coluna segmentada	61
Figura 22 - Gráfico da concentração celular e IE _{24h} do extrato bruto em função do tempo utilizando bagaço <i>in natura</i> (A) e PTA (B) como substrato. A linha vermelha sinaliza o valor de 50% de IE.....	69
Figura 23 - Gráfico de Pareto para remoção de lignina com nível de confiança de 95 % (vermelho) e 90 % (azul)	72
Figura 24 - (A) Superfície de resposta do modelo para remoção de lignina em função da razão NaOH/Bagaço e tempo de pré-tratamento. (B) Gráfico de contorno do modelo para remoção de lignina em função da razão NaOH/Bagaço e tempo de pré-tratamento	73
Figura 25 - Índices de emulsificação e estabilidade das emulsões resultantes das fermentações utilizando como substratos os resíduos sólidos dos pré-tratamentos alcalinos obtidos no planejamento fatorial 2 ²	74
Figura 26 - Gráfico de Pareto utilizando como resposta IE _{96h} com nível de confiança de 95 % (vermelho) e 90 % (azul).....	75
Figura 27 - Gráfico do modelo gerado pela Equação 3 (linha preta) relacionando o IE _{96h} com a razão NaOH/Bagaço (linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança).....	76
Figura 28 - (A) Superfície de resposta do modelo para IE _{96h} em função da razão NaOH/Bagaço e tempo de pré-tratamento. (B) Gráfico de contorno do modelo para IE _{96h} em função da razão NaOH/Bagaço e tempo de pré-tratamento.....	77
Figura 29 - Comparação dos valores preditos (média ± intervalo de confiança) e experimentais (média ± desvio padrão) na variação do tempo de pré-tratamento em autoclave	78
Figura 30 - IE _{96h} e concentração celular ao longo da fermentação.....	79
Figura 31 - IE _{96h} de cada módulo dos diferentes reatores.....	81
Figura 32 - Relação entre ambos IE analisados	82
Figura 33 - Gráfico de Pareto para IE _{96h} com nível de confiança de 95 % (vermelho) e 90 % (azul)	83

Figura 34 - (A) Superfície de resposta do modelo para IE_{96h} em função do número de módulos e aeração. (B) Gráfico de contorno do modelo para IE_{96h} do número de módulos e aeração.	85
Figura 35 - Tipos de Liamocinas e exofilinas produzidas por <i>A. pullulans</i>	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns tipos de pré-tratamento e seus efeitos sobre a biomassa.....	50
Tabela 2 - Níveis dos fatores Razão de NaOH/bagaço e Tempo de pré-tratamento em autoclave para o planejamento fatorial 2 ²	57
Tabela 3 - Níveis dos fatores Número de módulos e Vazão de ar para o planejamento fatorial 2 ² em reator de coluna segmentada.....	61
Tabela 4 - Teste qualitativo de produção de celulasas e xilanases	66
Tabela 5 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes trabalhos.....	67
Tabela 6 - Composição das biomassas bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e PTA	68
Tabela 7 - Composição do bagaço <i>in natura</i> e dos resíduos sólidos após cada condição de pré tratamento (matriz do planejamento de experimentos com valores reais e codificados (entre parênteses) para pré-tratamento alcalino do bagaço utilizando como fatores a razão NaOH/Bagaço e o tempo de duração do pré-tratamento em autoclave), remoção de lignina e IE após 192 h de fermentação	71
Tabela 8 - ANOVA para planejamento de experimentos em relação a remoção de lignina com nível de confiança de 95 %	72
Tabela 9 - ANOVA para planejamento de experimentos em relação ao IE _{96h} a um nível de confiança de 95 %	75
Tabela 10 - Valores preditos e experimentais para remoção de lignina e IE _{96h} utilizando 0,12 (g/g) de NaOH/bagaço e 12 min em autoclave.....	78
Tabela 11 - Matriz do planejamento de experimentos fatorial completo 2 ² com valores reais e codificados (entre parênteses) para FES em reator modular utilizando como fatores o número de módulos e aeração e as respostas IE _{24h} e IE _{96h} após 96 h de fermentação.....	83
Tabela 12 - ANOVA para planejamento de experimentos em relação a IE _{96h} em reator de coluna segmentada com nível de confiança de 95 %.....	84
Tabela 13 - Tipos de moléculas presentes no BS caracterizado e suas porcentagens	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFEX	Explosão de fibras com amônia
ANOVA	Análise de variância
AT	Altura total
BS	Biossurfactantes
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CE	Camada emulsificada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação submersa
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IE	Índice de Emulsificação
IE _{24h}	Índice de Emulsificação medido 24 h após homogeneização
IE _{96h}	Índice de Emulsificação medido 96 h após homogeneização
MEOR	<i>Microbial enhanced oil recovery</i>
MEL	Manosileritritol lipídeos
NaOH	Hidróxido de sódio
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADP ⁺	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado
O ₂	Gás oxigênio
PTA	Pré-tratado em meio alcalino
YMA	Meio sólido com ágar extrato de levedura e de malte

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	Tensoativos e emulsificantes.....	24
2.2	Biossurfactantes.....	28
2.2.1	<i>Classificação dos BS.....</i>	<i>29</i>
2.2.2	<i>Características físico-químicas e biológicas dos BS.....</i>	<i>32</i>
2.2.3	<i>Aplicações.....</i>	<i>33</i>
2.2.4	<i>Produção de BS.....</i>	<i>35</i>
2.2.4.1	<i>Microrganismos utilizados.....</i>	<i>35</i>
2.2.4.2	<i>Principais parâmetros para a produção de BS.....</i>	<i>36</i>
2.2.4.3	<i>Principais desafios na produção de BS.....</i>	<i>39</i>
2.3	Fermentação em estado sólido (FES).....	40
2.3.1	<i>Reatores para FES.....</i>	<i>43</i>
2.4	Subprodutos agroindustriais.....	47
2.4.1	<i>Bagaço de cana-de-açúcar.....</i>	<i>48</i>
2.4.2	<i>Pré-tratamento alcalino.....</i>	<i>49</i>
2.5	<i>Aureobasidium pullulans.....</i>	<i>51</i>
2.5.1	<i>Produção de BS por A. pullulans.....</i>	<i>53</i>
3	OBJETIVOS.....	55
3.1	Objetivo geral.....	55
3.2	Objetivos específicos.....	55
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1	Preparo das matérias primas.....	56
4.2	Padronização granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar.....	57
4.3	Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar em autoclave.....	57
4.4	Fermentações.....	58

4.4.1	<i>Manutenção do microrganismo</i>	58
4.4.2	<i>Preparo do pré-inóculo</i>	58
4.4.3	<i>FES em frascos Erlenmeyer</i>	59
4.4.4	<i>FES em reator de coluna segmentada</i>	59
4.4.5	<i>Extração do BS</i>	61
4.4.6	<i>Recuperação do BS</i>	62
4.5	Métodos analíticos	62
4.5.1	<i>Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar</i>	62
4.5.2	<i>Determinação da capacidade adsorptiva do bagaço de cana-de-açúcar in natura e PTA</i>	62
4.5.3	<i>Determinação de açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	63
4.5.4	<i>Determinação da concentração celular durante a fermentação</i>	63
4.5.5	<i>Análise da atividade emulsificante</i>	63
4.5.6	<i>Análise da redução da tensão superficial</i>	64
4.5.7	<i>Teste qualitativo para produção de celulasas e xilanases</i>	64
4.5.8	<i>Caracterização do BS obtido</i>	64
4.5.9	<i>Análise Estatística</i>	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	Teste qualitativo da produção de celulase e xilanases	66
5.2	Composição do Bagaço de cana-de-açúcar in natura e PTA	67
5.3	Avaliação da produção de BS por FES utilizando bagaço in natura e PTA como substrato	69
5.4	Estudo das variáveis mais influentes no pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar	69
5.4.1	<i>Análise da remoção de lignina</i>	70
5.4.2	<i>Análise do IE do extrato bruto da fermentação</i>	74
5.4.3	<i>Confirmação dos modelos</i>	77

5.5	Produção de BS utilizando as condições mais favoráveis de pré-tratamento em meio alcalino em autoclave.....	79
5.6	FES em reator de coluna segmentada	80
5.6.1	<i>Análise do IE_{96h} no reator de coluna segmentada.....</i>	83
5.6.2	<i>Quantificação do BS produzido.....</i>	86
5.6.3	<i>Caracterização do BS produzido</i>	87
6	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

Tensoativos ou surfactantes são moléculas com estruturas anfipáticas e capazes de reduzir a tensão superficial de líquidos e emulsionar misturas de substâncias com diferentes polaridades. Estes compostos são amplamente aplicados em vários setores industriais, desde o petroquímico até o de alimentos. Sendo assim, sem os surfactantes não seria possível executar diversas ações do cotidiano, como escovar os dentes, limpar casas, tomar sorvete e fazer uso de alguns medicamentos (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011; SANTOS *et al.*, 2016).

Grande parte dos tensoativos é proveniente de derivados de petróleo, chamados também de surfactantes sintéticos. Por não serem obtidos a partir de fontes renováveis, muitas vezes são tóxicos ao meio ambiente e não-biodegradáveis. Diversos problemas podem ser causados por estes surfactantes, como o processo de eutrofização e grande formação de espuma na superfície dos rios e lagos, que dificultam a entrada de raios solares, prejudicando a vida aquática (COLLA; COSTA, 2003; NITSCHKE; PASTORE, 2003; KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2015).

Recentemente ocorre por parte dos consumidores uma grande preocupação com o meio ambiente, que exercendo um maior apelo sobre empresas para a manufatura de produtos ambientalmente corretos. Como substitutos aos surfactantes sintéticos surgem os biossurfactantes (BS), os quais são moléculas produzidas por plantas, animais ou microrganismos que possuem características semelhantes aos surfactantes sintéticos. Por serem de origem natural, são em geral biodegradáveis, não tóxicos ao meio ambiente e podem ser provenientes de fontes renováveis. Além disso, muitos BS têm ação antibiótica, inseticida, antitumoral, antifúngica e antiviral. Todavia, sua produção ainda apresenta alguns problemas sérios, como a geração de espuma e a recuperação do produto, que reduzem a competitividade dos BS em relação aos surfactantes tradicionais (MANEERAT, 2005; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Uma forma de reduzir os custos de produção dos BS é a utilização de subprodutos agroindustriais como matéria-prima, que além de possuírem vantagem econômica, são renováveis. Alguns microrganismos são capazes de degradar diretamente a biomassa lignocelulósica, enquanto outros microrganismos necessitam que a lignina seja removida, por meio de um pré-tratamento alcalino, por exemplo. Além disso, muitas vezes os subprodutos agroindustriais não recebem um destino correto e acabam tornando-se

poluentes. No Brasil, por exemplo, o principal subproduto agroindustrial de origem lignocelulósica, o bagaço de cana-de-açúcar, acumula-se nos pátios das usinas sucroalcooleiras onde é gerado. Desta forma, o uso de biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de BS pode ser uma solução interessante para dois problemas, um destino para o subproduto e a redução nos custos de produção (NIGAM; PANDEY, 2009; FARINAS, 2015).

Atualmente, diversos estudos para a produção de BS ocorrem ao redor do mundo e a maior parte deles foca na utilização de bactérias, principalmente dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. A aplicação de BS produzidos por bactérias, geralmente, é limitada, devido à patogenicidade de alguns destes organismos. O *status* GRAS indica se microrganismos/bioprodutos não apresentam riscos de patogenicidade e toxicidade, possibilitando seu uso nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Diversos fungos e leveduras possuem o *status* GRAS (*Generally recognized as safe* – Geralmente Reconhecido como Seguro) e, por isso, seu uso para a produção de BS vem crescendo, como por exemplo o fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; BRUMANO, 2017a).

A. pullulans é conhecido por ser produtor de pululana, um exopolissacarídeo, e por suas colônias apresentarem coloração negra devido à produção de melanina. Alguns autores reportam que este microrganismo produz moléculas que possuem características surfactantes, chamadas de óleos pesados (*heavy oils*). Além disso, algumas linhagens de *A. pullulans* são capazes de produzir enzimas celulasas e xilanases, o que possibilita a degradação da fração de carboidratos de materiais lignocelulósicos. Em vista disto, abre-se o caminho para a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para fermentação em estado sólido (FES) por *A. pullulans*. (DESHPANDE; RALE; LYNCH, 1992).

A FES é uma técnica fermentativa antiga, muito explorada no Oriente, que simula condições parecidas com o habitat de microrganismos na natureza: uma matriz sólida, que pode ou não ser substrato, envolvida em uma fina camada de água (NIGAM; PANDEY, 2009). Deste modo, não há água livre no sistema. Este fato pode proporcionar as seguintes vantagens: a produção tende a ser mais alta, há menos riscos de contaminação por bactérias e os gastos costumam ser mais baixos. Além disso, a FES resolve um dos problemas mais intrínsecos na produção de BS: a formação de espuma (MITCHELL *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*, 2000)

Estudos anteriores mostraram a capacidade deste microrganismo de produzir BS por meio de FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar como suporte e sacarose sintética como fonte de carbono (BRUMANO, 2017a). Desta forma, o presente trabalho visa dar continuidade a estes estudos, porém, inovando ao utilizar apenas o bagaço de cana-de-açúcar, mais precisamente as frações celulósica e hemicelulósica, como fonte de carbono, estudar a melhor condição de pré-tratamento desta biomassa a fim de produzir uma maior quantidade de BS e estudar sua produção em reator de coluna segmentado.

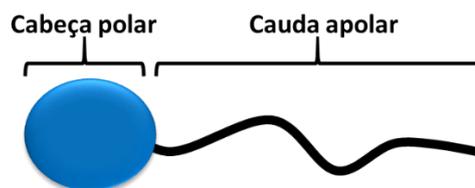
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tensoativos e emulsificantes

Tensoativos, também chamados de surfactantes, termo derivado da expressão *surface active agent*, são moléculas extremamente importantes na sociedade atual, uma vez que são amplamente aplicados numa variedade de indústrias como as de produtos de limpeza domésticos e industriais, processamento de alimentos, produção de polímeros, tecidos, polpas e papéis, e também produtos agrícolas. Algumas aplicações mais finas incluem o uso em cosméticos e produtos de uso pessoais, fármacos e agentes molhantes (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011; FELIPE; DIAS, 2017). Em 2014 a maior demanda por surfactantes, cerca de 40 % do mercado, encontrava-se na área de produtos para limpeza domiciliar (*home care*), o que ocorre devido à ampla aplicação dos tensoativos na elaboração de detergentes e produtos de limpeza. No entanto, espera-se que esta aplicação perca espaço para outros segmentos, como a produção de cosméticos (GRAND VIEW RESEARCH, 2014). Englobando as diversas aplicações, percebe-se que o mercado de tensoativos encontra-se em crescimento, no ano 2016, por exemplo, o mercado global de surfactantes atingiu 30,64 bilhões de dólares e estima-se que em 2021 alcance 39,86 bilhões de dólares (MARKETS AND MARKETS, 2016).

O termo surfactante abrange uma grande variedade de compostos, tanto sintéticos quanto biológicos, ambos possuindo atividade tensoativa. Estas moléculas são orgânicas e anfifílicas, ou seja, possuem uma cabeça polar, que pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfótera, e uma cauda apolar (Figura 1) (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

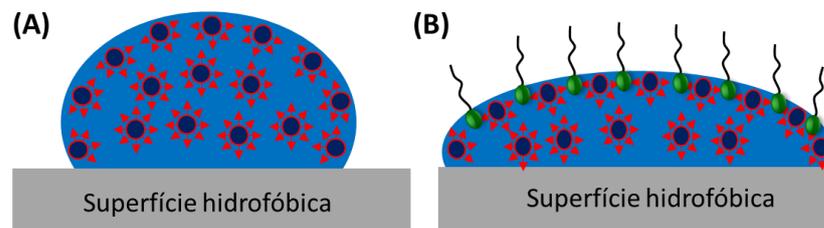
Figura 1 - Molécula de tensoativo composta pela cabeça polar e cauda apolar



Fonte: Autoria própria

Estes compostos são capazes de reduzir a tensão superficial de líquidos, pois ao se acumularem nas interfaces (líquido-líquido ou líquido-ar) diminuem a interação entre as moléculas da superfície do fluido (NITSCHKE; PASTORE, 2002; MARCHANT; BANAT, 2012). Na ausência de surfactante (Figura 2(A)) a gota de água permanece coesa, pois a força resultante de atração das moléculas da superfície do líquido está voltada para dentro da gota, já na presença de surfactante (Figura 2(B)) a gota perde a coesão (FELIPE; DIAS, 2017).

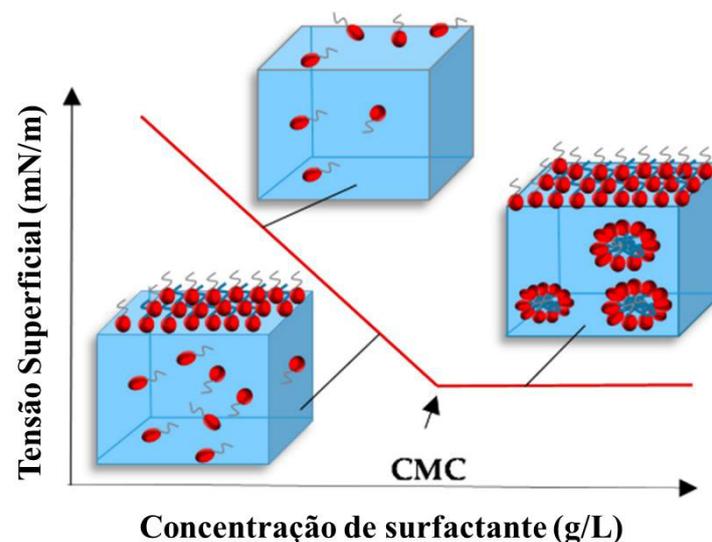
Figura 2 - (A) Tensão superficial em uma gota de água pura; (B) Redução da tensão superficial da água provocada pela presença de tensoativo.



Fonte: Autoria própria

Ao se adicionar surfactante a um líquido, as moléculas do tensoativo ocupam primeiro as interfaces, depois, quando as interfaces se encontram saturadas, o surfactante começa a se dispersar no interior do líquido (Figura 3), iniciando a formação de micelas. Para cada surfactante existe uma concentração diferente na qual as micelas começam a ser formadas, denominada concentração micelar crítica (CMC) (DALVIN, 2011; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

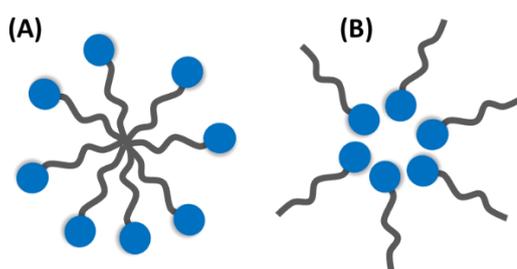
Figura 3 - Ilustração esquemática da ação tensoativa e formação de micelas



Fonte: Adaptado de Santos *et al.*, 2016.

As micelas são aglomerados de moléculas anfipáticas que se formam devido a interação das caudas hidrofóbicas entre si e sua aversão ao meio aquoso, ou seja, as caudas apolares se voltam para dentro e as cabeças polares para fora da estrutura (Figura 4 (A)). Quando a molécula de surfactante está em meio orgânico, ocorre a formação de micelas reversas, as cabeças polares da estrutura se atraem, enquanto que as caudas se voltam para fora interagindo com o meio (Figura 4 (B)). A CMC de cada surfactante depende tanto de sua estrutura, quanto do pH, força iônica e temperatura da solução em que se encontra (NITSCHKE; PASTORE, 2002; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011; MARCHANT; BANAT, 2012).

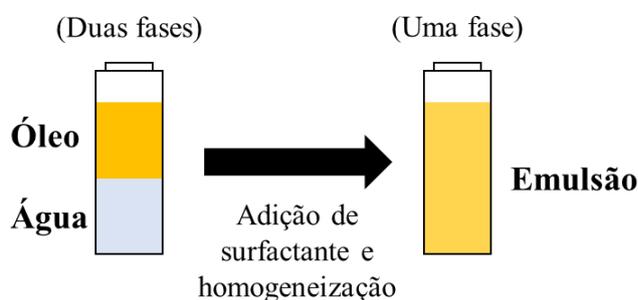
Figura 4 - Formação de micelas (A) em meio aquoso e (B) em meio orgânico (micelas reversas)



Fonte: Autoria própria

A mistura de dois líquidos imiscíveis gera um sistema termodinamicamente instável, dessa forma, é necessário um surfactante para reduzir a energia livre do sistema e estabilizar a área interfacial entre as duas fases (ATTWOOD; FLORENCE, 1983). Na Figura 5 podem ser observadas estas dispersões líquido-líquido, que são chamadas de emulsões.

Figura 5 - Formação de emulsão a partir de água e óleo



Fonte: Autoria própria

Em uma mistura água-óleo, por exemplo, as micelas permitem a formação de emulsões, pois englobam em seu interior gotículas de óleo e a repulsão (espacial ou eletrostática) entre as cabeças polares do tensoativo impede a coalescência com outras gotículas. Quando as emulsões formadas são estáveis, os surfactantes são denominados

emulsificantes e sua atividade emulsificante irá depender de vários fatores, como a concentração do surfactante no meio, composição das fases hidrofílica e hidrofóbica, a estrutura do surfactante e a forma de homogeneização (KOH; LINHARDT; GROSS, 2016). Além disso, os tensoativos possuem a capacidade de detergência, ou seja, de retirar impurezas de superfícies (DALTIM, 2011; KOH; LINHARDT; GROSS, 2016).

Os surfactantes sintéticos (obtidos a partir de derivados do petróleo) detêm 44 % do mercado, já os óleo-químicos (obtidos a partir de óleos vegetais modificados por reações químicas) 53% e os BS correspondem a apenas 3 %. Desta forma, observa-se que grande parte do mercado de tensoativos corresponde a moléculas produzidas a partir de derivados do petróleo, também chamadas de surfactantes petroquímicos. Estes tensoativos, além de serem produzidos a partir de matérias-primas não renováveis, são, muitas vezes, prejudiciais ao meio ambiente, dado que podem possuir longas cadeias carbônicas, ramificadas ou conter compostos aromáticos tornando difícil sua degradação (NITSCHKE; PASTORE, 2002; SANTOS *et al.*, 2016). O acúmulo de surfactantes sintéticos em corpos d'água pode levar a diversos problemas ambientais, como eutrofização de rios e lagos, aumento da concentração de fosfato, solubilização de compostos orgânicos e formação de espuma (Figura 6). A formação de espuma impede a entrada de raios solares, proporcionando a morte de diversos organismos aquáticos. Fato que também é provocado pela eutrofização, que, além disso, reduz a quantidade de O₂ solúvel na água (MARCHANT; BANAT, 2012; KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2015).

Figura 6 - (A) Formação de espuma no rio Tietê e (B) Processo de eutrofização



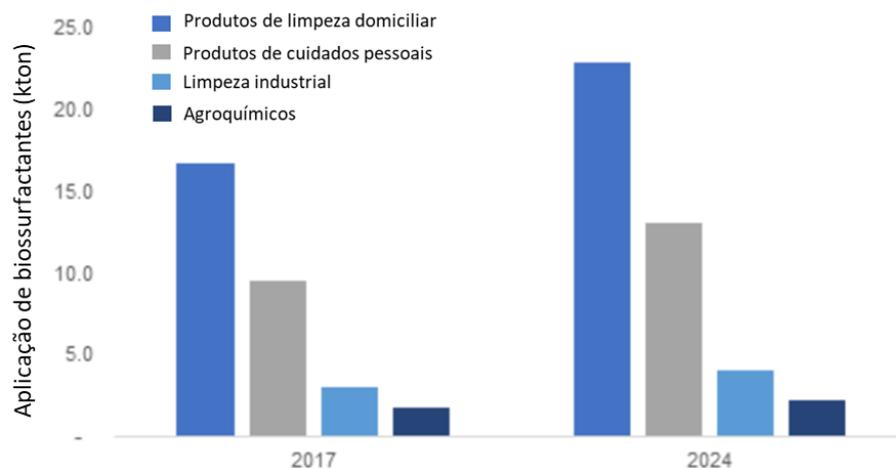
Fonte: (A) Tomazela (2015), (B) Magalhães (2018)

2.2 Biossurfactantes

Devido aos diversos problemas ambientais causados pelos surfactantes sintéticos, os consumidores exercem uma pressão cada vez maior sobre as indústrias para a utilização de produtos ambientalmente corretos (*ecofriendly*), levando a um maior interesse pelos biossurfactantes (BS). Os surfactantes biológicos ou BS são sintetizados por células vivas, ou seja, são metabólitos de origem vegetal, animal ou microbiana, que possuem propriedades físico-químicas similares ou até mesmo superiores aos surfactantes sintéticos, como redução da tensão superficial e formação de emulsões (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011; DE *et al.*, 2015).

A maior limitação do uso comercial de BS é a complexidade e alto custo de produção, desta forma, a comercialização destes bioprodutos ainda não é competitiva em relação aos surfactantes sintéticos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; MANEERAT, 2005; KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2015). No entanto, em 2017 o mercado de BS gerou uma receita de 1,85 bilhões de dólares, e estima-se que esse mercado atinja a marca de 540 kton, gerando uma receita de 2,7 bilhões de dólares em 2024. Além disso, no mercado americano, a maior aplicação deste tipo de molécula foi em produtos de limpeza domiciliar, cerca de 16 kton, e espera-se que este mercado cresça para 24 kton em 2024 (Figura 7) (GLOBAL MARKETS INSIGHTS, 2018). Assim, constata-se que o mercado de BS tem grandes expectativas de crescimento e o investimento em pesquisa e desenvolvimento nesta área torna-se cada vez mais importante e estratégico. Atualmente alguns dos BS disponíveis comercialmente são ramnolipídeos, surfactina, soforolipídeos, manosileritritol lipídeos e saponinas (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011; MARCELINO, 2016).

Figura 7 - Aplicação de BS (em kton) no mercado norte americano em 2017 e previsão para 2024



Fonte: Global Markets Insights (2018)

Mesmo com limitações econômicas, há grande interesse nesses bioprodutos, já que são considerados uma alternativa “verde” aos surfactantes sintéticos, pois geralmente são biodegradáveis, não-tóxicos ao meio ambiente e possuem grande variabilidade das estruturas químicas, o que permite aplicações bem específicas para cada tipo de molécula (NITSCHKE; PASTORE, 2003).

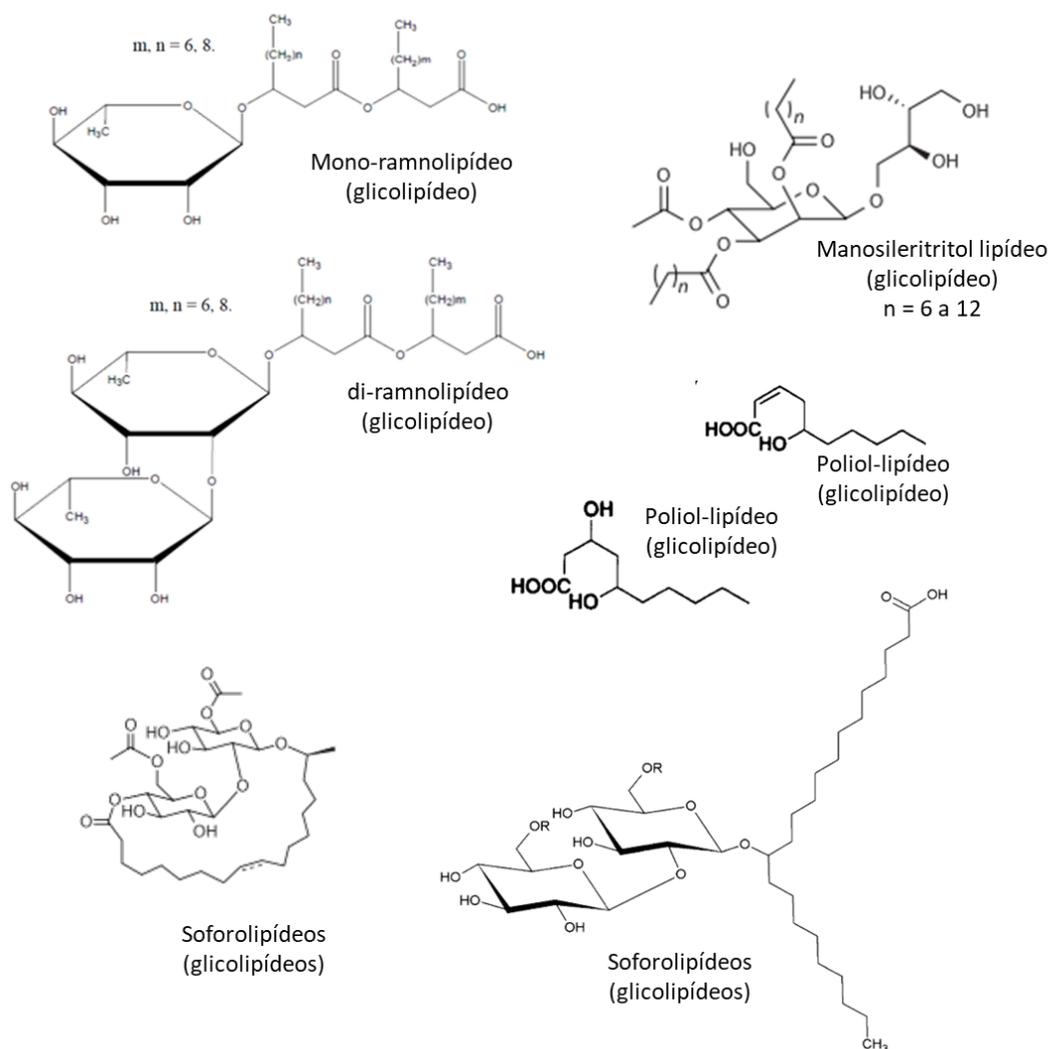
2.2.1 Classificação dos BS

Dentre os vários BS disponíveis, os surfactantes de origem microbiana, produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras, são os mais destacados e estudados. Estas moléculas apresentam uma maior variedade de combinações entre a cabeça hidrofílica e cauda hidrofóbica em relação aos surfactantes sintéticos, tornando suas aplicações mais específicas. No entanto, a composição destas molécula dependerá de diversos fatores, como o microrganismo utilizado como agente fermentador, fonte de carbono, indutores, pH do meio e temperatura (COLLA; COSTA, 2003).

Enquanto os surfactantes sintéticos são classificados de acordo com a carga de sua fração polar (cabeça), os BS são classificados de acordo com a composição química da molécula. Os BS podem ser divididos em cinco principais grupos: (a) glicolipídeos, (b) lipopeptídeos/lipoproteínas, (c) fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros, (d) surfactantes poliméricos e (e) surfactantes particulados (FELIPE; DIAS, 2017).

Os glicolipídeos são compostos por ácidos graxos de cadeia longa ligados a carboidratos ou polióis. Na Figura 8 podem ser observados os principais representantes desta categoria: ramnolipídeos, sofrorolipídeos e manosileritritol lipídeos (MEL) (KULAKOVSKAYA, E.; KULAKOVSKAYA, T., 2014).

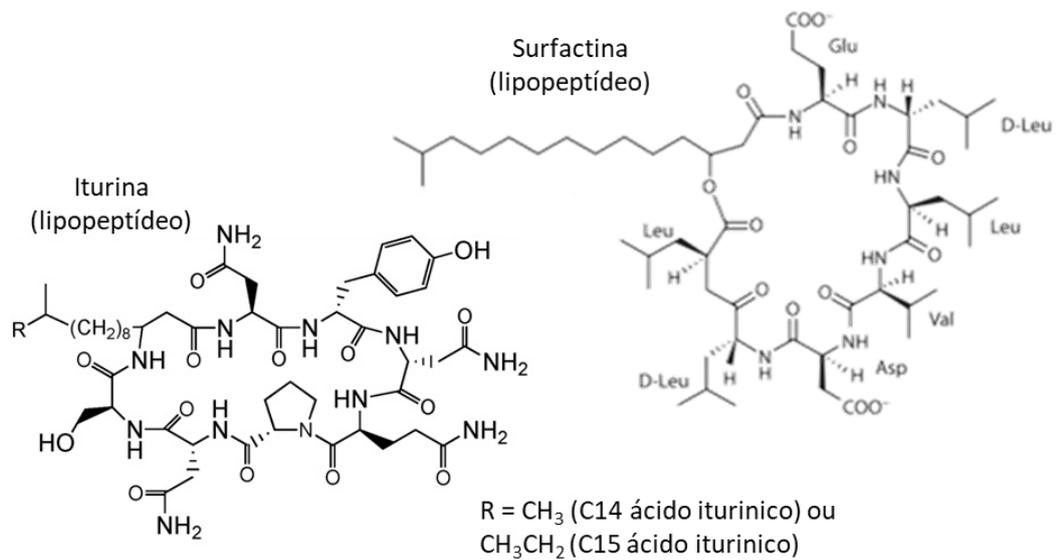
Figura 8 - Principais tipos de glicolipídeos



Fonte: Kosaric e Vardar-Sukan (2015) e Soberón-Chavez (2011)

Já os lipopeptídeos/lipoproteínas são peptídeos ou proteínas ligados a ácidos graxos, os mais conhecidos são a surfactina e a iturina (Figura 9). A parte polar (peptídeo ou proteína) deste tipo de BS pode ser neutra ou aniônica e seus aminoácidos podem compor uma estrutura cíclica (MELO; AZEVEDO, 2008; KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2015; MARCELINO, 2016).

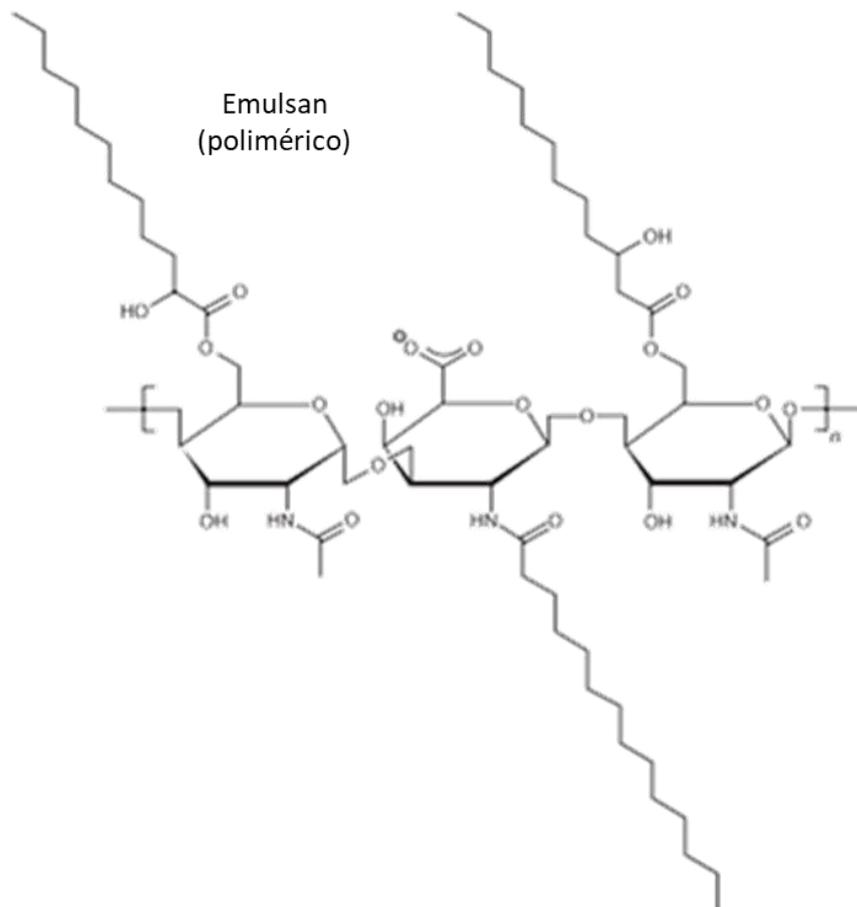
Figura 9 - Principais tipos de lipopeptídeos



Fonte: Moran *et al.* (2008) e Kosaric e Vardar-Sukan (2015).

Os surfactantes poliméricos são biopolímeros de alta massa molar, como emulsan (Figura 10), biodispersan e liposan, podendo ser compostos por cadeias de carboidratos e/ou proteínas, que contêm ou não uma fração lipídica. Estes BS geralmente possuem alta viscosidade e são considerados melhores emulsificantes que redutores de tensão superficial (MELO; AZEVEDO, 2008; DE *et al.*, 2015; MARCELINO, 2016).

Por fim, os surfactantes particulados são vesículas extracelulares produzidas por alguns microrganismos ou o próprio microrganismo, visto que algumas células possuem atividade surfactante (KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2015; MARCELINO, 2016).

Figura 10 - Emulsan

Fonte: Kosaric e Vardar-Sukan (2015)

2.2.2 Características físico-químicas e biológicas dos BS

Uma vez que surfactantes contendo a fração polar carregada positivamente são tóxicos, possivelmente, não existem BS catiônicos, desta forma, esta fração dos BS é neutra ou aniônica. O tamanho da fração apolar pode variar de ácidos graxos de cadeias curtas (8 carbonos) a cadeias poliméricas, como o BS PE12 (2000 kDa) (GUTIERREZ *et al.*, 2008; MELO; AZEVEDO, 2008).

Outra vantagem, é que alguns BS possuem, em geral CMCs baixas, quando comparadas as dos surfactantes sintéticos. Dessa forma, a utilização destes produtos pode ser feita em menor quantidade, acarretando uma economia de material. Todavia, as CMCs de BS podem variar de 1 a 2000 mg/L (DE *et al.*, 2015; FELIPE; DIAS, 2017). Estas

moléculas exercem atividade surfactante tanto em líquidos quanto em superfícies sólidas e podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m. (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011; SANTOS *et al.*, 2016).

Além disso, os surfactantes de origem microbiana muitas vezes são termotolerantes, halotolerantes e também estáveis em uma ampla faixa de pH (entre 2 e 12) (COLLA; COSTA, 2003; DE *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016; FELIPE; DIAS, 2017).

Ainda não há uma certeza absoluta sobre o porque microrganismos produzem BS, mas sabe-se que este composto exerce algumas funções fisiológicas como emulsificação de compostos insolúveis em água, regulação da adesão/liveração da célula à superfícies e atividade antibiótica. Tudo isso aumenta a competitividade do microrganismo na obtenção de nutrientes e sua chance de sobrevivência (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Além disso, devido a sua origem biológica, os BS são degradados mais facilmente pelo ambiente do que seus análogos sintéticos. Também possuem baixa toxicidade e biocompatibilidade, possibilitando seu uso em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; COLLA; COSTA, 2003). Na seção a seguir serão discutidas as principais aplicações dos BS.

2.2.3 Aplicações

A diversidade química dos BS abre um grande leque de propriedades, possibilitando as mais variadas aplicações, pois, por serem moléculas orgânicas complexas, os diferentes grupos funcionais levam a ações específicas (SANTOS *et al.*, 2016). Dessa forma, cada molécula pode ser aplicada em um nicho diferente como nas indústrias petrolíferas, de alimentos e bebidas, têxteis, de tintas, de celulose, farmacêutica, na mineração e na nanotecnologia (DE *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016; SINGH; PATIL; RALE, 2018).

Para a aplicação de BS como *commodities*, pode-se evitar os custos com separação e recuperação ao se utilizar o extrato bruto da fermentação, levando a uma queda considerável nos custos de produção de BS. Dessa forma, a utilização do produto bruto pode ser uma opção economicamente interessante para processos como a recuperação melhorada de petróleo (*Microbial enhanced oil recovery* - MEOR), biorremediação, tratamento de efluentes, agricultura e etc. (SANTOS *et al.*, 2016; SINGH; PATIL; RALE, 2018).

Atualmente o principal mercado de BS encontra-se na indústria petrolífera, que utiliza BS para recuperação de petróleo de tanques de armazenamento, operações de limpeza em derramamentos e biorremediação tanto do solo quanto da água. Na recuperação do petróleo, por exemplo, o BS reduz a tensão interfacial entre o petróleo/rocha e entre o petróleo/água e diminui a alta viscosidade do fluido, levando à redução das forças de capilaridade que impediriam a retirada do petróleo dos poros das rochas (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999; MARCHANT; BANAT, 2012).

Na mineração, os BS são utilizados na remoção de metais pesados do solo: os metais são removidos pela formação de compostos complexos com os surfactantes e ficam presos nas micelas por interações eletrostáticas, posteriormente, são facilmente recuperados por precipitação. Neste processo a quantidade de BS utilizada é muito menor que se fosse aplicado um surfactante químico e, além disso, os BS são biodegradáveis e não prejudicam o meio ambiente (SARUBBO *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016).

Na indústria alimentícia a emulsificação é muito importante para a textura e consistência em alimentos e é necessária na dispersão e solubilização das fases e aromas. Desta forma, a função principal dos surfactantes é estabilizar a emulsão, controlando a aglomeração dos glóbulos de gordura ou estabilizando sistemas aerados, como cremes com alto teor de gordura, manteiga, maionese e outros alimentos. Alguns emulsificantes também melhoram a textura e o tempo de prateleira de produtos contendo amido, alteram propriedades reológicas da farinha e melhoram a textura de produtos com alto teor de gordura. Além de serem utilizados para elaboração do produto final da indústria alimentícia, os BS podem ser utilizados no processamento da matéria-prima com as mesmas finalidades. No entanto, a indústria alimentícia ainda não utiliza os BS em ampla escala, principalmente devido a necessidade de regulamentação destes novos ingredientes (MARCHANT; BANAT, 2012; CAMPOS *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2016).

Por possuírem diferentes aplicações biológicas como propriedades fungicidas, bactericidas, antivirais, inseticidas e também propriedades anti-adesiva e de inibição de enzimas, os BS podem ter um futuro promissor na indústria farmacêutica (ARAÚJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; SANTOS *et al.*, 2016). Alguns lipopeptídeos, por exemplo, são comercializados como antibiótico para dermatites (ROBBEL; MARAHIEL, 2010). A propriedade de anti-aderência dos BS, habilidade de impedir a fixação de microrganismos patogênicos a superfícies sólidas, foi reportada por reduzir o número de infecções hospitalares. Por fim, na nanotecnologia, os BS proporcionam a formação de micro-

emulsões necessárias para a produção de nanopartículas (REDDY *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2016).

2.2.4 Produção de BS

2.2.4.1 Microrganismos utilizados

Estudos envolvendo BS começaram no século XX e, desde então, o uso destes compostos expandiu. Conseqüentemente, ocorreu um aumento no interesse por parte de pesquisadores em relação a isolamento de microrganismos capazes de produzir moléculas com boas propriedades tensoativas (DESAI; BANAT, 1997; SANTOS *et al.*, 2016; YAZID *et al.*, 2017).

Microrganismos produtores de BS já foram isolados dos mais diversos tipos de ambientes como solo, água do mar, sedimentos marinhos e superfície de plantas. No entanto, também são encontrados em ambientes extremos, como poços de petróleo, ambientes com altas concentrações salinas e com temperaturas extremamente baixas, como na Antártica. Além disso, a variabilidade de microrganismos produtores também é muito ampla, a literatura descreve, principalmente, bactérias como grandes produtoras de BS. *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, produz ramnolipídeos, várias outras espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* produzem lipopeptídeos cíclicos (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011; SANTOS *et al.*, 2016).

A maior parte dos estudos para produção de BS está relacionada a bactérias e muitas delas são patógenas, o que restringe a aplicação de seus bioprodutos em alimentos e fármacos. Todavia, alguns microrganismos possuem o status GRAS, ou seja, não apresentam riscos de patogenicidade e toxicidade, possibilitando seu uso nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Desta forma, em virtude de muitos fungos e leveduras possuírem o “status” GRAS, seu uso para a produção de BS vem crescendo. Outra vantagem do uso de leveduras na produção de BS é a resistência da célula ao próprio BS secretado no meio de cultivo, o que evita a inibição por produto (MORITA *et al.*, 2006).

A produção de surfactantes por células vivas ocorre porque estas moléculas facilitam a solubilização de compostos insolúveis em meio aquoso, conseqüentemente, aumentando a quantidade de substrato ou nutrientes disponíveis para consumo do organismo (SANTOS *et al.*, 2016). Além disso, alguns BS possuem atividades biológicas importantes, como antibiótica, antifúngica, antiviral e inseticida e são responsáveis pela adesão de microrganismos a hidrocarbonetos. Os BS também atuam na regulação da aderência/liberação de células a superfícies durante a formação de biofilmes. Todas estas características aumentam as chances de sobrevivência do organismo produtor e sua competitividade pelo substrato disponível (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; SANTOS *et al.*, 2016; FELIPE; DIAS, 2017).

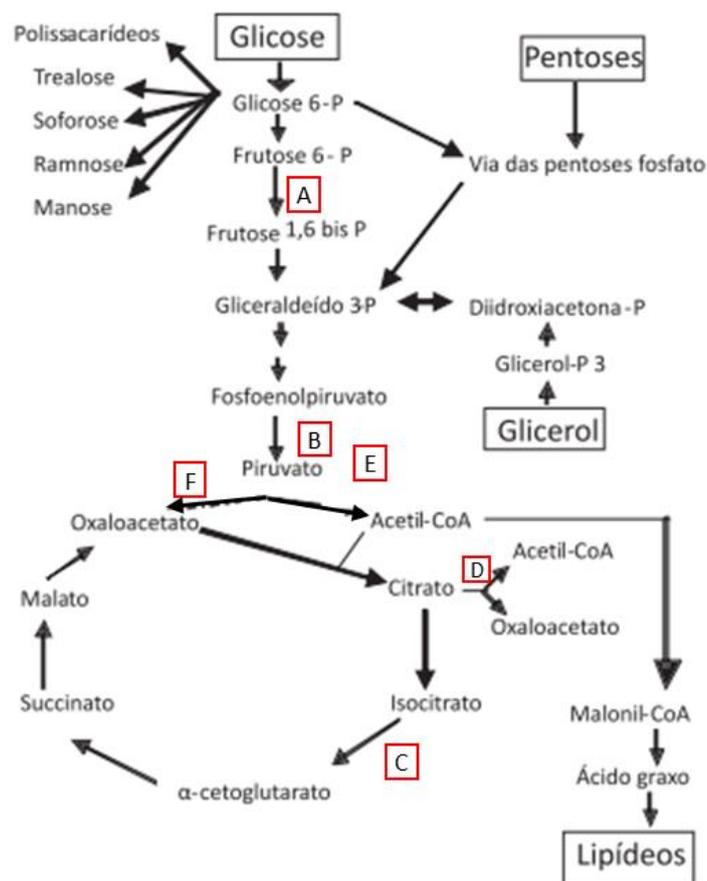
2.2.4.2 Principais parâmetros para a produção de BS

Desde o surgimento de estudos sobre BS, as pesquisas para sua produção estavam focadas principalmente na fermentação submersa (FS) e constataram que a produção de BS pode ser espontânea ou induzida. A indução pode ocorrer por exemplo pela presença de fontes de carbono apolares (lipídeos como óleos, gorduras e hidrocarbonetos) ou provocando condições de estresse ao microrganismo, como por exemplo baixas concentrações de nitrogênio, variações no pH, temperatura, velocidade de agitação ou aeração (DESAI; BANAT, 1997; SANTOS *et al.*, 2016; YAZID *et al.*, 2017).

A fonte de carbono representa um papel importante no crescimento do microrganismo e produção de BS e irá variar de espécie para espécie. As fontes de carbono mais utilizadas são a glicose e o óleo de soja (SANTOS *et al.*, 2016), todavia, cada microrganismo tem a capacidade de metabolizar diferentes tipos de substrato. Além disso, diferentes fontes de carbono podem levar ao desvio da via metabólica para diferentes produtos (DESAI; BANAT, 1997). O substrato também será responsável pela estrutura da molécula de BS, se a fonte de carbono é alterada, uma molécula diferente de BS pode ser produzida pelo mesmo microrganismo. Geralmente, substratos polares são inicialmente utilizados para o metabolismo celular e síntese da fração polar do BS, enquanto que substratos apolares são utilizados para a produção da cauda lipofílica do BS (SANTOS *et al.*, 2016).

Diversas vias metabólicas estão envolvidas na síntese de precursores dos BS e serão alteradas dependendo da fonte de carbono principal utilizada (Figuras 11 e 12). Por exemplo, quando carboidratos são a única fonte de carbono para produção de um glicolípídeo, parte do substrato será degradada na via glicolítica a glicose-6-fosfato, um dos principais precursores da fração polar do BS. Outra parte será transformada na via glicolítica em piruvato e posteriormente convertido a acetil-CoA, que será desviado para a lipogênese para futura formação da fração apolar (DESAI; BANAT, 1997; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; SANTOS *et al.*, 2016).

Figura 11 - Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de BS a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: (A) fosfofrutoquinase; (B) Piruvato quinase; (C) isocitrato desidrogenase; (D) citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos). (E) piruvato desidrogenase; (F) piruvato carboxil

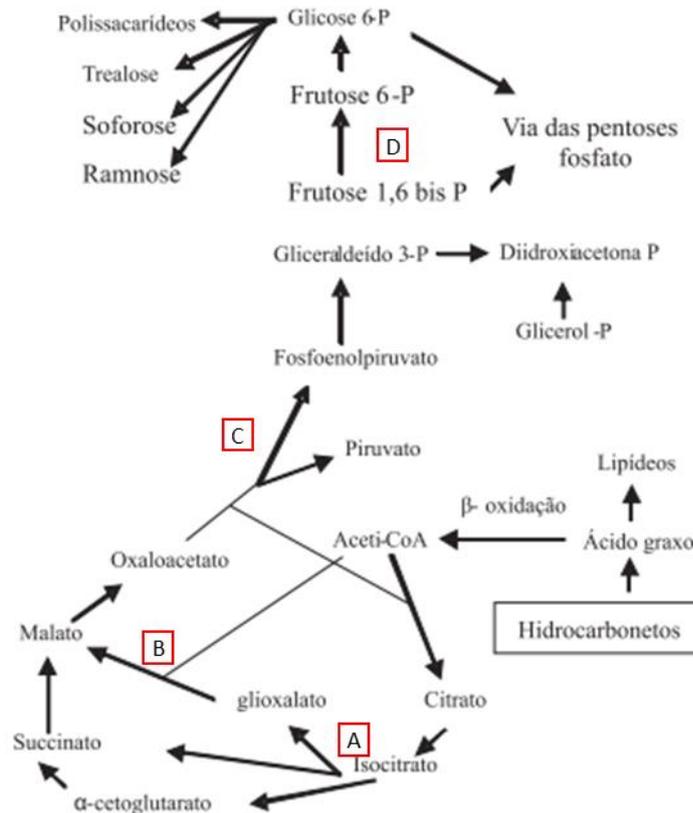


Fonte: Fontes, Amaral e Coelho (2008)

Por outro lado, quando um hidrocarboneto é a única fonte de carbono, ele será utilizado tanto para a produção da fração polar quanto apolar. O hidrocarboneto passará pela via lipolítica e será transformado em acetil-CoA. O acetil-CoA pode seguir para o ciclo de

Krebs e depois para a gliconeogênese para formar a fração polar ou pode ser utilizado na lipogênese para a formação da fração apolar (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Figura 12 - Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de BS a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves: (A) isocitrato liase; (B) malato sintase; (C) fosfoenolpiruvato carboxilase; (D) frutose-1,6 bifosfatase.



Fonte: Fontes, Amaral e Coelho (2008)

O segundo macronutriente mais importante na produção de BS é o nitrogênio, uma vez que nos processos fermentativos a razão C/N afeta diretamente a produção de metabólitos. Baixas concentrações de nitrogênio limitam o crescimento e direcionam o metabolismo da célula para a produção de alguns metabólitos, já altas concentrações de nitrogênio favorecem o crescimento e limitam a formação de produtos. Na biossíntese de BS, com a redução da quantidade da fonte de nitrogênio ocorre a diminuição da atividade da enzima isocitrato desidrogenase, pois, esta é dependente dos cofatores NAD^+ e NADP^+ . Esta enzima tem grande importância no ciclo de Krebs pois oxida isocitrato a α -cetoglutarato. Com a atividade da enzima reduzida, começa a ocorrer o acúmulo de citrato e isocitrato na mitocôndria e o excesso destas moléculas será transportado para o citoplasma. O citrato então será hidrolisado pela enzima citrato-liase em acetil-coA (principal metabólito precursor da síntese de ácidos graxos), que seguirá para a lipogênese. Dessa forma, o

metabolismo é desviado do crescimento microbiano para a produção de BS (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; KULAKOVSKAYA, E.; KULAKOVSKAYA, T., 2014).

Diversos tipos de compostos nitrogenados podem ser utilizados para a produção de BS, como ureia, peptona, extrato de levedura (fonte de nitrogênio mais comumente utilizada), sulfato de amônio e nitrato de amônio. No entanto, muitos pesquisadores utilizam uma mistura de diferentes fontes de nitrogênio (orgânicas e inorgânicas) para favorecer maior produção de BS (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

A produtividade de uma fermentação aeróbia, todavia, é frequentemente limitada pela disponibilidade de O₂ presente no biorreator. Alta aeração e agitação normalmente são empregadas em fermentações para promover maior transferência de O₂ entre as bolhas de ar no meio e o microrganismo. Contudo, estas táticas não são tão eficientes na produção de biopolímeros viscosos, como a goma xantana, ou de BS. Como os BS são potentes tensoativos, a aeração e a agitação no reator proporcionarão a formação de espuma. Além disso a alta agitação pode promover a ruptura celular de organismos mais sensíveis como fungos filamentosos e actinomicetos (bactérias filamentosas) (CHAYABUTRA; WU; JU, 2001).

2.2.4.3 Principais desafios na produção de BS

Diversas estratégias são buscadas para reduzir o custo de produção de BS. Há técnicas com ênfase nos microrganismos, como a escolha daqueles capazes de produzir grandes quantidades de BS ou a utilização da engenharia genética para aumentar a produção. A redução no custo de produção também pode ocorrer no tipo de matéria-prima utilizada, como a utilização de subprodutos agroindustriais. Além disso, pode ser realizado o aproveitamento dos coprodutos, no mesmo ou em outro processo produtivo. Outra saída interessante é a coprodução de BS e outro bioproduto economicamente importante como, por exemplo, enzimas, pigmentos ou polímeros. A coprodução reduz os custos, pois no mesmo processo é possível produzir na etapa *upstream* dois ou mais produtos de interesse, o que pode aumentar a competitividade econômica dos BS (SANTOS *et al.*, 2016; BRUMANO, 2017a; SINGH; PATIL; RALE, 2018).

Outro fator que aumenta os custos de produção de BS é a etapa *downstream*. A recuperação deste bioproduto depende principalmente de sua carga iônica, solubilidade em água e localização (intracelular, extracelular ou ligado a célula). A maior parte dos processos utiliza solventes orgânicos para a recuperação deste produto como misturas clorofórmio-metanol e diclorometano etanol, pentano, acetato de etila e hexano. A desvantagem da utilização de solventes orgânicos é a grande quantidade de solvente necessária e o alto custo destes reagentes. Além disso, alguns solventes, como o clorofórmio, são tóxicos para humanos e meio ambiente. Desta forma, existe a necessidade de solventes baratos e de baixa toxicidade para a extração de BS. Alguns tipos de BS podem ser recuperados por precipitação ácida ou com sulfato de amônio (KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2015; SANTOS *et al.*, 2016).

A formação de espuma na produção de BS em condições aeróbias é um grande desafio a ser superado, pois eleva os custos de produção, uma vez que promove a perda de nutrientes, células e produto. Dessa forma, várias técnicas são estudadas para reduzir este problema, como a adição de antiespumantes químicos, que costumam ser a base de silicone, polietileno glicol ou polipropileno. No entanto, a utilização destes químicos pode afetar a qualidade final do produto, pois, dificultam o processo de recuperação e purificação do metabólito. Uma alternativa é o controle mecânico da espuma, pelo uso de quebradores mecânicos de espuma ou pela utilização do volume de trabalho ocupando apenas 40 % da capacidade do reator, dessa forma, há espaço suficiente para a formação de espuma sem que ela ultrapasse o volume do reator e entre no sistema de aeração. No entanto, uma forma eficiente e barata de evitar completamente a formação de espuma é o uso da FES (CHAYABUTRA; WU; JU, 2001; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES pode ser definida como o processo de crescimento de um microrganismo sobre um substrato sólido, sem ou com a mínima presença de água livre, ou seja, a água presente forma uma fina camada aderida a superfície das partículas sólidas (PANDEY, 2003; PINTO *et al.*, 2005). Deste modo, a água retida na matriz sólida deve ser suficiente para o crescimento e metabolismo do organismo, no entanto, ela não pode ultrapassar a capacidade máxima de retenção dessa matriz (MUSO-CACHUMBA, 2017).

A FES é reconhecida como o primeiro tipo de técnica fermentativa utilizada pela humanidade, empregada principalmente na produção de pães e queijos no ocidente e *koji* no Oriente. No entanto, este tipo de fermentação foi deixado de lado por muitos anos no Ocidente para a produção de novas biomoléculas, principalmente após o desenvolvimento da penicilina, que impulsionou o uso da técnica de fermentação submersa (FS). Posteriormente, na década de 1960, o estudo de micotoxinas levou a um pequeno aumento no interesse pela FES. A área biotecnológica que acelerou o uso desta técnica por pesquisadores pelo mundo todo, foi a produção de ração animal com enriquecimento protéico (PANDEY, 2003; SOCCOL *et al.*, 2017).

A maior parte dos trabalhos publicados recentemente com foco em FES estão relacionados à produção de enzimas, principalmente celulasas e xilanases (SOCCOL *et al.*, 2017). Não obstante, esta técnica também tem se mostrado muito promissora em diversos outros bioprocessos como a produção de ácidos orgânicos, antibióticos e micotoxinas. Na área de BS, por exemplo, há uma vantagem extremamente importante da FES em relação à FS: a FES elimina a formação de espuma, um dos maiores problemas na produção de BS em reatores (PANDEY *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2005; JIMÉNEZ-PEÑALVER *et al.*, 2018).

Em geral, considera-se como as principais vantagens da FES sobre a FS a possibilidade da utilização direta de subprodutos agroindustriais como substrato e a redução da possibilidade do microrganismo de sofrer inibição por substrato (DURAND, 2003; ASHOK *et al.*, 2017; SOCCOL *et al.*, 2017).

Muitos autores afirmam que a FES é mais eficiente que a FS, visto que, possivelmente, os microrganismos se adaptam melhor às condições da FES, pois estas se assemelham mais ao seu habitat natural. Além disso, a baixa quantidade de água requerida na FES melhora transferência de O₂ e reduz os custos com recuperação, uma vez que gera produtos mais concentrados e menor volume de efluentes. Por fim, a FES requer o uso de menos energia do que a FS (PANDEY, 2003; KRISHNA, 2005; RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005).

Comparada à FS, a FES possui uma importante fase gasosa entre as partículas, devido a utilização de pouca água, que está relacionado com outro fator extremamente importante: a atividade de água (DURAND, 2003; ASHOK *et al.*, 2017; SOCCOL *et al.*, 2017).

A umidade relativa (relacionada com a atividade de água) do meio de cultivo é um dos parâmetros mais importantes na FES, visto que afeta consideravelmente a eficiência do

processo. O excesso de umidade pode provocar acúmulo de água no fermentador, o que dificulta a aeração, já a falta de umidade dificulta o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, a formação de produtos. Desta forma, o nível ideal de umidade, que dependerá do microrganismo e tipo de substrato utilizados, deve ser mantido durante o cultivo (NIGAM; PANDEY, 2009; FARINAS, 2015).

A baixa atividade de água faz com que a escolha do microrganismo seja de extrema importância para o sucesso da FES. Fungos filamentosos são considerados como os melhores agentes fermentativos em FES, em seguida encontram-se as leveduras, pois também conseguem crescer em meios com baixa atividade de água. As bactérias, em geral, não conseguem se multiplicar tão bem em ambientes com baixa quantidade de água, conseqüentemente, o risco de contaminação por bactérias na FES se torna menor que na FS. No entanto, na literatura já foi relatado o uso de algumas espécies de bactérias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* e *Lactobacillus* sp e também bactérias filamentosas como *Streptomyces* sp em FES (PANDEY, 2003; SOCCOL *et al.*, 2017).

A seleção do substrato é outro passo fundamental na FES, uma vez que este funcionará como matriz sólida para a fixação do microrganismo e/ou como fonte de nutrientes. No entanto, muitas vezes o substrato não é capaz de fornecer todos os nutrientes necessários, como alguns fatores de crescimento e sais minerais, o que torna importante sua suplementação externa (PANDEY *et al.*, 2000; FARINAS, 2015; JIMÉNEZ-PEÑALVER *et al.*, 2018).

Outro fator, o tamanho de partícula da matriz sólida, também é um aspecto de grande relevância. Partículas com dimensões muito pequenas proporcionam compactação do meio e, conseqüentemente, dificultam a aeração, já partículas de dimensões muito grandes diminuem a superfície de contato do substrato, dificultando a adesão e o acesso do microrganismo aos nutrientes (PANDEY *et al.*, 2000; BRUMANO, 2017a). Por último, a aeração, que além de ser responsável pela transferência de O₂ e remoção do dióxido de carbono (CO₂) gerado, regula os níveis de umidade e temperatura do meio, altas aerações podem reduzir muito a umidade no fermentador, por outro lado, a falta dela leva a insuficiência de O₂ (FARINAS, 2015).

Todos estes parâmetros podem provocar problemas de engenharia para o aumento de escala laboratorial para industrial como os gradientes temperatura, pH, O₂, substrato e de umidade, devido à falta de circulação de uma fase aquosa que torne o sistema homogêneo,

uma vez que esta é substituída por uma fase gasosa entre as partículas (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). A temperatura, por exemplo, é uma variável muito importante nas fermentações, porque influencia a formação de produto e a atividade enzimática. A temperatura é afetada devido ao ar possuir baixa condutividade térmica quando comparado à água, dificultando assim a troca de calor dentro do reator (FARINAS, 2015; SOCCOL *et al.*, 2017).

2.3.1 *Reatores para FES*

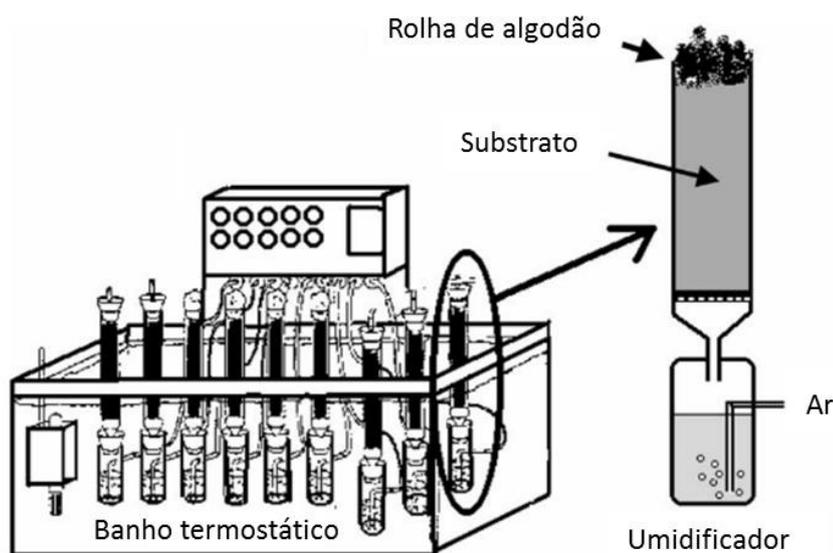
Atualmente os reatores utilizados na FES podem ser classificados baseados no sistema de mistura utilizado: reatores estáticos como leito fixo e bandejas perfuradas ou agitado como tambores horizontais ou tambores agitados. Também podem ser classificados quanto a presença ou ausência de aeração forçada e emprego de sistemas de mistura. Cada tipo de reator possui vantagens e desvantagens, porém, deve ser escolhido com base na matriz sólida e os microrganismos utilizados, visto que, alguns tipos de fungos filamentosos, por exemplo, terão suas hifas rompidas em caso de agitação. Além disso, é importante ressaltar que diversos tipos de reatores terão sucesso em escala laboratorial, visto que é utilizada pouca quantidade de meio sólido, todavia, o aumento de escala do processo é mais complexo, principalmente devido à grande quantidade de calor gerado e à heterogeneidade do sistema (DURAND, 2003; SOCCOL *et al.*, 2017).

Diversos tipos de reatores estáticos podem ser utilizados, de escala laboratorial a industrial e sua principal característica é a ausência de agitação, como exemplo há frascos Erlenmeyers, colunas, pequenas bandejas perfuradas, placas de Petri e diversos outros tipos de frascos. Estes tipos de reatores possibilitam simplicidade e o trabalho com pequenos volumes. Os frascos Erlenmeyers são muito utilizados para estudos iniciais em laboratórios e em condições de otimização de processo. Estes frascos são fechados com rolhas de algodão, que possibilitam a troca gasosa por difusão (não há aeração forçada), suas principais vantagens são: a facilidade de manipulação, baixo custo e a possibilidade de realização de vários testes simultaneamente (DURAND, 2003; SOCCOL *et al.*, 2017).

As colunas, também chamadas de reatores de leito fixo ou empacotado, são um sistema fechado com aeração forçada e preenchidas com o suporte ou substrato (Figura 13).

Estas colunas são mantidas em um banho termostático para controle da temperatura e não é possível realizar mistura do meio durante a fermentação. A aeração é realizada com ar saturado para a manutenção da umidade e possibilita a saída de CO₂ do sistema e o controle do consumo de O₂ pelo microrganismo. O uso de reatores de coluna reduz o gradiente de temperatura, devido a convecção causada pela passagem de ar. No entanto, esta configuração só foi considerada eficiente em escala laboratorial, pois a redução da porosidade do meio sólido ao longo da fermentação dificulta a transferência de O₂ para os microrganismos. Por fim, o uso de frascos e colunas não permite a retirada de amostras durante a fermentação, sendo então necessário o sacrifício de um frasco ou coluna para amostragem (DURAND, 2003; FARINAS, 2015; SOCCOL *et al.*, 2017).

Figura 13 - Reator de coluna de escala laboratorial. No lado esquerdo diversas colunas em banho termostático para controle da temperatura. No lado direito ampliação de uma das colunas.



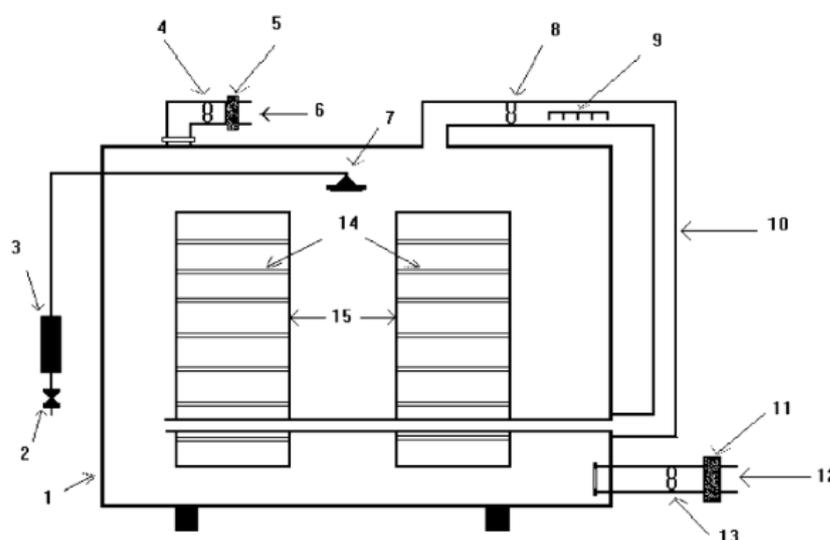
Fonte: Adaptado de Durand, 2003.

Uma variação dos reatores de coluna são os reatores de coluna segmentada. Esta configuração permite a criação de subsistemas, uma vez que a coluna é dividida em módulos, o que simplifica o controle e manutenção do processo (DA CUNHA *et al.* 2009). Além disso, facilita-se a introdução e retirada da matriz sólida do reator, também pode facilitar a compactação ou não compactação dependendo da necessidade do processo.

Reatores de bandeja são sistemas simples nos quais o substrato é colocado em camadas finas de 5 a 15 cm em bandejas de madeira, plástico ou aço inox (Figura 14). Estas bandejas são perfuradas e posicionadas, com espaço entre elas para facilitar a convecção do

ar, em estufas com temperatura e umidade controladas. É um método de fácil aumento de escala, todavia, requer muito espaço e enfrenta problemas de contaminação em processos não estéreis. Além disso, no cultivo de fungos filamentosos, o crescimento dos micélios pode reduzir bastante a porosidade da camada de substrato, dificultando transferência de O_2 . A falta de aeração forçada leva à permanência de CO_2 no sistema e à gradientes de O_2 (FARINAS, 2015; SOCCOL *et al.*, 2017).

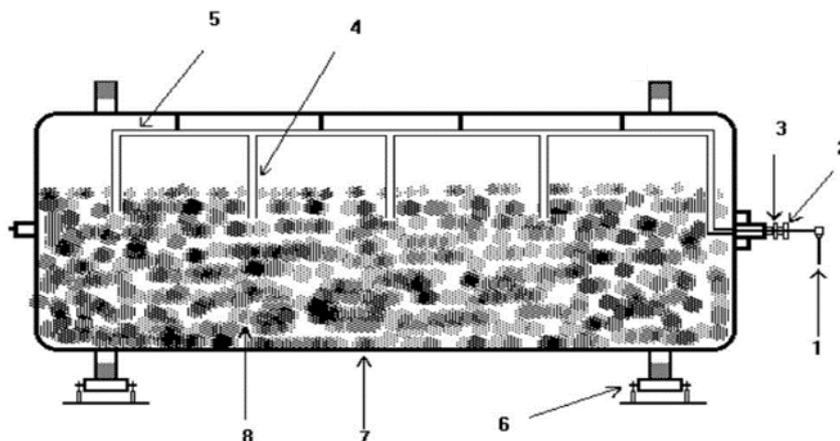
Figura 14 - Reator de bandeja do tipo Koji (1) Câmara, (2) válvula de água, (3) tubo com luz ultravioleta, (4, 8, 13) sopradores de ar, (5, 11) filtros de ar, (6) saída de ar, (7) humidificador, (9) Aquecedor, (10) recirculação de ar, (12) entrada de ar, (14) bandejas e (15) suportes das bandejas.



Fonte: Adaptado de Durand, 2003.

Reatores de tambor rotativo (Figura 15) ou horizontais com pás de agitação são considerados reatores agitados. Esta configuração envolve o uso de cilindros horizontais que podem possuir chicanas para ajudar na mistura do meio. A agitação pode ser contínua ou esporádica e é realizada pelo giro do cilindro, deste modo, espera-se maior homogeneidade do meio sólido e melhor transferência de O_2 para o microrganismo. No entanto, a rotação do cilindro dificulta o uso de camisas nos reatores, o que pode dificultar ainda mais o aumento de escala. A agitação no tambor não é tão eficiente como o uso de pás, porém é menos vigorosa e pode evitar o rompimento de estruturas como micélios, todavia, sua continuidade, pode modificar a estrutura do meio sólido, transformando-o em uma textura pastosa que dificulta a transferência de O_2 (DURAND, 2003; SOCCOL *et al.*, 2017).

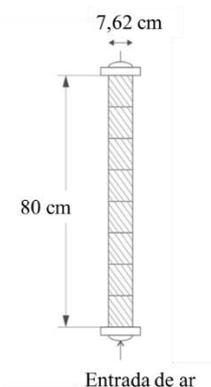
Figura 15 - Reator de tambor rotativo (1) entrada de ar, (2) eixo de rotação, (3) engate (4) bicos de ar, (5) linha de ar, (6) rolamentos, (7) tambor rotativo e (8) meio sólido.



Fonte: Adaptado de Durand, 2003.

Perez *et al.* (2019) utilizaram reatores de coluna segmentada de leito fixo (Figura 16) para a produção de celulases e xilanases pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b com uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato. Os reatores possuíam módulos com 7,62 cm de diâmetro interno e 10 cm de altura, cada um preenchido com 45 g de material, e o ar foi inserido no sistema pela base do reator. Como no presente trabalho também é utilizado bagaço de cana como matriz sólida, foi adotada uma configuração similar de reator (tópico 4.4.4).

Figura 16 - Reator de coluna de leito fixo segmentado



Fonte: Adaptado de Perez *et al.*, 2019.

Por fim, é importante ressaltar que os substratos para FES são, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria. Desta forma, observa-se as características da FES além de proporcionarem vantagens econômicas sobre a FS, também levam um processo sustentável (PANDEY *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2005).

2.4 Subprodutos agroindustriais

Subprodutos agroindustriais são materiais sólidos ou líquidos gerados do consumo direto de produtos primários e que não são mais úteis no processo que os gerou. Atualmente, a disposição destes materiais ainda é um grande problema, pois normalmente são mal gerenciados e seu tratamento ou disposição final podem levar a sérios impactos no meio ambiente. A incineração é um método custoso e gera poluição do ar, já a disposição em aterros sanitários pode levar a contaminação de lençóis freáticos e formação de metano, um gás inflamável. Entretanto, os subprodutos agroindustriais são ricos em açúcares, minerais e alguns até em proteínas e, por isso, são bons candidatos a substrato para cultivos orgânicos na produção de diferentes bioprodutos. Deste modo, a exploração correta destes subprodutos pode gerar produtos de interesse econômico ou social, tornando-se uma estratégia para resolver sua disposição (GUTIERREZ-MACIAS *et al.*, 2017; YAZID *et al.*, 2017).

Diversos tipos de subprodutos podem ser utilizados como matérias-primas em processos fermentativos, todavia, as pesquisas mais recentes têm focado no uso de resíduos de *commodities*, uma vez que são produzidos em grandes quantidades por todo o mundo. Estes subprodutos normalmente são de origem lignocelulósica, ricos em celulose, hemicelulose e lignina, como o sabugo de milho, a palha de milho, de trigo e de arroz e o bagaço de cana-de-açúcar (FARINAS, 2015; GUTIERREZ-MACIAS *et al.*, 2017; SOCCOL *et al.*, 2017).

A síntese de bioprodutos a partir de subprodutos agrícolas e agroindustriais pode ser realizada por processos fermentativos, com hidrólises para obtenção de açúcares fermentescíveis ou diretamente por FES (FARINAS, 2015; GUTIERREZ-MACIAS *et al.*, 2017). Dessa forma, a FES abre espaço para utilização direta de subprodutos agroindustriais, que anteriormente seriam subutilizados ou tratados como resíduos.

Esta linha de pesquisa é de fundamental importância para países em desenvolvimento como o Brasil, dado que a disposição de resíduos da agroindústria brasileira é um ponto de preocupação ambiental. Em alguns casos estes resíduos são utilizados para gerar energia, em outros são apenas queimados ou abandonados no campo. Ao transformar estes resíduos em *commodities* ou produtos de alto valor agregado, não só há contribuição ambiental, mas também para a economia do país (PANDEY, 2003; PINTO *et al.*, 2005; FARINAS, 2015; SOCCOL *et al.*, 2017). Assim, o uso de biomassa como fonte renovável de matéria-prima

para produção de energia, insumos químicos, bioprodutos como polímeros, enzimas, pigmentos, ácidos orgânicos e outros produtos industriais tem crescido nas últimas décadas (FARINAS, 2015; GUTIERREZ-MACIAS *et al.*, 2017).

2.4.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea tropical perene originária do sul e sudeste da Ásia, que foi introduzida no Brasil no século XVI, e seu cultivo foi muito importante no período colonial brasileiro, devido à produção de açúcar. No entanto, a maior expansão desta cultura aconteceu na década de 1980 durante o projeto Proálcool (SOUZA, 2007; BARROS, 2008).

Por ano são produzidos mais de 1,8 bilhões de toneladas de cana de açúcar no mundo e o Brasil é um dos maiores produtores. Estimava-se que seriam colhidas 635,51 milhões de toneladas de cana de açúcar na safra 2018/19 (CONAB, 2018), que serão utilizadas principalmente na produção de açúcar e etanol anidro. Nas usinas sucroalcooleiras, após a prensagem da cana para a extração do caldo, é gerado o bagaço como um dos principais subprodutos. Estima-se que para cada tonelada processada de cana-de-açúcar são gerados 125 kg de bagaço seco, que normalmente é queimado nas usinas para produção de energia. No entanto, ainda assim há excedente e, desta forma, é necessário buscar novas alternativas para a disposição deste subproduto (ANTUNES *et al.*, 2018; CANILHA *et al.*, 2010; CONAB, 2018).

O bagaço de cana-de-açúcar é uma biomassa composta por celulose, hemicelulose e lignina e a proporção destes componentes pode variar dependendo das condições edafoclimáticas. Além disso, no bagaço também são encontradas substâncias como proteínas, óleos e minerais em menores proporções, sendo comumente denominados como extrativos e cinzas (ERNESTO, 2009; ANTUNES *et al.*, 2018).

A celulose, um dos compostos mais presentes nas paredes celulares de plantas, é um homopolissacarídeo (constituído apenas por moléculas de glicose) fibroso e hidrofóbico que possui uma estrutura linear de unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -(1-4). Os grupos hidroxila (OH) presentes nas moléculas formam ligações de hidrogênio provocando interações intra e intermoleculares. Estas interações dão à celulose seu formato organizado em algumas regiões, chamadas de regiões cristalinas, já as regiões que possuem

baixa organização, são denominadas regiões não cristalinas (LORENCINI, 2013; ANTUNES *et al.*, 2018).

A hemicelulose possui cadeias menores e ramificadas e é um polímero também presente em grande porcentagem nas paredes celulares de plantas. É um heteropolímero formado majoritariamente por pentoses (xilose e arabinose) e em menor proporção por diferentes hexoses (glicose, manose e galactose). Esta fração possui uma estrutura totalmente amorfa, e, por isso, é menos resistente a ataque de agentes químicos (NELSON; COX, 2014; MARABEZI, 2009).

A lignina, uma macromolécula polifenólica, sendo considerada um composto heterogêneo e de alto peso molecular, é responsável por garantir a coesão entre as fibras, atuando como um agente cimentante e, desta forma, assegurando o suporte mecânico das plantas. Além disso, é altamente insolúvel e recalcitrante, também é responsável por proteger a planta contra o ataque de microrganismos e fotodegradação (NELSON; COX, 2014; MARABEZI, 2009; FASANELLA, 2008).

A celulose pode ser degradada por alguns microrganismos, liberando monossacarídeos fermentescíveis (glicose), utilizados como fonte de carbono. A hemicelulose também pode ser degradada em açúcares fermentescíveis (xilose e arabinose), porém uma menor quantidade de microrganismos é capaz de fermentar estas pentoses. No entanto, apenas poucas espécies, principalmente de fungos, conseguem degradar a lignina. Deste modo, a utilização de um pré-tratamento alcalino no processo auxilia na deslignificação e aumenta a disponibilidade dos açúcares presentes na biomassa, acelerando a produção de diversos bioprodutos por microrganismos (GUTIERREZ-MACIAS *et al.*, 2017).

2.4.2 Pré-tratamento alcalino

Diversos tipos de pré-tratamento são conhecidos para separar as diferentes frações da biomassa, como pré-tratamento com ácido concentrado, com ácido diluído, alcalino, com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), explosão a vapor e explosão de fibras com amônia (AFEX), seus efeitos podem ser observados na Tabela 1. O pré-tratamento da biomassa pode

modificar a estrutura do material, levar à quebra da lignina e desorganizar as micro e microfibrilas de celulose (SAHA, 2003; TERÁN-HILARES *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Alguns tipos de pré-tratamento e seus efeitos sobre a biomassa

Pré-tratamento	Efeito
Ácido concentrado	Solubilização da hemicelulose e precipitação da lignina. Forma compostos tóxicos inibidores do crescimento microbiano
Ácido diluído	Solubiliza a hemicelulose. Evita reações secundárias (não forma tantos compostos inibidores do crescimento microbiano).
Alcalino	Diminui o grau de polimerização e a cristalinidade. Separa as ligações estruturais entre a lignina e celulose/hemicelulose. Quebra a estrutura da lignina presente na biomassa. Causa a deslignificação.
Com H ₂ O ₂	A lignina é degradada pela enzima peroxidase na presença de H ₂ O ₂ . Em muitos casos, não é oxidante-seletivo e, portanto, existem perdas de hemicelulose e celulose.
Explosão a vapor	Promove a hidrólise da hemicelulose e produz inibidores como furfural e compostos fenólicos solúveis.
AFEX	A estrutura do material é alterada, permitindo que os polímeros possam ser mais facilmente degradados por enzimas hidrolíticas.

Fonte: Adaptado de Medina, 2013 e Antunes, 2015.

Geralmente o pré-tratamento alcalino é mais eficiente em biomassas com alto teor de lignina e é muitas vezes preferido por causar menor degradação dos carboidratos quando comparado ao pré-tratamento ácido. Assim, é considerado um método promissor, uma vez que altera as propriedades estruturais do material removendo a camada protetora (lignina), dessa forma, facilitando o acesso de enzimas a biomassa. Esta técnica normalmente solubiliza a lignina e uma pequena porcentagem da hemicelulose, além disso, causa a abertura dos poros do material, o que facilita a entrada das enzimas nas fibras (IBRAHIM *et al.*, 2011; PANDEY *et al.*, 2015; TERÁN-HILARES *et al.*, 2016).

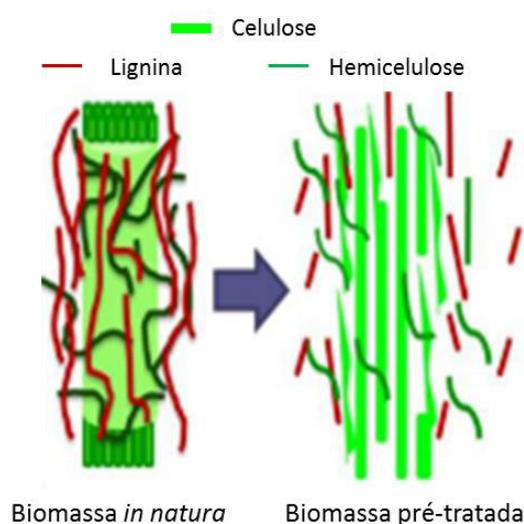
Os pré-tratamentos alcalinos mais comuns envolvem o uso de hidróxido de sódio (NaOH) ou de cálcio (Ca(OH)₂) e durante este tipo de pré-tratamento, a biomassa lignocelulósica sofre duas reações: solvatação e saponificação. Estas reações causam o inchamento da estrutura, que diminui o grau de polimerização da biomassa, tornando-a mais acessível a degradação por microrganismos ou enzimas (GALBE; ZACCHI, 2007; PANDEY *et al.*, 2015).

Este tipo de pré-tratamento pode ser conduzido a pressão e temperatura ambientes, porém sob ação de maiores temperaturas ou pressões retira rapidamente a lignina. Todavia, em condições muito drásticas, também serão removidas a celulose e hemicelulose (CANILHA *et al.*, 2012; PANDEY *et al.*, 2015).

O NaOH é muito utilizado no pré-tratamento químico de biomassa lignocelulósica, devido a sua capacidade de converter a lignina a frações solúveis. No entanto, o uso de altas concentrações (maiores que 0,25 g/g de biomassa) de NaOH pode não ser economicamente viável em grande escala, em virtude da difícil recuperação deste álcali (CANILHA *et al.*, 2012; PANDEY *et al.*, 2015).

Após o pré-tratamento alcalino, grande parte da lignina é removida e as fibras da biomassa encontram-se mais acessíveis (Figura 17) (IBRAHIM *et al.*, 2011). Dessa forma, microrganismos que produzem celulasas e xilanasas podem utilizar a biomassa pré-tratada como fonte de carbono (GALBE; ZACCHI, 2007).

Figura 17 - Biomassa antes e após pré-tratamento



Fonte: Adaptado de Terán-Hilares, 2017.

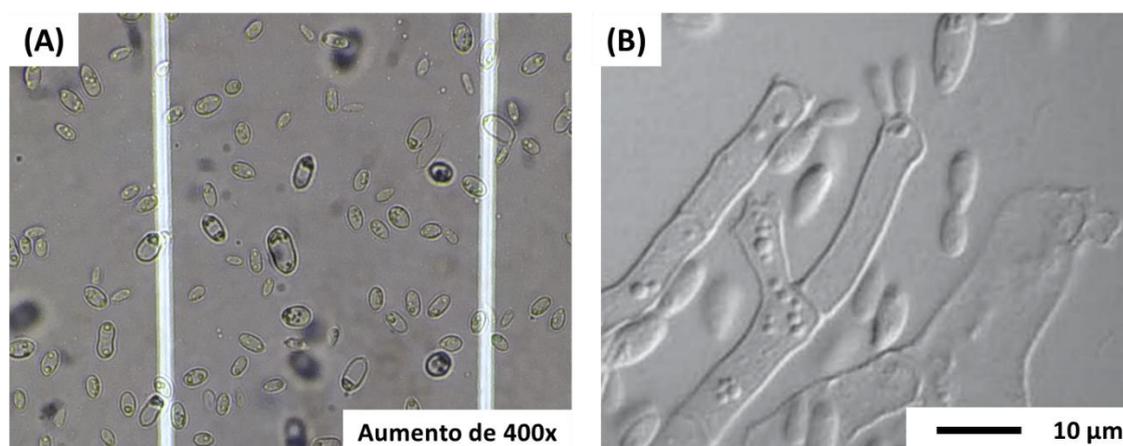
2.5 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans é um microrganismo oligotrófico comum disperso na maior parte do mundo, porém dificilmente identificado em regiões frias, pode ser detectado em ambientes como a filosfera (superfícies de plantas), banheiros e alimentos. Também pode

ser encontrado em ambientes muito estressantes como águas super-salinas, visto que algumas linhagens foram encontradas degradando superfícies de plásticos como policloreto de vinila e poliuretano (GOSTINČAR *et al.*, 2014). Por ter desenvolvido tolerância a diferentes condições ambientais, é considerado um organismo extremotolerante, podendo sobreviver em condições hipersalinas, ácidas, básicas, frias e oligotróficas. Além disso, *A. pullulans* é capaz de se adaptar a condições de baixa atividade de água (DESHPANDE; RALE; LYNCH, 1992; ZALAR *et al.*, 2008; GOSTINČAR *et al.*, 2014).

O gênero *Aureobasidium* é membro da ordem *Dothideales*, sendo *A. pullulans* a espécie mais estudada. Este microrganismo é um fungo polimórfico e, por isso, pode se apresentar na forma leveduriforme (Figura 18 (A)) ou filamentosa (Figura 18 (B)) de acordo com as condições nutricionais e ambientais em que se encontra. Suas hifas costumam ser finas, transparentes e translúcidas, formando micélios fortes e compactos. O crescimento das colônias começa em uma tonalidade amarelo-creme, se torna rosa e depois começam a surgir áreas mais escuras que se tonam enegrecidas, devido à produção de melanina. (DESHPANDE; RALE; LYNCH, 1992; CHI *et al.*, 2009).

Figura 18 - *A. pullulans* na forma de levedura (A) e na forma filamentosa (B)



Fonte: (A) Autoria própria e (B) Zalar *et al.* (2008)

Devido à capacidade de suas culturas de produzir melanina, *A. pullulans* é popularmente conhecido como levedura negra (*black yeast*) (CHI *et al.*, 2009). A melanina é um pigmento de alta massa molar de cor marrom escura ou preta que pode ser produzida por uma grande variedade de fungos. Este pigmento é conhecido por possuir um papel de protetor em diversas condições de estresse. Dessa forma, com a finalidade de diminuir o estresse ambiental, este organismo consegue mudar rapidamente de células leveduriformes

incolores para células com paredes grossas e contendo alto teor de melanina (ZALAR *et al.*, 2008; GOSTINČAR *et al.*, 2014).

A. pullulans é muito conhecido devido a sua capacidade de produzir o exopolissacarídeo pululana, um polímero que possui uma ampla gama de aplicações, variando desde ingredientes na produção de alimentos e uso em embalagens a aplicações na área médica e farmacêutica. Além disso, esta espécie pode ser utilizada no monitoramento e controle de poluentes no meio ambiente, uma vez que vive na superfície de plantas, qualquer alteração em sua ocorrência pode indicar perturbação no ambiente. Algumas linhagens, inclusive, foram utilizadas para controle ambiental de microrganismos não desejados. Além disso, já foi relatado o uso de *A. pullulans* para controle de derramamento de petróleo (DESHPANDE; RALE; LYNCH, 1992; CHI *et al.*, 2009; GOSTINČAR *et al.*, 2014).

É um microrganismo biotecnologicamente importante por ser produtor de exoenzimas de extremo interesse para as indústrias como celulases, amilases, lipases, fenol-oxidases e principalmente xilanases. Além disso, devido à capacidade de algumas linhagens em hidrolisar celulose, hemicelulose, amido e outras macromoléculas, podem ser utilizadas para a conversão direta de subprodutos agroindustriais em diversos bioprodutos por FES, dentre eles a produção de proteínas unicelulares (*single-cell protein*) (DESHPANDE; RALE; LYNCH, 1992; ZALAR *et al.*, 2008).

A beta-glucana produzida por *A. pullulans* recebeu o status GRAS da FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) em 2010. Além disso, esta espécie foi classificada como pertencente ao Grupo I pela Organização Mundial da Saúde, ou seja, não apresenta risco de infecção para quem lida com este microrganismo. Dessa forma, estas classificações facilitam que bioprodutos produzidos por *A. pullulans* sejam utilizados como aditivos em indústrias farmacêuticas e alimentícias (FDA, 2018; BRUMANO *et al.*, 2017b).

2.5.1 Produção de BS por *A. pullulans*

Nagata, Nakahara e Tabuchi (1993), ao analisarem a produção de poli(β -L-ácido málico) por *A. pullulans*, observaram a presença de óleos pesados. Posteriormente, Kurosawa *et al.* (1994) analisaram estas moléculas, também denominadas liamocina, e reportaram este microrganismo como produtor de BS. Manitchotpisit *et al.* (2011)

observaram que a máxima produção deste óleo ocorreu após 6 dias de cultivo e sugerem que esta molécula seja um metabólito secundário. Também foi constatado por Manitchotpisit *et al.* (2011) que este óleo estava presente tanto dentro quanto fora das células ao fim do cultivo.

Kurosawa *et al.* (1994) obtiveram uma estrutura parcial destes óleos pesados, sugerindo que seriam compostos por: 3,5-dihidrodecanoil e 5-hidroxi-2-decenoil ésteres de arabitol e manitol, sendo classificados como polióis lipídeos. A fração polar pode variar principalmente entre manitol, glicerol e arabitol e dependendo da fonte de carbono e linhagem de microrganismo utilizadas, também é possível encontrar a cabeça composta por xilitol, sorbitol, galactitol ou treitol. Alguns estudos mostram ainda que estes polióis lipídeos exercem efeito anti-proliferativo em células tumorais variando de acordo com a linhagem do microrganismo e tipo de célula utilizada (KUROSAWA *et al.*, 1994; MANITCHOTPISIT *et al.*, 2011; KIM; LEE; YUN, 2015; BRUMANO, 2017a).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho visou explorar a capacidade do fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* LB 83 de produzir BS a partir de FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

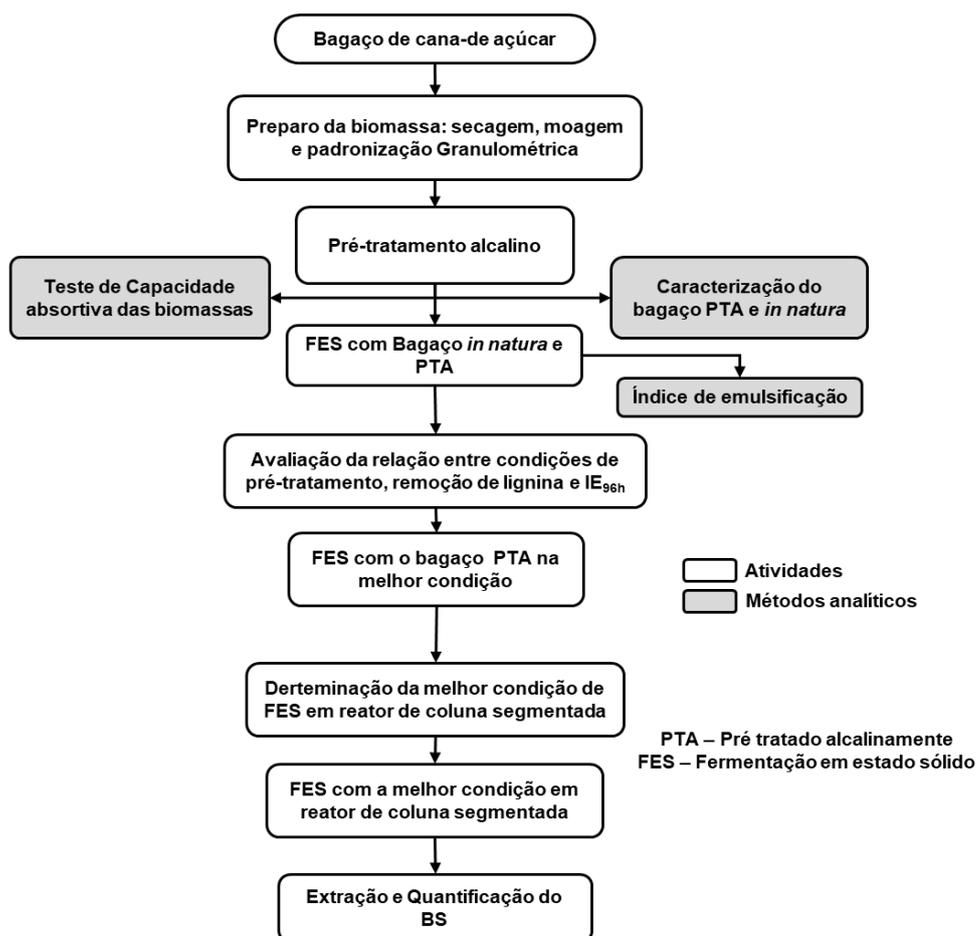
3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de BS pelo microrganismo *A. pullulans* por FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como substrato;
- Avaliar a produção de BS pelo microrganismo *A. pullulans* por FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em meio alcalino (PTA) como substrato;
- Determinar as melhores condições de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar a ser utilizado como matéria-prima para produção de BS por *A. pullulans* em FES;
- Avaliar a produção de BS por FES em reator de coluna segmentada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma das atividades desenvolvidas no presente trabalho está apresentado na Figura 19.

Figura 19 - Fluxograma das atividades desenvolvidas



Fonte: Autoria própria

4.1 Preparo das matérias primas

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina Costa Pinto (COSAN), localizada na cidade de Piracicaba – SP. O bagaço foi exposto ao sol para secagem e o teor de umidade foi determinado em balança de umidade com infravermelho.

4.2 Padronização granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi moído em moinho elétrico de facas (*Marconi – MA 680*, Piracicaba, Brasil). As frações obtidas foram posteriormente classificadas em peneira padrão Tyler de acordo a sua granulometria (BRUMANO, 2017a). A fração retida na peneira de 14 *mesh* foi utilizada nos experimentos.

4.3 Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar em autoclave

Os testes iniciais de pré-tratamento alcalino, empregando uma razão de 0,18 (g/g) de NaOH/bagaço, foram realizados em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 30 g de biomassa e 450 mL de solução de NaOH 0,3 mol/L em autoclave a 1 atm e 121 °C por 60 min.

Com a finalidade de determinar as condições mais favoráveis para remoção de lignina, foi realizado em uma etapa posterior um planejamento fatorial 2^2 com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central. Os fatores analisados foram razão NaOH/bagaço (g/g) e tempo em autoclave (Tabela 2). As respostas analisadas foram a remoção de lignina e o índice de emulsificação (IE_{96h}). Após o fim do pré-tratamento as biomassas foram lavadas com água até pH neutro. O material PTA foi caracterizado quimicamente conforme o item 4.5.1 e posteriormente utilizado nos experimento para a produção de BS de acordo com o item 4.4.3.

Tabela 2 - Níveis dos fatores Razão de NaOH/bagaço e Tempo de pré-tratamento em autoclave para o planejamento fatorial 2^2

Fator	Nível baixo (-1)	Nível alto (+1)
Razão NaOH/bagaço (g/g)	0,05	0,25
Tempo de pré-tratamento (min)	20	60

Fonte: Autoria própria

4.4 Fermentações

4.4.1 *Manutenção do microrganismo*

A cepa de *A. pullulans* LB83 utilizada neste trabalho foi isolada por Arcuri *et al.* (2014) de formigas da espécie *Atta sexdens rubropilosa* e, atualmente, encontra-se depositada na Central de Recursos Microbianos da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro, SP. Esta linhagem foi gentilmente cedida ao Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

A cepa do fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* LB83, foi mantida a 4 °C em placas de Petri com meio Ágar-Extrato de Levedura e Malte (YMA) (glicose 10 g/L, extrato de levedura 3 g/L, peptona 5 g/L, extrato de malte 3 g/L e ágar 20 g/L) sólido (BRUMANO, 2017a).

4.4.2 *Preparo do pré-inóculo*

Para o preparo do pré-inóculo, uma alçada do microrganismo foi transferida da placa de Petri com meio YMA para frascos Erlenmeyer de 125 mL com 40 mL de meio de cultivo proposto por Kitamoto *et al.* (1990) modificado por Manitchotpisit *et al.* (2011) (peptona 0,6 g/L, extrato de levedura 0,4 g/L, NaCl 1g/L, K₂HPO₄ 5g/L e MgSO₄ 0,4 g/L) com 50 g/L de sacarose. Os cultivos foram realizados em agitador rotatório (*New Brunswick Scientific – Excella E24*, Hamburgo, Alemanha) a 200 rpm, 28 °C e interrompidos após 48 h. As células foram separadas assepticamente por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos, ressuspensas em solução salina 0,9 % (m/V) e contadas em Câmara de Agasse-Lafont-R contendo retículos de 0,0025 mm² e profundidade de 0,100 mm, com a finalidade de ajustar a concentração celular inicial para 10⁸ células/mL (BRUMANO, 2017a).

4.4.3 FES em frascos Erlenmeyer

Com a finalidade de determinar o melhor substrato e o tempo ideal para a produção de BS, as FES foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 50 mL, contendo 2 g de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* ou PTA e com pH neutro. O bagaço utilizado foi caracterizado quimicamente quanto aos teores de lignina, hemicelulose, celulose, extrativos e cinzas.

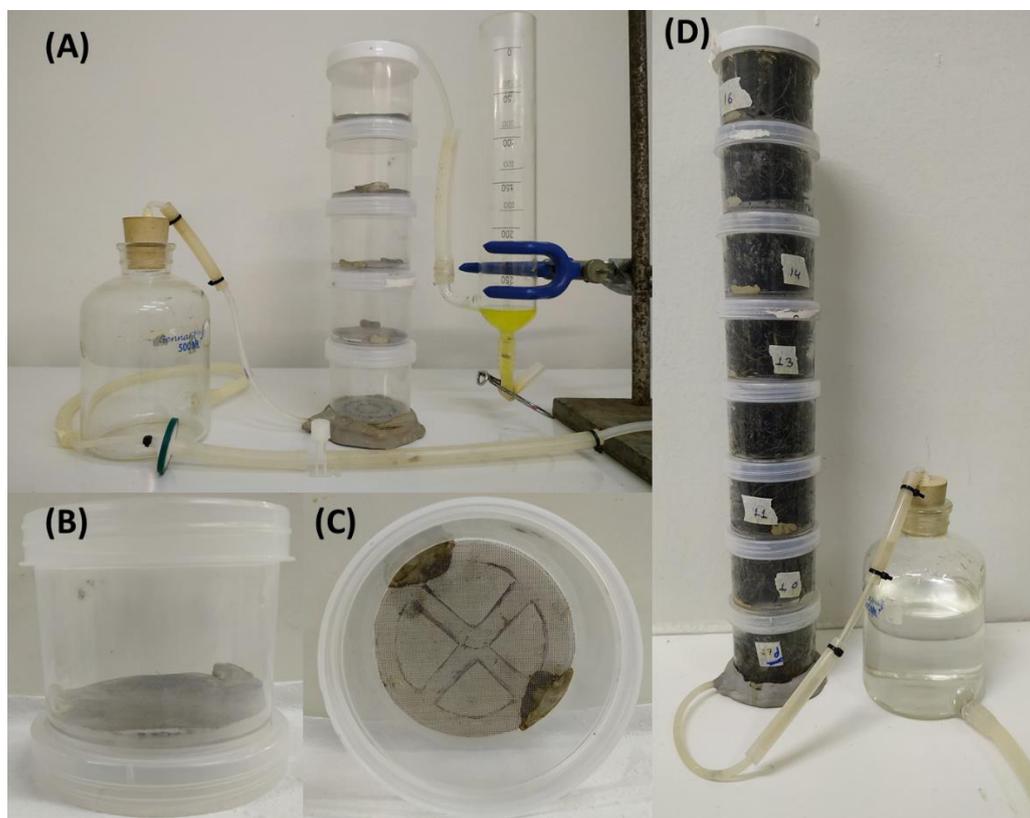
Os frascos Erlenmeyers contendo 2 g de bagaço *in natura* ou PTA foram esterilizados a 121 °C por 15 min, resfriados e inoculados com a solução umedecedora (meio Kitamoto modificado estéril contendo uma concentração celular de 10^8 células/mL) de acordo com o teste de capacidade absorviva (BRUMANO, 2017a).

Devido à dificuldade de se retirar uma amostra representativa e homogênea nesse tipo de cultivo, foram preparadas triplicatas para cada ponto a ser analisado, sendo cada frasco considerado uma amostra. Os frascos foram incubados em estufa microbiológica (*Quimis – Q316M4*, Diadema, Brasil) mantida a 28 ± 2 °C, sob umidade relativa de 80 % (mantida com auxílio de fibras têxteis) por um período de 14 dias (336 h), sendo que a cada 48 h foram retirados os três frascos para as análises. As amostras foram analisadas quanto às propriedades emulsificantes do BS produzido (BRUMANO, 2017a).

4.4.4 FES em reator de coluna segmentada

As fermentações foram realizadas em reatores de coluna segmentada de leito fixo com módulos de 5,2 cm de altura por 6,05 cm de diâmetro interno (Figura 20), com fundo vazado e uma tela de metal para evitar a compactação do bagaço. Cada módulo foi preenchido com 6 g de bagaço PTA em autoclave (nas condições 0 min (refere-se a esperar que a autoclave atinja 1 atm e desligá-la e esperar a queda de pressão) e 0,12 g/g de NaOH), os módulos foram encaixados e o reator completo esterilizado a 0,5 atm e 111 °C por 20 min e resfriados. Posteriormente cada módulo foi inoculado com 30 mL de solução umedecedora e o reator foi mantido em estufa microbiológica (*Quimis – Q316M4*, Diadema, Brasil) a 28 ± 2 °C, por um período de 4 dias, com incidência de luz da própria estufa.

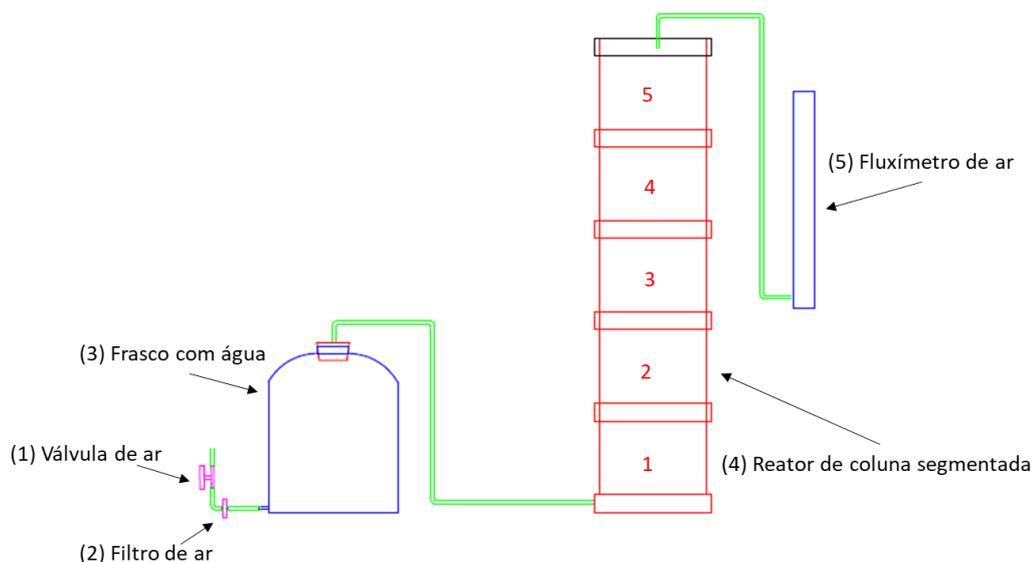
Figura 20 - Reator segmentado (A) sistema montado com 5 módulos desde a válvula de ar até o fluxímetro (explicado na Figura 21); (B) Vista lateral do módulo do reator; (C) vista superior do módulo e (D) Reator com 8 módulos após 96 h de fermentação.



Fonte: Autoria própria

Na Figura 21, pode ser observado um esquema do sistema completo de fermentação com cinco módulos. A ar passa por uma válvula (1), que controla sua vazão, em seguida, passa por um filtro microbiológico (2) para evitar contaminação do sistema. O ar filtrado segue para um frasco com água destilada autoclavada antes de sua entrada no reator a fim de aumentar sua umidade. Após ser umidificado, o ar entra pela base do reator de coluna segmentada e sua saída ocorre pelo topo, onde segue para o fluxímetro para medição da vazão.

Figura 21 - Sistema de fermentação em reator de coluna segmentada



Fonte: Autoria própria

Foi feito um planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central de acordo com a Tabela 3. A aeração é dada em velocidade superficial (*superficial velocity*), sendo esta a razão entre a vazão de ar e a seção transversal do reator (área). Para este reator as velocidades superficiais de 0,00213 e 0,00426 m/s significam vazões de 22,5 e 45 L/h, respectivamente. Como resposta analisou-se, em cada experimento, o IE_{96h} a partir da mistura de 1 mL de extrato bruto de cada módulo do reator.

Tabela 3 - Níveis dos fatores Número de módulos e Vazão de ar para o planejamento fatorial 2^2 em reator de coluna segmentada

Fator	Nível baixo (-1)	Ponto central	Nível alto (+1)
Número de módulos	2	5	8
Velocidade superficial de aeração (m/s)	0,00213	0,00319	0,00426

Fonte: Autoria própria

4.4.5 Extração do BS

O Extrato bruto da fermentação foi obtido com adição de 10 mL de água destilada a cada frasco de fermentação, os quais foram deixados sob agitação em agitador rotatório (*New Brunswick Scientific – Excella E24*, Hamburgo, Alemanha) a 200 rpm e 28 °C por 1 h. Na

sequência, separou-se a fração líquida do conteúdo do frasco por prensagem (BRUMANO, 2017a).

4.4.6 Recuperação do BS

Adicionou-se butanona na proporção 1:1 ao extrato bruto. A mistura foi agitada em agitador rotatório (*New Brunswick Scientific – Excella E24*, Hamburgo, Alemanha) a 200 rpm por 1 h e posteriormente centrifugada (Novatécnica – NT 810, Piracicaba, Brasil) por 10 min a 1610×g, sendo o BS extraído para a fase apolar. Em seguida, o excesso de solvente foi evaporado e a concentração de BS determinada por gravimetria (BRUMANO, 2017a).

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar e o resíduo sólido obtido após o pré-tratamento foram caracterizados quanto ao teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, segundo a metodologia descrita por Sluiter *et al.* (2011).

4.5.2 Determinação da capacidade adsorptiva do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e PTA

Visando testar o volume máximo de meio que o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e PTA podem reter como matriz sólida, foi realizada a determinação da capacidade adsorptiva. Em um béquer de 50 mL, foram pesados 2 g de bagaço com tamanho de partícula maior que 14 *mesh*. Posteriormente, foi acrescentada uma alíquota de 1 mL de meio Kitamoto modificado (peptona 0,6 g/L, extrato de levedura 0,4 g/L, NaCl 1g/L, K₂HPO₄ 5g/L e MgSO₄ 0,4 g/L) e homogeneizou-se o conteúdo do béquer. Repetiu-se o processo até o aparecimento de meio livre no sistema (BRUMANO, 2017a).

4.5.3 Determinação de açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a determinação das concentrações de açúcares e ácidos orgânicos presentes nas amostras foi realizada CLAE utilizando-se o cromatógrafo *Agilent Technology series A1100* (Palo Alto, Califórnia). As amostras foram previamente filtradas em filtro Sep-Pak C18 (Millipore) e analisadas utilizando-se as seguintes condições: coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração Agilent; fase móvel H₂SO₄ 0,01 eq/L e fluxo de 0,6 mL/min.

4.5.4 Determinação da concentração celular durante a fermentação

O extrato bruto da fermentação foi utilizado para a contagem das células em Câmara de Agasse-Lafont-R contendo retículos de 0,0025 mm² e profundidade de 0,100 mm (BRUMANO, 2017a).

4.5.5 Análise da atividade emulsificante

O extrato bruto da fermentação foi misturado em tubos de ensaio com tampa rosqueável com querosene na proporção de 1:1 e homogeneizados em agitador de tubos (Scientific Industries – Vortex Genie 2, Bohemia, Estados Unidos), em velocidade máxima, por 1,5 min. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura de 25 °C durante 216 h. Foram efetuadas medidas da altura da Camada Emulsificada (CE) e da Altura Total (AT) dos líquidos no tubo em intervalos regulares de 24 h, contadas a partir do momento da homogeneização. O IE foi obtido por meio da Equação 1 (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

$$IE = \frac{CE}{AT} \times 100 \quad (1)$$

4.5.6 *Análise da redução da tensão superficial*

A redução da tensão superficial da água foi analisada em Tensiômetro SensaDyne QC6000 (Arizona, Estados Unidos) com o extrato bruto da fermentação em frascos. O equipamento foi calibrado com água e etanol, a velocidade da bolha foi ajustada para aproximadamente 1,0 bolha/s e os ensaios foram realizados a 24 °C. Comparou-se as amostras ao longo da fermentação com a amostra de 0 h e a diferença resultou na redução da tensão superficial.

4.5.7 *Teste qualitativo para produção de celulasas e xilanases*

Para determinar se o microrganismo *A. Pullulans* produzia enzimas capazes de degradar a celulose ou hemicelulose, foram realizados testes em placas de acordo com a metodologia descrita por Kasana *et al.* (2008). As fontes de carbono utilizadas foram carboximetilcelulose e xilooligossacarídeos (XOS) para análise qualitativa de celulasas e xilanases, respectivamente. O índice enzimático foi calculado pela razão halo enzimático e halo de crescimento do microrganismo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977).

4.5.8 *Caracterização do BS obtido*

Uma amostra de BS foi recuperada conforme o item 4.4.7 e enviada para o grupo de pesquisa do Instituto de Microbiologia Aplicada na Universidade RTWH Aachen na Alemanha, aos cuidados do Dr. Till Tiso. A amostra foi dissolvida em butanona e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência em um cromatógrafo UltiMate3000 series seguindo a metodologia desenvolvida por Saur *et al.* (2019), do mesmo grupo de pesquisa.

4.5.9 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos nos experimentos dos planejamentos fatoriais foi realizada utilizando os softwares *Design-Expert 6.0.8 Portable* para a geração de um modelo matemático e *Statistica 7.0* para a geração da superfície de resposta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste qualitativo da produção de celulase e xilanases

O microrganismo *A. pullulans* LB 83 foi submetido a um teste qualitativo de produção de celulasas e xilanases, utilizando Xilooligosacarídeos (XOS) e carboximetilcelulose como fonte de carbono. Os índices enzimáticos em função do tempo de incubação são mostrados na Tabela 4. Valores maiores que 1 representam que o microrganismo é produtor das enzimas analisadas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977), desta forma, constata-se que este microrganismo produz tanto celulasas quanto xilanases e pode ser utilizado para fermentação em estado sólido.

Tabela 4 - Teste qualitativo de produção de celulasas e xilanases

Tempo (h)	Índice enzimático	
	XOS	Carboximetilcelulose
24	2,03 ± 0,04	2,05 ± 0,12
48	2,85 ± 0,58	2,01 ± 0,03
72	2,49 ± 0,03	2,36 ± 0,09

Fonte: Autoria própria

No estudo realizado por Leathers (1986) com *A. pullulans*, xilanases representaram quase 50 %, cerca de 0,3 g/L, da proteína extracelular total quantificada; no entanto, não foi observada a produção de celulasas. Dobberstein e Emeis (1989) reportaram a produção de β -xilanase por *A. pullulans*, sendo que a produção desta enzima foi fortemente induzida pela presença de xilana e compostos complexos contendo xilose.

Pou-Llinas e Driguez (1987), ao estudarem uma variedade de *A. pullulans* utilizando diferentes indutores, observaram que na presença de xilose há produção de β -xilanase e constataram atividade de β -glucosidase na presença de ácido glucorônico, independentemente da fonte de carbono utilizada.

Kudanga e Mwenje (2005) reportam que todas as linhagens de *A. pullulans* analisadas em seu trabalho demonstraram atividade para endo- e exoglucanases, sendo que a maior produção destas enzimas foi alcançada na presença de carboximetilcelulose.

Estes e outros estudos mostram que diferentes linhagens de *A. pullulans* podem ou não produzir celulases, no entanto em geral é relatado o grande potencial de produção de xilanases por este microrganismo (DESHPANDE; RALE; LYNCH, 1992).

5.2 Composição do Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e PTA

O bagaço de cana-de-açúcar é composto majoritariamente por celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas em diferentes quantidades. O bagaço utilizado no presente trabalho era composto por 42 % de celulose, 28,8 % de hemicelulose, 20,5 % de lignina, 4,8 % de cinzas e 4,4 % de extrativos. A composição do bagaço foi estudada por diversos autores (Tabela 5).

Tabela 5 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes trabalhos

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
38,4	23,2	25,0	Rabelo <i>et al.</i> (2011)
42,8	25,8	22,4	Gouveia <i>et al.</i> (2009)
45,0	25,8	19,1	Canilha <i>et al.</i> (2011)
41,1	22,7	31,4	Pitarelo (2007)
42,0	28,8	20,5	Presente trabalho

Fonte: Autoria própria

Verifica-se que em diferentes trabalhos da literatura a composição do bagaço encontra-se entre 38,4 e 45,0 % de celulose, 22,7 e 25,8 % de hemicelulose e 19,1 a 31,4 % de lignina. Esta variação pode ocorrer devido à diferentes variedades de cana utilizadas, idade de colheita da lavoura, condições de variadas regiões como umidade, solo, precipitação e irradiação solar e também pelos diferentes métodos analíticos utilizados para a determinação da composição da biomassa (OGEDA; PETRI, 2010; HAMES *et al.*, 2003). Desta forma, verifica-se que os valores obtidos no presente trabalho são coerentes, visto que estão próximos da faixa encontrada na literatura.

A utilização da biomassa lignocelulósica como matéria-prima permite a redução de custo em diversos processos, principalmente nos bioprocessos. Diante disso, foi observado que alguns microrganismos produzem enzimas capazes de degradar celulose e hemicelulose (KRISHNA, 2005). No entanto, a lignina dificulta o acesso dos microrganismos às fibras

celulósicas e hemicelulósicas, pois funciona como uma proteção. Conseqüentemente, se o microrganismo não produz enzimas lignolíticas, será difícil seu acesso aos açúcares presentes na biomassa. Este problema pode ser amenizado por meio de um pré-tratamento alcalino. O pré-tratamento utilizando NaOH permite a retirada da fração recalcitrante e incha as fibras do material lignocelulósico, possibilitando então o acesso do microrganismo às fibras de celulose e hemicelulose (PANDEY *et al.*, 2015). Em processos com alta temperatura e pressão geralmente é utilizada baixa concentração de NaOH (entre 0,1 e 1 mol/L). Desta forma, no presente trabalho utilizou-se um valor intermediário 0,3 mol/L.

A composição da biomassa após o pré-tratamento pode variar dependendo da massa de álcali utilizada, tipo de cultivo, tempo e temperatura utilizados. No presente trabalho o pré-tratamento alcalino foi realizado em autoclave a 121 °C por 60 min. Para cada 1g de bagaço foram utilizados 15 mL de Solução de NaOH 0,3 mol/L, ou seja, razão de 0,18 g de NaOH/g de bagaço. Este processo levou a remoção de 74,7 % de lignina.

Terán-Hilares *et al.* (2016) ao realizarem o pré-tratamento em leito empacotado utilizando NaOH 0,3 mol/L a 70 °C por 4 h obtiveram uma biomassa composta por 51,7 % de celulose, 24,8 % de hemicelulose e 13,2 % de lignina, levando a redução de 60,9 % da lignina. Janu *et al.* (2011) ao realizaram o pré-tratamento alcalino utilizando uma razão de 0,6 g de NaOH/g de biomassa a 121 °C por 60 min em autoclave alcançaram uma composição de 44,9 % de celulose, 29,0 % hemicelulose, 4,98 % lignina, o que representa redução de 82 % da lignina. Maiores concentrações de provocam maior remoção de lignina. No entanto, condições muito drásticas também podem levar à remoção de grandes quantidades de celulose e hemicelulose (CANILHA *et al.*, 2012; PANDEY *et al.*, 2015). Dessa forma, menos açúcares estariam disponíveis na biomassa para consumo do microrganismo. As composições do bagaço *in natura* e PTA estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição das biomassas bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e PTA

Biomassa	Composição (%)			Recuperação de sólidos (%)	Remoção (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina		Lignina	Hemicelulose	Celulose
Bagaço <i>in natura</i>	42,0 ± 2,4	28,8 ± 1,7	20,5 ± 0,5	-	-	-	-
Bagaço PTA*	59,7 ± 0,6	30,7 ± 0,4	8,6 ± 0,6	61,7	74,7	34,2	12,2

*Pré-tratamento alcalino (0,18 g de NaOH/g de bagaço) em autoclave por 60 min

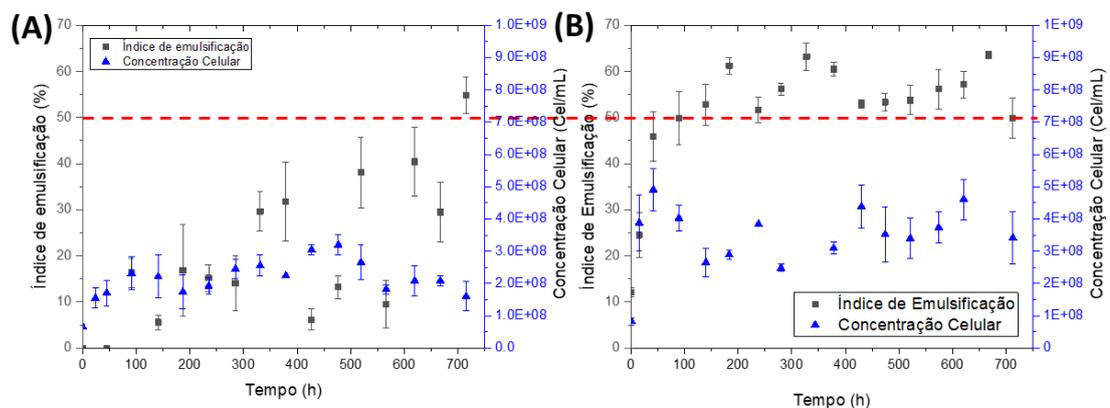
Fonte: Autoria própria

5.3 Avaliação da produção de BS por FES utilizando bagaço *in natura* e PTA como substrato

O passo seguinte foi a utilização do bagaço *in natura* e PTA como matéria-prima para FES. As amostras foram retiradas em 0, 24, 48 h e, posteriormente, a cada 48 h até um total de 720 h. Como resposta foi medido o IE_{24h} do extrato bruto de cada amostra.

Ao utilizar o bagaço *in natura* como fonte de carbono observou-se o maior IE_{24h} (55 %) em 720 h de cultivo (Figura 22 (A)). Entretanto, ao utilizar o bagaço PTA alcançou-se 50 % de emulsificação em apenas 90 h e atingiu-se o valor máximo de 63 % em 327 h (Figura 22 (B)). Desta forma, constata-se a nítida diferença entre os índices de emulsificação obtidos em cada experimento, levando a conclusão que o pré-tratamento pode facilitar a degradação do bagaço pelo microrganismo.

Figura 22 - Gráfico da concentração celular e IE_{24h} do extrato bruto em função do tempo utilizando bagaço *in natura* (A) e PTA (B) como substrato. A linha vermelha sinaliza o valor de 50 % de IE



Fonte: Autoria própria

5.4 Estudo das variáveis mais influentes no pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar

Após os resultados obtidos utilizando o bagaço PTA como substrato, realizou-se um planejamento fatorial completo 2² com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central com a finalidade de determinar as melhores condições de pré-tratamento (concentração de álcali e

tempo de pré-tratamento) do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de BS. Foram utilizados como resposta o IE_{24h}, IE_{96h} e remoção de lignina.

Na Tabela 7 observa-se que a composição percentual do material é modificada devido ao efeito do pré-tratamento alcalino. A maior porcentagem de celulose (60,1 %) e menor porcentagem de lignina (7,0 %) foram obtidas no experimento 6, no qual foi empregada a maior concentração de álcali. Já no experimento 5, no qual se empregou uma baixa concentração de álcali, o material apresentou uma composição muito similar ao bagaço *in natura*. A remoção de lignina por efeito do pré-tratamento alcalino é discutida no item 5.4.1.

5.4.1 Análise da remoção de lignina

Na Tabela 7 é mostrada a remoção dos principais componentes do material no pré-tratamento alcalino. Entre as diferentes condições utilizadas observou-se a maior remoção de lignina (80,5 %) nas condições mais drásticas em relação a concentração de NaOH (experimento 6), por outro lado, a menor remoção de lignina foi de 9,6 %, empregando a menor concentração de álcali (experimento 5). Por efeito do pré-tratamento, foi observada maior remoção de celulose (16,2 %) e de hemicelulose (41,3 %) nos experimentos 9 e 6, respectivamente.

Considerando que a lignina é um composto que dificulta a degradação da biomassa pelo microrganismo, sua remoção pode facilitar e contribuir para uma maior produção de BS. Desta forma, foi realizada uma análise estatística para a remoção de lignina. No gráfico de Pareto, disposto na Figura 23, observa-se que a razão NaOH/Bagaço (A) sobre a remoção de lignina tem efeito positivo e maior que a variável tempo de pré-tratamento (B). Ainda nesta figura nota-se que A e A² são significantes a 95% de confiança, enquanto B, B² e AB não são significantes neste nível. No entanto B fica muito próximo de ser significativo quando a mesma análise é feita com 90% de confiança. Desta forma, para a geração de um modelo foram mantidos os termos de A, A² e B.

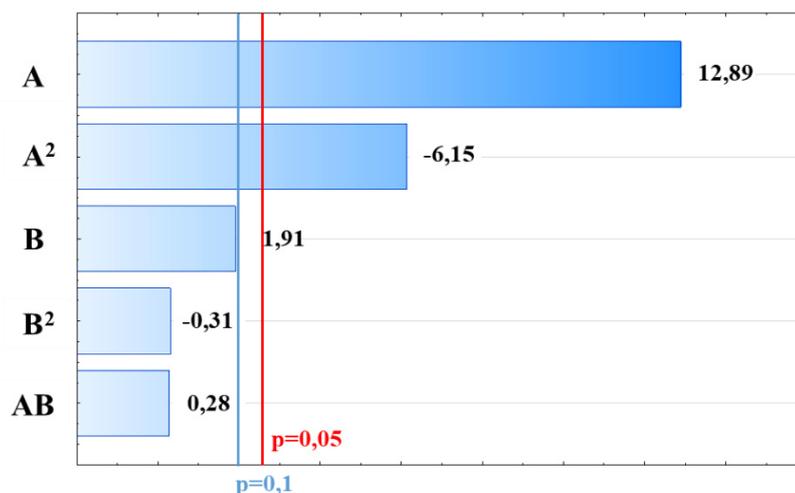
Tabela 7 - Composição do bagaço *in natura* e dos resíduos sólidos após cada condição de pré tratamento (matriz do planejamento de experimentos com valores reais e codificados (entre parênteses) para pré-tratamento alcalino do bagaço utilizando como fatores a razão NaOH/Bagaço e o tempo de duração do pré-tratamento em autoclave), remoção de lignina e IE após 192 h de fermentação

Biomassa/ Experimento	Razão NaOH/Bagaço (g/g)	Tempo de autoclave (min)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Recuperação de sólido (%)	Remoção (%)			IE _{24h} (%)	IE _{96h} (%)
								Cel. ¹	Hem. ²	Lig. ³		
Bagaço <i>in natura</i>	-	-	40,7 ± 1,5	32,1 ± 1,8	21,8 ± 0,4	2,4 ± 0,1	-	-	-	-	10,0	10,0
1	0,05 (-1)	20 (-1)	50,9 ± 2,7	33,8 ± 0,7	19,9 ± 0,3	1,4 ± 0,1	81,75	0,0	14,0	25,6	53,8	49,8
2	0,25 (+1)	20 (-1)	54,6 ± 1,6	32,6 ± 0,5	9,5 ± 0,4	1,2 ± 0,1	63,16	15,3	36,0	72,6	58,6	61,5
3	0,05 (-1)	60 (+1)	45,8 ± 2,2	31,2 ± 1,5	18,9 ± 0,2	1,3 ± 0,01	82,51	7,2	20,0	28,5	54,4	44,0
4	0,25 (+1)	60 (+1)	59,9 ± 0,3	33,3 ± 0,3	8,2 ± 0,9	0,8 ± 0,1	57,38	15,4	40,6	78,6	59,5	58,0
5	0,01 (-1,44)	40 (0)	39,9 ± 0,9	31,8 ± 0,5	21,9 ± 0,01	0,9 ± 0,1	90,23	11,4	10,7	9,6	16,5	11,3
6	0,29 (+1,44)	40 (0)	60,1 ± 0,7	31,2 ± 0,4	7,0 ± 1,2	0,9 ± 0,1	60,54	10,6	41,3	80,5	61,9	57,8
7	0,15 (0)	12 (-1,44)	52,1 ± 1,1	35,3 ± 0,9	11,5 ± 0,8	0,8 ± 0,2	67,52	13,6	25,9	64,5	58,9	57,2
8	0,15 (0)	68 (+1,44)	55,6 ± 0,04	32,9 ± 0,2	7,0 ± 0,6	0,8 ± 0,1	65,81	10,0	32,6	78,8	59,2	59,6
9	0,15 (0)	40 (0)	51,7 ± 2,2	37,4 ± 1,8	9,3 ± 0,6	0,7 ± 0,2	65,88	16,2	23,4	71,9	56,2	56,8
10	0,15 (0)	40 (0)	51,6 ± 2,3	37,2 ± 1,3	9,3 ± 1,3	0,9 ± 0,04	66,34	15,8	23,2	71,6	55,8	55,3
11	0,15 (0)	40 (0)	54,3 ± 1,6	35,3 ± 0,7	11,5 ± 0,1	1,0 ± 0,2	66,32	11,4	27,2	65,03	61,3	62,6

Fonte: Autoria própria

Nota: ¹Celulose, ²Hemicelulose e ³Lignina

Figura 23 - Gráfico de Pareto para remoção de lignina com nível de confiança de 95 % (vermelho) e 90 % (azul)



Fonte: Autoria própria

Nota: A representa o fator razão NaOH/Bagaço e B tempo do pré-tratamento na autoclave

Tabela 8 - ANOVA para planejamento de experimentos em relação a remoção de lignina com nível de confiança de 95 %

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrada	F	p-valor	
Modelo	6149,05	3	2049,68	94,74	<0,0001	Significante
A	4867,28	1	4867,28	224,98	< 0,0001*	Significante
B	106,75	1	106,75	4,93	0,0618*	
A ²	1175,80	1	1175,80	54,31	0,0002*	Significante
Residual	151,44	7	21,63			
Falta de ajuste	121,30	5	24,26	1,61	0,4259	não significante
Erro puro	30,15	2	15,07			
Total	6300,50	10				

Fonte: Autoria própria

Nota: A representa o fator razão NaOH/Bagaço e B tempo do pré-tratamento na autoclave.
*Variáveis significantes em nível de confiança de 90 %

Os resultados de remoção de lignina obtidos foram ajustados a um modelo quadrático. A significância deste modelo pode ser observada na análise de variância (ANOVA) (Tabela 8). Deste modo, o ajuste adequado do modelo pode ser confirmado pelo p-valor (<0,0001) < 0,05 a um nível de confiança de 95 % e a não significância do teste de falta de ajuste com p-valor (0,4259) > 0,05. Adicionalmente o R² ajustado do modelo foi de 0,966, indicando que este explica 96,6 % da variabilidade dos dados experimentais, sendo considerado válido de acordo com os critérios para validação e aceitabilidade de modelos

conforme descrito no trabalho de Moldavsky e Cohen (1996). Observa-se que, como na análise dos efeitos, o fator A exerce grande influência, enquanto o fator B não possui significância.

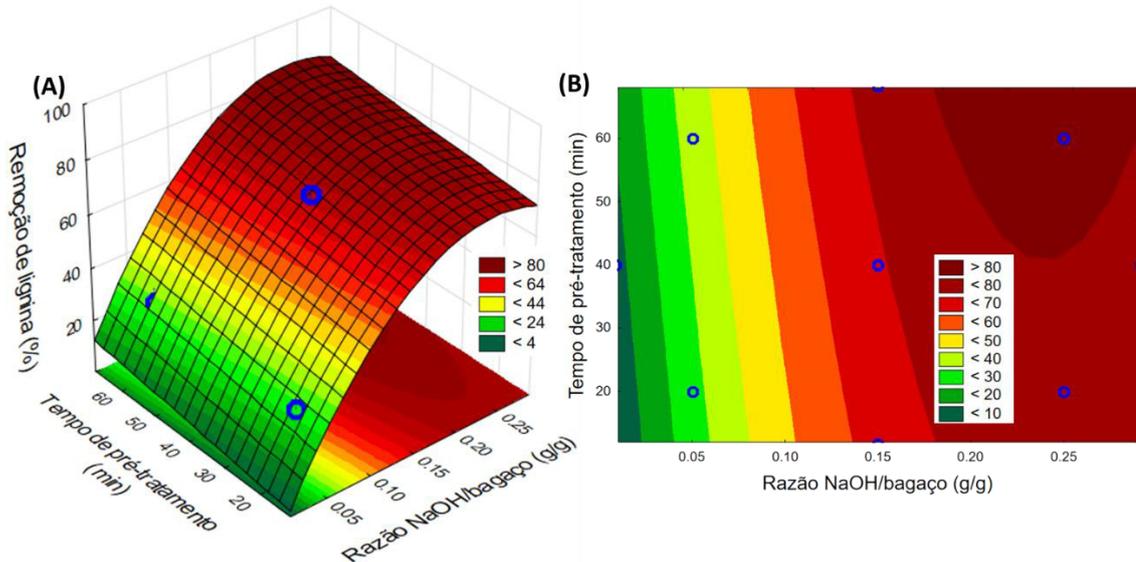
O modelo matemático quadrático relacionando a razão de NaOH/bagaço e o tempo de pré-tratamento, em valores reais, com a remoção de lignina está descrito na Equação 2:

$$RL = -6,480 + 660,266 \times A + 0,183 \times B - 1378,6871 \times A^2 \quad (2)$$

Onde: RL=Remoção de lignina, A= razão de NaOH/bagaço, B= tempo de pré-tratamento.

O modelo (Equação 2) permitiu a geração de uma superfície de resposta (Figura 24), mostrando que maiores concentrações de NaOH e tempos prolongados de processo permitem alta remoção de lignina, como testado por Janu *et al.* (2011), previamente citado. Na mesma figura observa-se que razões de NaOH/bagaço entre 0,12 e 0,17 (g/g) removem entre 60 e 70 % da lignina do bagaço.

Figura 24 - (A) Superfície de resposta do modelo para remoção de lignina em função da razão NaOH/Bagaço e tempo de pré-tratamento. (B) Gráfico de contorno do modelo para remoção de lignina em função da razão NaOH/Bagaço e tempo de pré-tratamento



Fonte: Autoria própria

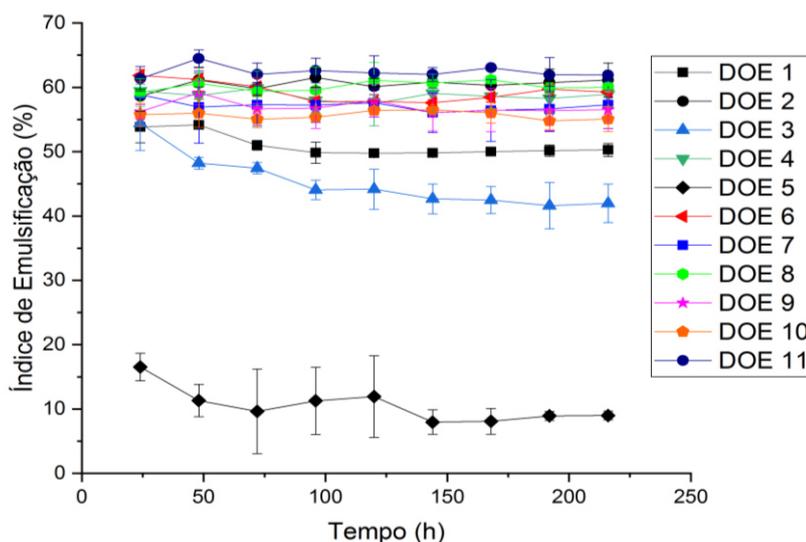
Posteriormente também foram determinadas as condições de pré-tratamento que possibilitam a produção de BS com maior IE, conforme apresentado na seção a seguir.

5.4.2 Análise do IE do extrato bruto da fermentação

O bagaço PTA nas condições estabelecidas no planejamento foi utilizado em uma etapa posterior para a produção de BS por FES. Como observado na Tabela 7, nota-se o maior IE_{24h} (61,9 %) na condição de pré-tratamento de 0,29 g/g e 40 min, enquanto que o menor IE_{24h} foi de 16,53 %, empregando baixa concentração de álcali (0,01 g/g) e 40 min. É importante ressaltar que estes experimentos apresentaram a maior e a menor remoção de lignina, respectivamente. Dessa forma, nota-se que a remoção deste composto provavelmente facilita a degradação do bagaço pelo microrganismo.

A estabilidade da camada emulsificada é uma indicação de como o surfactante irá se comportar como emulsificante, idealmente esta fase deve ser homogênea, ou seja, sem separação da fase aquosa e orgânica (JIMÉNEZ-PEÑALVER *et al.*, 2018). Na Figura 25 observa-se que os experimentos 3 e 1 possuem índices de emulsificação menores e menos estáveis nas primeiras 96 h em relação aos outros experimentos. Nestes dois experimentos também foi constatada baixa remoção de lignina: 25,55 % e 28,51 % para o experimento 1 e 3, respectivamente.

Figura 25 - Índices de emulsificação e estabilidade das emulsões resultantes das fermentações utilizando como substratos os resíduos sólidos dos pré-tratamentos alcalinos obtidos no planejamento fatorial 2^2 .

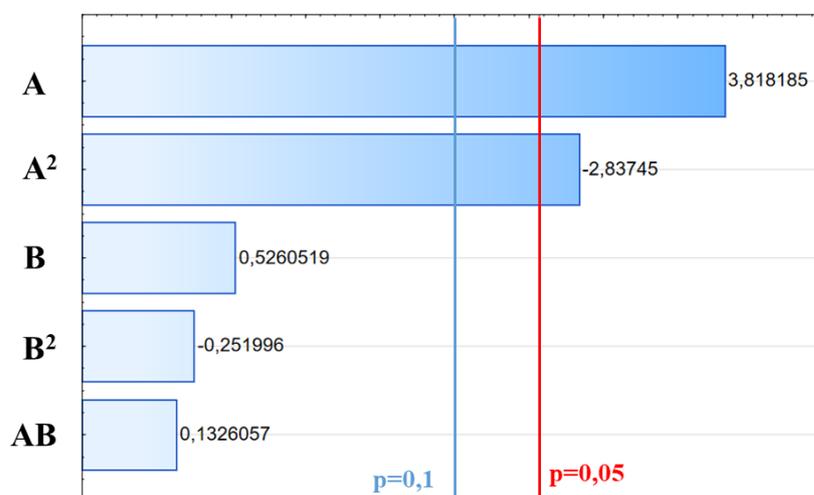


Fonte: Autoria própria

Devido à instabilidade do IE_{24h} em alguns experimentos, optou-se por utilizar o IE_{96h} para realizar uma análise estatística do IE. No gráfico de Pareto, disposto na Figura 26,

observa-se que a razão NaOH/Bagaço (A) sobre o IE_{96h} tem efeito positivo e que a variável tempo de pré-tratamento (B) não exerce influência.

Figura 26 - Gráfico de Pareto utilizando como resposta IE_{96h} com nível de confiança de 95 % (vermelho) e 90 % (azul)



Fonte: Autoria própria

Nota: A representa o fator razão NaOH/Bagaço e B tempo do pré-tratamento na autoclave

Tabela 9 - ANOVA para planejamento de experimentos em relação ao IE_{96h} a um nível de confiança de 95 %

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrada	F	p-valor	
Modelo	1747,70	2	873,85	18,87	0,0009	significante
A	1044,64	1	1044,64	22,56	0,0014*	
A ²	703,06	1	703,06	15,19	0,0046*	
Residual	370,38	8	46,30			
Falta de ajuste	340,71	6	56,79	3,83	0,2216	não significante
Erro puro	29,67	2	14,83			
Total	2118,08	10				

Fonte: Autoria própria

Nota: A representa o fator razão NaOH/Bagaço. *Variáveis significantes em nível de confiança de 90%

Os resultados de IE_{96h} obtidos foram ajustados a um modelo quadrático e a significância deste modelo pode ser observada na análise de variância (ANOVA) (Tabela 9). O ajuste adequado do modelo pode ser confirmado pelo p-valor (0,0009) < 0,05 a um nível de confiança de 95 % e a não significância do teste de falta de ajuste com p-valor (0,2216) > 0,05. Adicionalmente o R^2 ajustado do modelo foi de 0,7814, indicando que este explica 78,14 % da variabilidade dos dados experimentais. Observa-se que, como na análise

dos efeitos, o fator A exerce grande influência, enquanto o fator B não possui significância na faixa de tempo analisada.

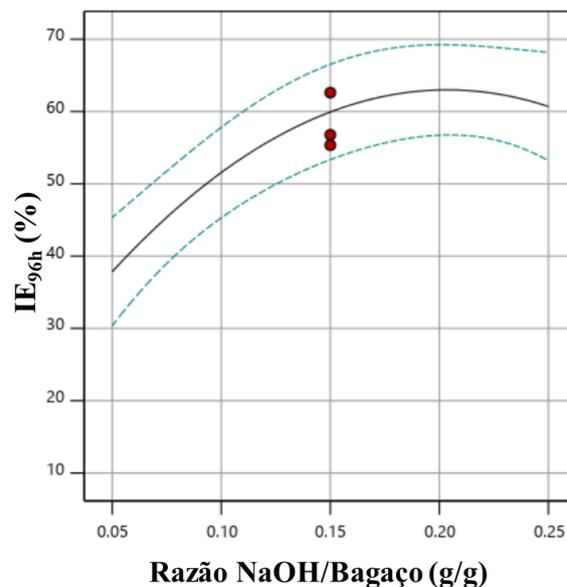
O modelo matemático quadrático relacionando a razão de NaOH/bagaço com o IE_{96h} em valores reais está descrito na Equação 3:

$$IE_{96h} = 18,798 + 434,204 \times A - 1066,441 \times A^2 \quad (3)$$

Onde: A= razão de NaOH/bagaço.

De acordo com o gráfico (Figura 27) do modelo (Equação 3) observa-se que o pico de IE ocorre ao se utilizar a razão 0,2 NaOH/bagaço; no entanto, razões de NaOH/bagaço maiores que 0,12 (g/g) já levam a IE_{96h} maiores que 50% (dentro do intervalo de confiança do modelo).

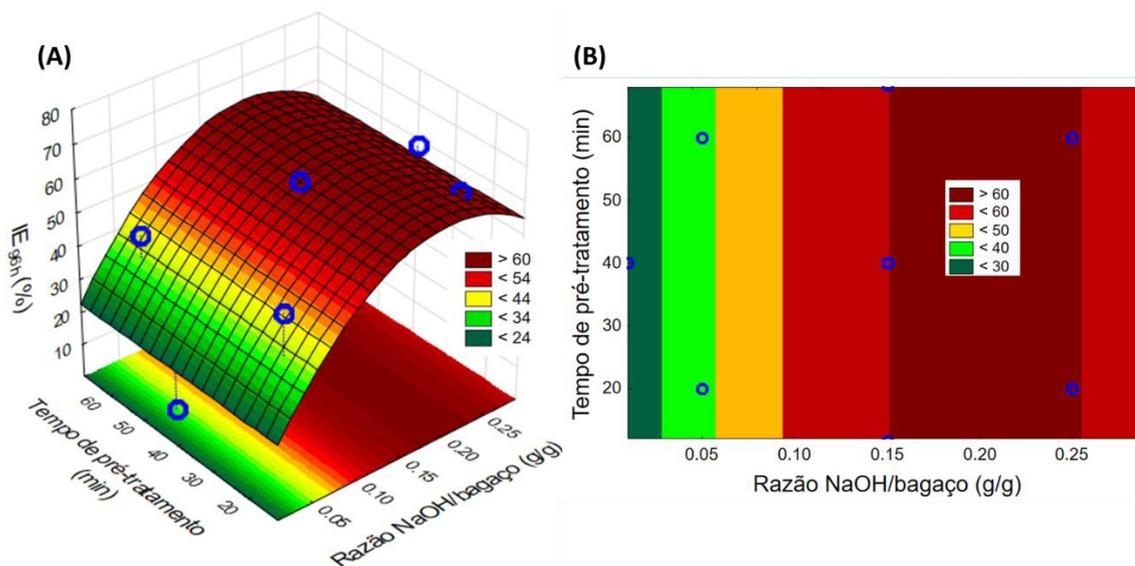
Figura 27 - Gráfico do modelo gerado pela Equação 3 (linha preta) relacionando o IE_{96h} com a razão NaOH/Bagaço (linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança)



Fonte: Autoria própria

Por meio do modelo (Equação 3) também foi possível a geração de uma superfície de resposta e um gráfico de contorno (Figura 28). Como na Figura 27, constata-se que teores de NaOH entre 0,15 e 0,25 proporcionam maiores IE_{96h} e que o tempo realmente não exerce influência no IE.

Figura 28 - (A) Superfície de resposta do modelo para IE_{96h} em função da razão NaOH/Bagaço e tempo de pré-tratamento. (B) Gráfico de contorno do modelo para IE_{96h} em função da razão NaOH/Bagaço e tempo de pré-tratamento



Fonte: Autoria própria

5.4.3 Confirmação dos modelos

Com auxílio do modelo (Equação 3) e da função *desirability* do *software* computacional *Design-Expert 6.0.8 Portable* especificando os seguintes requisitos: obtenção de IE_{96h} entre 50 e 100 %, minimização do uso de NaOH e mínimo tempo de pré-tratamento em autoclave, deveriam ser empregadas as seguintes condições de pré-tratamento: 0,12 (g/g) de NaOH/bagaço e 12 min em autoclave.

O bagaço *in natura* foi pré-tratado de acordo com as condições acima e o resíduo sólido foi utilizado na FES por *A. pullulans* por 192 h. Na Tabela 10 observa-se que os valores experimentais de remoção de lignina e IE_{96h} se encontram dentro da faixa predita pelos modelos (Equações 3 e 4), confirmando a validade de ambos.

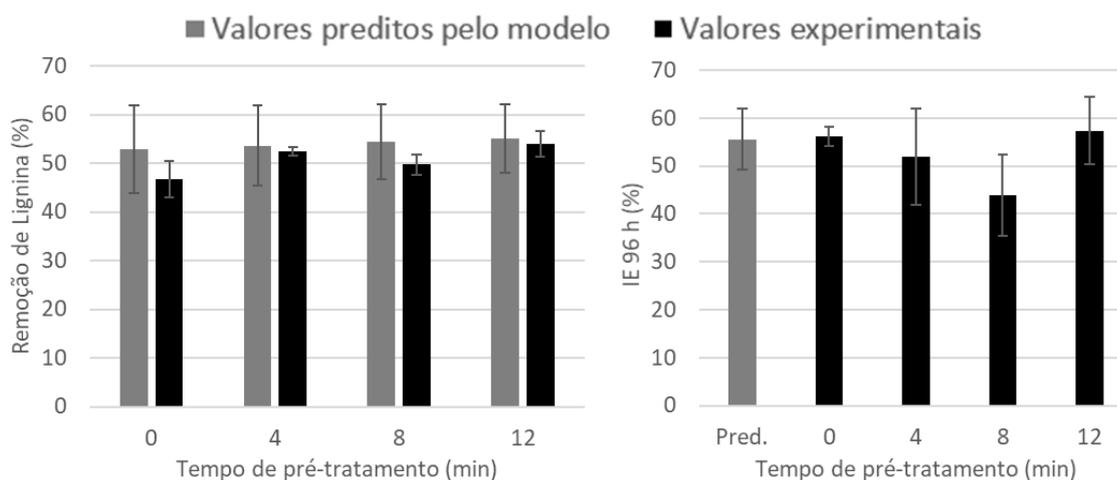
Tabela 10 - Valores preditos e experimentais para remoção de lignina e IE96h utilizando 0,12 (g/g) de NaOH/bagaço e 12 min em autoclave

Variável	Valor predito (média ± intervalo de confiança de 95%)	Valor experimental (média ± desvio padrão)
Remoção de lignina (%)	55,1 ± 7,1	54,0 ± 2,7
IE _{96h} (%)	55,6 ± 6,4	57,4 ± 5,7

Fonte: Autoria própria

Como o modelo para o IE_{96h} (Equação 3) não sofre influência do tempo de tratamento em autoclave, foram realizados três experimentos de confirmação variando o tempo de permanência da autoclave a 1 atm conforme a Figura 29.

Figura 29 - Comparação dos valores preditos (média ± intervalo de confiança) e experimentais (média ± desvio padrão) na variação do tempo de pré-tratamento em autoclave



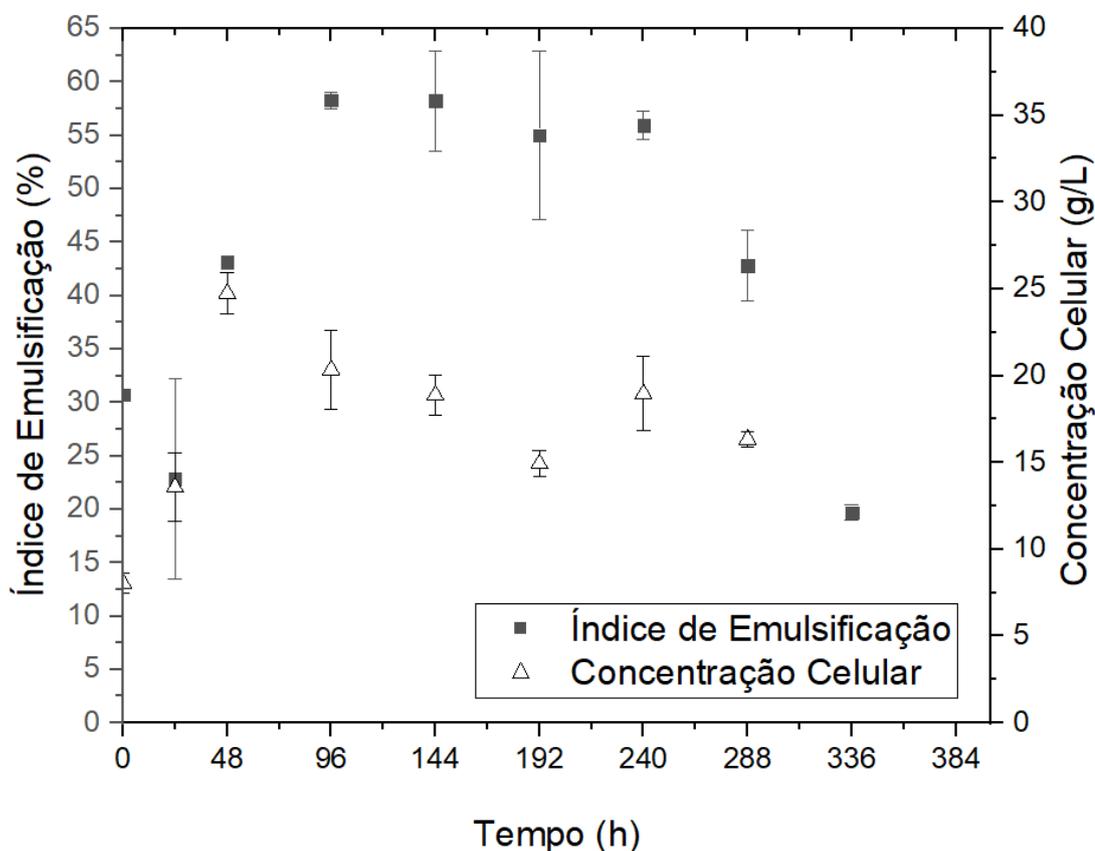
Fonte: Autoria própria

Observa-se que as condições de pré-tratamento de 0 e 12 min geraram resultados muito similares em relação ao IE_{96h} e o teste post hoc “Unequal N HSD” com confiança de 95 % mostra que não há diferença significativa entre os IE_{96h} nos quatro tempos analisados. Exceto para o tempo de 8 min, no qual houve maior variabilidade nos resultados, sendo um pouco pior que nos outros experimentos. Desta forma foi escolhido o menor tempo de autoclave (0 min) para dar continuidade aos experimentos. É importante ressaltar que o tempo 0 min refere-se a colocar o material em autoclave, esperar que ela atinja a pressão de 1 atm e em seguida desligá-la e esperar a queda da pressão, para depois abri-la.

5.5 Produção de BS utilizando as condições mais favoráveis de pré-tratamento em meio alcalino em autoclave

Foi realizada uma fermentação completa (com amostragem a cada 48 h), por um total de 336 h, utilizando o bagaço PTA (nas condições 0,12 g/g de NaOH/bagaço e 0 min a 1 atm em autoclave) como fonte de carbono, medindo como resposta o IE_{96h} do extrato bruto de cada amostra. Na Figura 30 está disposto o gráfico da concentração celular no extrato bruto (g/L) e o IE_{96h} (%) alcançado naquele ponto.

Figura 30 - IE_{96h} e concentração celular ao longo da fermentação



Fonte: Autoria própria

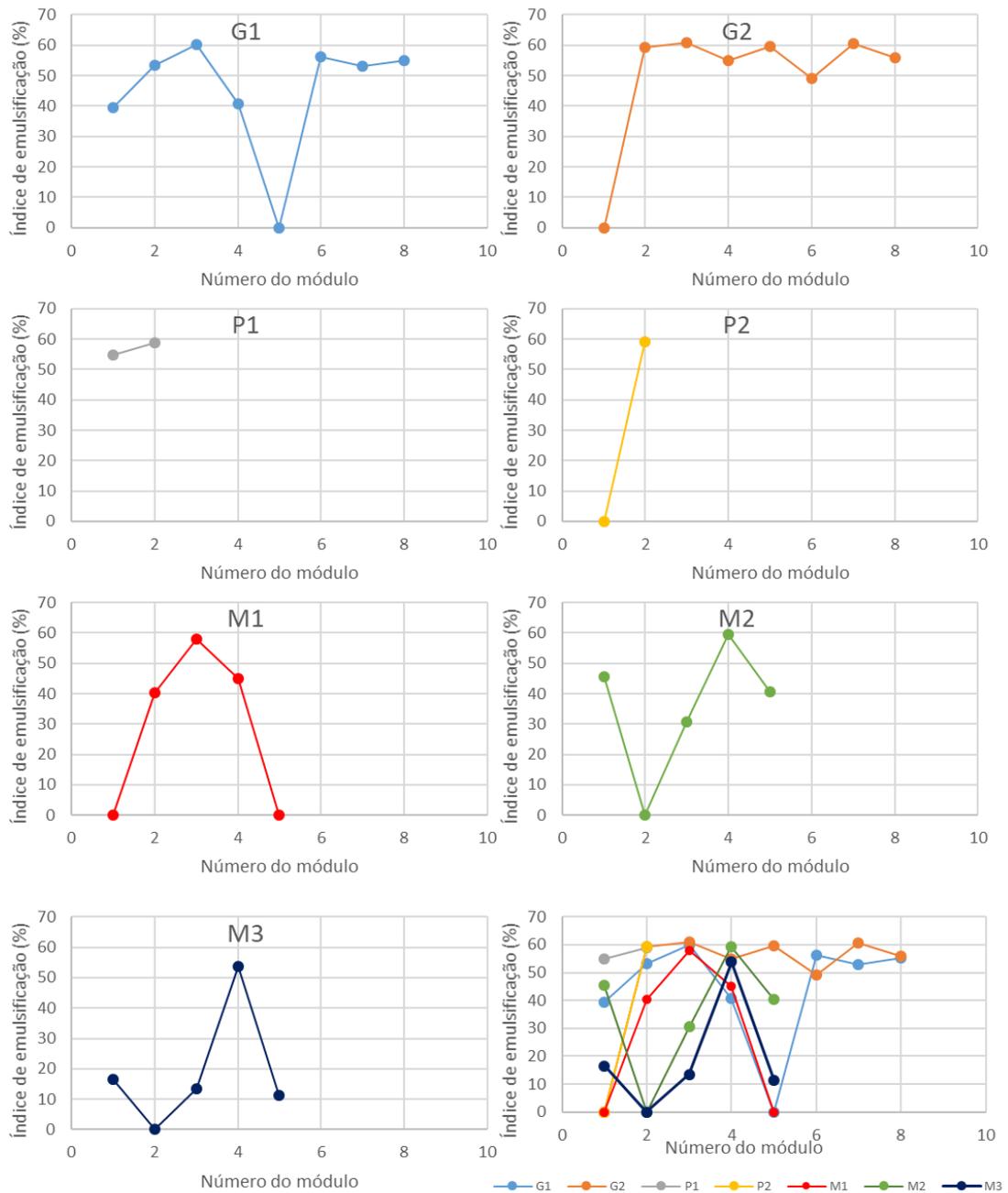
Observa-se que os valores máximos de IE foram obtidos em 96 e 144 h de fermentação: 58,3 e 58,2 % respectivamente. A análise da tensão superficial do extrato bruto resultou em valores iguais aos do meio de cultivo sem células, ou seja, não houve alteração da tensão superficial ao longo da fermentação. Desta forma, definiu-se a utilização destas condições de pré-tratamento (0,12 g/g de NaOH/bagaço e 0 min a 1 atm em autoclave) e tempo de fermentação de 96 h no cultivo em reator de coluna segmentada.

5.6 FES em reator de coluna segmentada

Em seguida, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central variando a quantidade de módulos e a vazão de ar no reator de coluna segmentada por 96 h de cultivo (Tabela 11). O nível baixo de aeração se manteve em $2,23 \times 10^{-3} \pm 0,13 \times 10^{-3}$ m/s ($23,2 \pm 1,4$ L/h), enquanto o nível alto em $4,2 \times 10^{-3} \pm 0,24 \times 10^{-3}$ m/s ($43,5 \pm 2,5$ L/h), já a aeração utilizada como ponto central foi um pouco abaixo do valor proposto ($3,2 \times 10^{-3}$ m/s), cerca de $2,9 \times 10^{-3} \pm 0,11 \times 10^{-3}$ m/s ($30,0 \pm 1,1$ L/h), devido à falta de precisão no ajuste da válvula de ar. Foi utilizado o bagaço PTA nas condições 0,12 (g/g) de NaOH/bagaço e 0 min em autoclave e como resposta foi analisado o IE_{96h} do reator ao final da fermentação.

O maior índice de emulsificação (60,68 %) foi observado no módulo 7 do reator (G2) com 8 módulos e aeração no nível alto (Figura 31). Nota-se uma diferença considerável no IE e concentração de BS entre os diferentes módulos dos reatores, bem como não é observado um padrão no IE_{96h} relacionado à posição do módulo (exceto para o módulo 4, no qual todos os valores foram maiores que 40%). Isto pode ocorrer devido aos gradientes de temperatura e umidade que geralmente estão presentes numa FES devido à falta de circulação de uma fase aquosa para homogeneizar o sistema (FARINAS, 2015; SOCCOL *et al.*, 2017). Também foram observados IE_{96h} iguais a zero em alguns módulos, principalmente no módulo 1 de alguns reatores, para onde toda solução umectante não absorvida pela matriz sólida escorria e em alguns casos inundando este módulo.

Figura 31 - IE_{96h} de cada módulo dos diferentes reatores.



Fonte: Autoria própria

Nota: G1 = Reator de 8 módulos e aeração no nível baixo

G2 = Reator de 8 módulos e aeração no nível alto

P1 = Reator de 2 módulos e aeração nível alto

P2 = Reator de 2 módulos e aeração nível baixo

M1, M2 e M3 = Pontos centrais

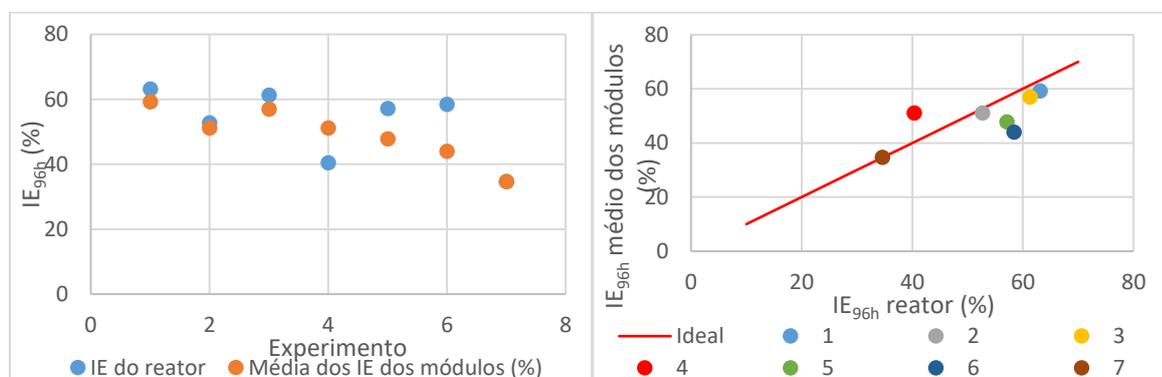
Além disso em outros experimentos foram observados que a presença ou a falta de luz podem influenciar na produção de BS por este microrganismo. Frascos mais próximos a fonte de luz da estufa apresentaram maior IE. Terán-Hilares *et al.* (2017) analisaram o uso de diferentes comprimentos de onda na produção de pululana por *A. pullulans* e constataram

que os diferentes comprimentos de onda influenciavam o metabolismo deste microrganismo. Estes autores constataram que a luz azul (450 a 470 nm) proporcionou a maior produção de pululana e reduziu a produção de melanina. Logo, é possível que a produção de BS também seja influenciada pela luz.

Outro fato importante é que não houve compactação do meio sólido, devido a tela de metal utilizada no fundo de cada módulo, favorecendo um pouco mais a troca gasosa e possibilitando melhor crescimento do microrganismo e produção de metabólitos.

Foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada módulo, e misturando-as, esta amostra, posteriormente foi utilizada para análise do IE_{96h} (coluna 5, Tabela 11). Também foi feita a média dos IE_{96h} dos módulos diferentes de zero (coluna 6, Tabela 11). A relação de ambos é dada na Figura 32. Observa-se uma boa semelhança entre os dois na maior parte dos experimentos, no entanto alguns se distanciam, como nos experimentos 4, 5 e 6. Em um ambiente industrial provavelmente o conteúdo dos módulos seria removido e misturado para facilitar a extração do BS. Desta forma, para as seguintes análises estatísticas foi escolhido como resposta o IE obtido a partir da mistura dos extratos brutos.

Figura 32 - Relação entre ambos IE analisados



Fonte: Autoria própria

O maior IE_{96h} do reator foi observado no experimento 1 (63,1 %), enquanto o menor foi no experimento 7 (34,6 %). Um fato importante a ser ressaltado é a ausência de aeração nas primeiras 24 h do experimento 7 devido a um problema na válvula de controle de ar, o que possivelmente dificultou o crescimento do microrganismo justamente no período em que ocorre seu crescimento exponencial. Como as condições proporcionadas neste experimento foram diferentes das demais, optou-se por desconsiderá-lo nas análises do planejamento de experimentos realizadas a seguir.

Tabela 11 - Matriz do planejamento de experimentos fatorial completo 2² com valores reais e codificados (entre parênteses) para FES em reator modular utilizando como fatores o número de módulos e aeração e as respostas IE_{24h} e IE_{96h} após 96 h de fermentação.

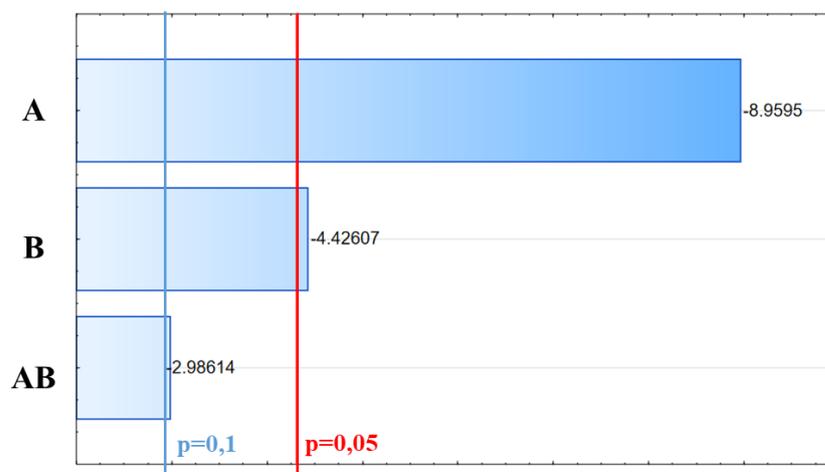
Experimento	Nº de módulos	Aeração (m/s)	IE _{24h} (%)	IE _{96h} do reator (%)	IE _{96h} médio dos módulos (%)
1	2 (-1)	0,00213 (-1)	62,3	63,1	59,2
2	8 (+1)	0,00213 (-1)	56,9	52,7	51,1
3	2 (-1)	0,00426 (+1)	63,2	61,3	56,9
4	8 (+1)	0,00426 (+1)	55,0	40,4	51,1
5	5 (0)	0,00290 (-0,277)	57,3	57,1	47,8
6	5 (0)	0,00290 (-0,277)	60,9	58,4	44,0
7	5 (0)	0,00290 (-0,277)	47,8	34,6	34,6

Fonte: Autoria própria

5.6.1 Análise do IE_{96h} no reator de coluna segmentada

Foi realizada uma análise estatística para o IE_{96h} médio de cada reator. No gráfico de Pareto, disposto na Figura 33, observa-se que tanto a vazão de ar (B) quanto o número de módulos (A) tem efeito negativo sobre o IE_{96h} médio do reator.

Figura 33 - Gráfico de Pareto para IE_{96h} com nível de confiança de 95 % (vermelho) e 90 % (azul)



Fonte: Autoria própria

Nota: A representa o fator número de módulos e B a aeração

Os resultados de IE_{96h} obtidos foram ajustados a um modelo primeira ordem. A significância deste modelo pode ser observada na análise de variância (ANOVA) (Tabela 12). Desta forma, o ajuste adequado do modelo pode ser confirmado pelo p-valor (0,0270) < 0,05 a um nível de confiança de 95 % e a não significância do teste de falta de ajuste com p-valor (0,2426) > 0,05. Adicionalmente o R^2 ajustado do modelo foi de 0,955, indicando que este explica 95,5 % da variabilidade dos dados experimentais, sendo considerado válido de acordo com os critérios para validação e aceitabilidade de modelos conforme descrito no trabalho de Moldavsky e Cohen (1996). Observa-se que, como na análise dos efeitos, o número de módulos exerce uma influência muito mais forte em relação a aeração, no entanto ambos são significantes a um nível de confiança de 95%. Considerando um nível de confiança de 90%, a interação AB também é significativa. Todavia, apesar de parecer um bom modelo o R^2 predito é de -0,2643. Provavelmente seriam necessários mais experimentos para observar a possibilidade de geração de um modelo quadrático.

Tabela 12 - ANOVA para planejamento de experimentos em relação a IE_{96h} em reator de coluna segmentada com nível de confiança de 95 %

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrada	F	p-valor	
Modelo	331,71	3	110,57	36,26	0,0270	significante
A	244,78	1	244,78	80,28	0,0122*	
B	59,74	1	59,74	19,59	0,0474*	
AB	27,19	1	27,19	8,92	0,0962*	
Residual	6,1	2	3,05			
Falta de ajuste	5,26	1	5,26	6,23	0,2426	não significante
Erro puro	0,8433	1	0,8433			
Total	337,8	5				

Fonte: Autoria própria

Nota: A representa o número de módulos e B a vazão de ar.

*Variáveis significantes em nível de confiança de 90 %

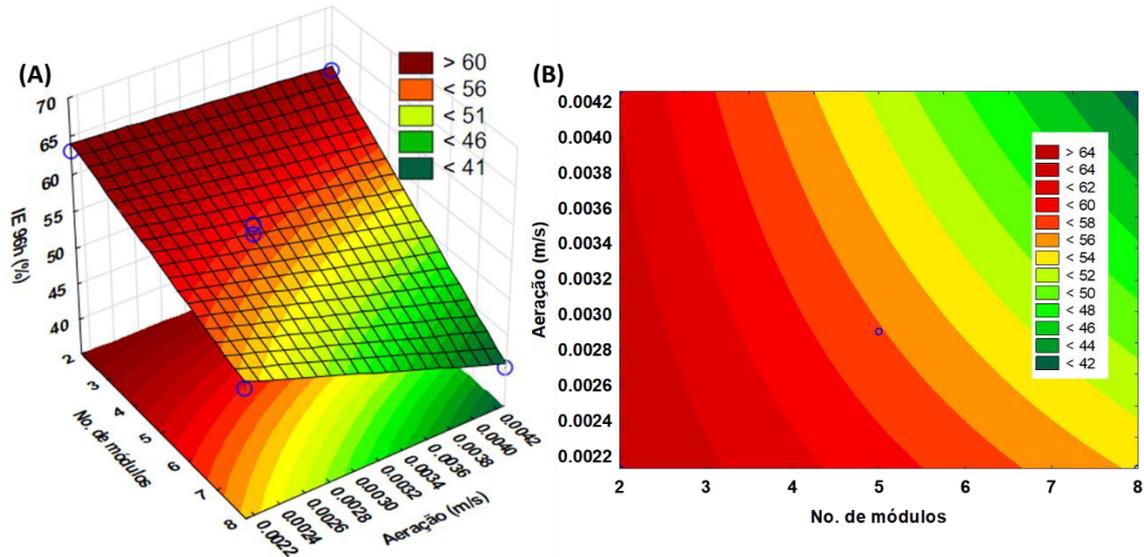
O modelo matemático relacionando o número de módulos e a vazão de ar com o IE_{96h} descrito na Equação 4:

$$IE_{96h} = 66,36 - 0,0003 \times A + 3,06 \times B - 4,64 \times AB \quad (4)$$

Onde: A= número de módulos e B= vazão de ar.

Segundo o gráfico de contorno (Figura 34) nota-se que menos módulos levam a um IE_{96h} médio do reator maior, bem como uma baixa aeração.

Figura 34 - (A) Superfície de resposta do modelo para IE_{96h} em função do número de módulos e aeração. (B) Gráfico de contorno do modelo para IE_{96h} do número de módulos e aeração.



Fonte: Autoria própria

Observa-se que apesar de o modelo indicar que o fator A é significativo, seu coeficiente na Equação 4 é muito baixo, mostrando que não é tão relevante e possivelmente, devido a um baixo R^2 predito este não é um bom modelo.

Devido ao R^2 predito ser negativo, com o atual modelo não é possível concluir se há influência ou não da aeração, no entanto, ao se observar os resultados obtidos na Tabela 11, aparentemente um maior número de módulos dificulta a produção de BS em cada módulo. Este fato, possivelmente, ocorre devido a dois fatores, primeiro o consumo do oxigênio pode ser maior nos módulos inferiores, dessa forma os módulos superiores são prejudicados devido a uma maior concentração de CO_2 . O segundo fator pode ser devido ao arraste de umidade causado por uma maior aeração e dessa forma o ambiente acaba ficando mais ou menos úmido.

Além disso segundo Brumano *et al.* 2017, no estudo realizado com o mesmo microrganismo, a produção de BS em fermentação submersa crescia quando aumentava-se a aeração, no entanto devido à formação de espuma os autores limitaram a aeração a 1,1 vvm. O que significa que uma maior aeração deveria proporcionar maior produção de BS, o contrário do que o atual modelo prevê.

5.6.2 Quantificação do BS produzido

Posteriormente foi realizada a extração do BS para sua quantificação. No presente trabalho, a máxima concentração de BS produzido em 96 h de fermentação foi 4,9 g/L de solução umectante ou 24,5 mg/g de substrato no reator de coluna segmentada.

Brumano (2017a) utilizou o bagaço como suporte e sacarose como fonte de carbono para *Aureobasidium pullulans* LB 83 em FES por 168 h e observou a produção de 2,06 g/L de BS. Brumano *et al.* (2017b) observou a produção de 1,52 g/L de BS utilizando sacarose como fonte de carbono em FS por 168 h para a levedura *A. pullulans* LB 83.

Já Saur *et al.* (2019) trabalhando com *A. pullulans* NRRL62031 constataram a produção de 10 g/L de BS utilizando sacarose como fonte de carbono em um fermentador de 750 mL.

El-Housseiny *et al.* (2019), ao utilizarem bagaço de cana-de-açúcar impregnado com solução umidificadora contendo 2% v/v de glicerol como substrato para FES por um mutante de *Pseudomonas aeruginosa*, observaram a produção de ramnolipídeos (cerca de 10 g/L) após 6 dias de cultivo.

Manitchotpisit *et al.* (2011) constataram diferentes rendimentos nas FS para as diversas linhagens de *A. pullulans* por eles analisadas, dentre elas a CU 43 produziu 1,9 g/L de BS após 6 dias de cultivo. Kim *et al.* (2015) reportaram baixo rendimento (0,5 g/L) da que a Glicerol-liamocina que obtiveram com a linhagem de *A. pullulans* L3.

Constata-se que a concentração de BS produzida pela linhagem de *A. pullulans* do presente trabalho foi maior que as reportadas por Brumano (2017a e 2017b), Manitchotpisit *et al.* (2011) e Kim *et al.* (2015), no entanto, menor que a reportada por Saur *et al.* (2019). Apenas a linhagem por meio do sistema utilizado por Saur *et al.* (2019) foi capaz de alcançar quantidades tão grandes como as produzidas por bactérias, como reportado por El-Housseiny *et al.* (2019).

Os dois trabalhos de Brumano (2017a, 2017b) mostram que esta linhagem de *A. pullulans* se adapta melhor a FES do que a FS. Além disso, o presente trabalho aponta que o uso do bagaço pré-tratado como fonte de carbono proporcionou uma produção de BS ainda maior em relação à sacarose e reduziu o tempo de fermentação.

5.6.3 Caracterização do BS produzido

A amostra de BS da linhagem de *A. pullulans* LB83 enviada para o Instituto de Microbiologia Aplicada na Universidade RTWH Aachen foi analisada e, por meio desta caracterização, foi possível identificar a presença de diferentes moléculas em sua composição (Tabela 13).

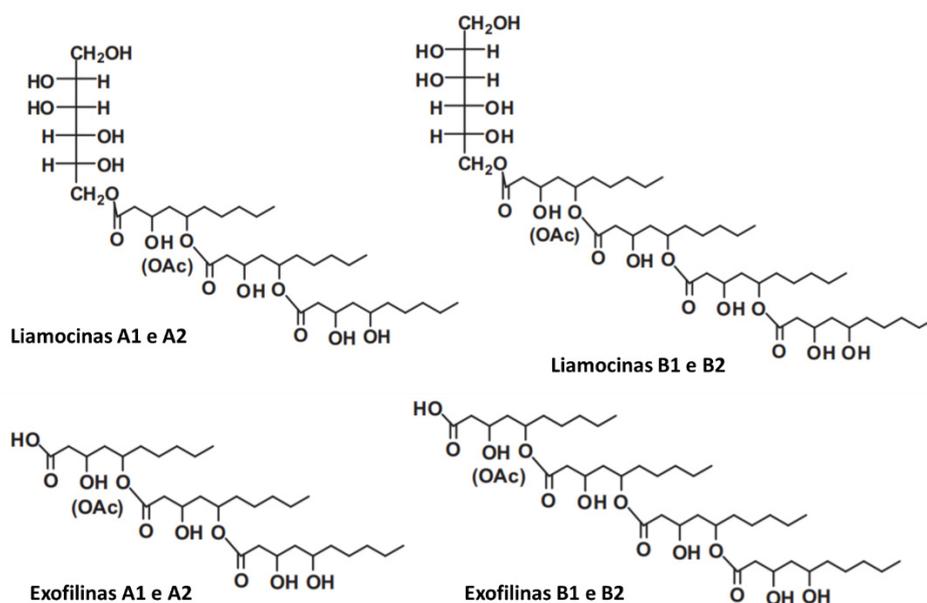
Tabela 13 - Tipos de moléculas presentes no BS caracterizado e suas porcentagens

Molécula	Porcentagem relativa das moléculas identificadas (%)	
	Presente trabalho	Saur <i>et al.</i> (2019)
Liamocina A1 (Mannitol)	11	19
Liamocina A2 (Mannitol)	5	32
Liamocina A2 (Arabitol)	8	-
Liamocina B1 (Mannitol)	0	31
Liamocina B1 (Arabitol)	5	2
Exofilina A1	0	5
Exofilina A2	16	5
Exofilina B1	8	6
Exofilina B2	46	-

Fonte: Autoria própria e Saur *et al.* (2019)

Liamocinas são compostas por uma porção de manitol ou arabitol parcialmente acidulada com três grupos esters 3,5-dihydroxidecanoicos, para liamocinas A1 e A2 e quatro grupos para liamocinas B1 e B2 (Figura 35 - Tipos de Liamocinas e exofilinas produzidas por *A. pullulans*). As liamocinas A1 e B1 são não acetiladas, enquanto as A2 e B2 contêm um grupo 3-O-acetil. As exofilinas seguem o mesmo padrão, no entanto não possuem a fração de manitol (SAUR *et al.*, 2019; PRICE *et al.*, 2013).

Figura 35 - Tipos de Liamocinas e exofilinas produzidas por *A. pullulans*



Fonte: Price *et al.* (2013)

Observa-se na Tabela 13 que, dentre as moléculas analisadas, a maior porcentagem do BS produzido no presente trabalho é composta por exofilina, principalmente do tipo B2. Já Saur *et al.* (2019) constataram a produção de BS por *A. pullulans* com maior porcentagem de liamocina B1 (Manitol) e liamocina A2 (Manitol). Desta forma constata-se que diferentes linhagens de microrganismo produzem um diferente conjunto de moléculas.

Segundo Price *et al.* (2013) a exofilina A de *A. pullulans* pode ser uma fonte interessante para a produção de antibióticos, sendo este o segundo tipo de molécula mais produzida no presente trabalho. Bischoff *et al.* (2015) reportam que as liamocinas produzidas por *A. pullulans* NRRL 50380 apresentaram atividade antibiótica em relação a diferentes espécies de bactérias do tipo *Streptococcus sp.*

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização do bagaço *in natura* como fonte de carbono leva a um tempo muito longo (cerca de 720 h) de fermentação para a produção de BS, não sendo então viável como alternativa para uma biorrefinaria. No entanto, o pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, remove parte da lignina, facilitando a degradação dos polissacarídeos deste substrato pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans*. Além disso, observa-se que o extrato bruto gerado a partir da utilização da biomassa PTA como substrato para FES alcança índices de emulsificação maiores que 50 %.

Os modelos matemáticos permitem relacionar a concentração de NaOH e tempo de pré-tratamento com a remoção de lignina e o índice de emulsificação. Com ajuda dos modelos constata-se que o tempo de pré-tratamento de autoclave não é um fator tão importante quanto a concentração de NaOH. Desta forma, é possível reduzir gastos com NaOH e/ou energia para a autoclave utilizando o modelo para encontrar a melhor relação entre IE e estes dois fatores.

O uso do bagaço PTA com 0,12 g/g de NaOH e 0 min em autoclave possibilita a produção de BS com IE maior que 55% em apenas 96 h de fermentação, um tempo relativamente curto, tornando sua aplicação mais viável em relação ao bagaço *in natura* em biorrefinarias.

Foi possível a produção de BS em um reator de coluna segmentada, no qual não foi observada a compactação no leito, no entanto ocorreu uma alta variabilidade dentre os IE extraídos em cada módulo.

Na fermentação em reator de coluna segmentada, com o atual modelo não é possível concluir se há influência ou não da aeração, no entanto aparentemente um maior número de módulos dificulta a produção de BS em cada módulo.

A maior parte das moléculas que compõem este BS são exofilinas, principalmente do tipo B2.

Por fim, foi notada a influência de luz no metabolismo deste microrganismo, tornando muito importante um estudo do efeito de diferentes comprimentos de onda de luz na produção de BS por *A. pullulans*.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, F. A. F. **Imobilização celular de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em gel de alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado.** 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Bioquímica, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; INGLE, A. P.; MILESSI, T. S. S.; DUSSAN, K. J. M.; SILVA, D. D. V.; TERAN-HILARES, R.; BRUMANO, L. P.; SILVA, G. M.; HERNANDEZ-PEREZ, A.; RAMOS, L.; CARNEIRO, B. C.; MAITAN, M. V.; FELIPE, M. G. A.; SANTOS, J. C.; DA SILVA, S. S. **Sugarcane Bagasse: Properties, Production And Uses.** Hauppauge: Nova Science Publishers, 2018 (*in press*)

ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactants : anticorrosive, antibiofilm and antimicrobial properties. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848–858, Abr., 2013.

ARCURI, S. L.; PAGNOCCA, F. C.; DA PAIXÃO MELO, W. G.; NAGAMOTO, N. S.; KOMURA, D. L.; RODRIGUES, A. Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 475–487, 2014.

ASHOK, A.; DORIYA, K.; RAO, D. R. M.; KUMAR, D. S. Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 11–18, 2017.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T.; **Surfactants Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology**, London: Chapman and Hall, 1983

BARROS, F. F. **A melhoria contínua no processo de plantio da cana-de-açúcar.** 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

BISCHOFF, K.M.; LEATHERS, T.D.; PRICE, N.P.J.; MANITCHOTPISIT, P. Liamocin oil from *Aureobasidium pullulans* has antibacterial activity with specificity for species of *Streptococcus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, p. 642–645, 2015.

BRUMANO, L. P. **Produção de biossurfactante por levedura utilizando fermentação em estado sólido em bagaço de cana-de-açúcar.** 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Bioquímica, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017a.

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

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

CANILHA, L.; CARVALGO, W.; FELIPE, MGA; SILVA, JBA; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 84-92, 2010.

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

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; SUZANE DOS SANTOS MILESSI, T.; ANTUNES, F. A. F.; LUIZ DA COSTA FREITAS, W.; DAS GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012.

CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L. K. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of limiting nutrients and carbon substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 25–33, 2001.

CHI, Z.; WANG, F.; CHI, Z.; YUE, L.; LIU, G.; ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 793–804, 2009.

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

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira Cana-de-açúcar v. 5- Safra 2018/19, N. 2 - Segundo levantamento**. Brasília, p. 1-86, Agosto 2018.

DA CUNHA, D. C.; SOUZA, J. A.; ROCHA, L. A. O.; COSTA, J. A. V., Hexahedral modular bioreactor for solid state bioprocesses, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2173-2178, 2009.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2011.

DE, S.; MALIK, S.; GHOSH, A.; SAHA, R.; SAHA, B. A review on natural surfactants. **RSC Advances**, v. 5, n. 81, p. 65757–65767, 2015.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Fuel and Energy Abstracts**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DESHPANDE, M. S.; RALE, V. B.; LYNCH, J. M. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 7, p. 514–527, 1992.

DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C.C. β -Xylanase produced by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 262–268, 1989.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 113–125, 2003.

- EL-HOUSSEINY, G.S.; ABOSHANAB, K.M.; ABOULWafa, M.M.; HASSOUNA, N.A. Rhamnolipid production by a gamma ray-induced *Pseudomonas aeruginosa* mutant under solid state fermentation. **AMB Express**, v. 9, 2019.
- ERNESTO, V. A. R. T. **Caracterização Térmica do Bagaço da Cana-de-Açúcar Visando Aproveitamento Energético**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.
- FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- FDA U.S. Food and Drug Administration. **GRAS Notices GRN No. 309**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=309> Acesso em: 20 set. 2018.
- FELIPE, L. D. O.; DIAS, S. D. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes : vantagens e desvantagens. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 3, p. 228–236, 2017.
- FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091–2099, 2008.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 41–65, 2007.
- GLOBAL MARKETS INSIGHTS. **Biosurfactants Market Size By Product (Sphorolipids, Rhamnolipids, Alkyl Polyglucosides [APG], Methyl Ethyl Sulfonates [MES], Sucrose Esters, Sorbitan Esters, Lipopeptides), By Application (Household Detergents, Personal Care, Industrial Cleaners, Food Processing, Oilfield Chemicals, Agricultural Chemicals, Textiles), Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Germany, UK, France, Italy, China, India, Japan, Thailand, Brazil), Application Potential, Price Trend, Competitive Market Share & Forecast, 2018 – 2024**. 2018. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/biosurfactants-market-report> Acesso em: 11 abr. 2019.
- GOSTINČAR, C.; OHM, R. A.; KOGEJ, T.; SONJAK, S.; TURK, M.; ZAJC, J.; ZALAR, P.; GRUBE, M.; SUN, H.; HAN, J.; SHARMA, A.; CHINIQUY, J.; NGAN, C.; LIPZEN, A.; BARRY, K.; GRIGORIEV, I. V.; GUNDE-CIMERMAN, N. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. **BMC Genomics**, v. 15, n. 549, 2014.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T. do; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. de M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.
- GRAND VIEW RESEARCH. **Surfactants Market Analysis By Product (Cationic, Nonionic, Anionic, Amphoteric), By Application (Home Care, Personal Care, Industrial & Institutional Cleaners, Food Processing, Oilfield Chemicals, Agricultural Chemicals, Textiles, Emulsion Polymerization, Paints & Coatings, Construction) And Segment Forecasts To 2022**. 2014. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/surfactants-market> Acesso em: 11 abr. 2019.

GUTIERREZ-MACIAS, P.; LOURDES, M. De; JESUS, H. De; BARRAGAN-HUERTA, B. E. Agro-Industrial Waste. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 26, n. 6, p. 4128–4152, 2017.

GUTIERREZ, T.; SHIMMIELD, T.; HAIDON, C.; BLACK, K.; GREEN, D. H. Emulsifying and Metal Ion Binding Activity of a Glycoprotein Exopolymer Produced by *Pseudoalteromonas* sp. Strain TG12. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4867–4876, 2008.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect CX cellulose activity of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 109–115, 1977.

HAMES, B.R.; THOMAS, S.R.; SLUITER, A.D.; ROTH, C.J.; TEMPLETON, D.W. Rapid biomass analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105/108, p. 5-16, 2003.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.

IBRAHIM, M. M.; EL-ZAWAWY, W. K.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; AGBLEVOR, F. A. Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 720–726, 2011.

JANU, K. U.; SINDHU, R.; BINOD, P.; KUTTIRAJA, M.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Studies on physicochemical changes during alkali pretreatment and optimization of hydrolysis conditions to improve sugar yield from bagasse. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 70, n. 11, p. 952–958, 2011.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P.; CASTILLEJOS, M.; KOH, A.; GROSS, R.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; GEA, T. Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 2735–2747, 2018.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503-507, 2008.

KIM, J. S.; LEE, I. K.; YUN, B. S. A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* thunb. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2015.

KITAMOTO, D.; AKIBA, S.; HIOKI, C.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 31–36, 1990.

KOH, A.; LINHARDT, R. J.; GROSS, R. Effect of Sophorolipid n-Alkyl Ester Chain Length on Its Interfacial Properties at the Almond Oil-Water Interface. **Journal of cleaner production**, v. 32, n. 22, p. 5562–5572, 2016.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F (ed.). Biosurfactants : **Production and Utilization-Processes, Technologies, and Economics**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems - An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1–30, 2005.

KUDANGA, T.; MWENJE, E. Extracellular cellulase production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian journal of microbiology**, v. 51, p. 773–776, 2005.

KULAKOVSKAYA, E.; KULAKOVSKAYA, T. **Extracellular Glycolipids of Yeasts: Biodiversity, Biochemistry, and Prospects**. Waltham: Elsevier, 2014.

KUROSAWA, T.; SAKAI, K.; NAKAHARA, T.; OSHIMA, Y.; TABUCH, T. Extracellular Accumulation of the Polyol Lipids, 3,5-Dihydroxydecanoyl and 5-Hydroxy-2-decenoyl Esters of Arabitol and Mannitol, by *Aureobasidium* sp. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 2057–2060, 1994.

LEATHERS, T.D. Color Variants of *Aureobasidium pullulans* Overproduce Xylanase with Extremely High Specific Activity. **Applied Environmental Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1026–1030, 1986.

LORENCINI, P. **Otimização de pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar para a sua utilização como substrato na a produção biológica de hidrogênio**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

MAGALHÃES, L. **Eutrofização**. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/eutrofizacao/> Acesso em: 15 out. 2018.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, n. 2, p. 237–241, 1999.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 675–683, 2005.

MANITCHOTPISIT, P.; PRICE, N. P. J.; LEATHERS, T. D.; PUNNAPAYAK, H. Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 6, p. 1151–1157, 2011.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

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

MARCELINO, P. R. F.; DA SILVA, V. L.; RODRIGUES PHILIPPINI, R.; VON ZUBEN, C. J.; CONTIERO, J.; DOS SANTOS, J. C.; DA SILVA, S. S. Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases. **PLoS ONE**, 2017.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558–565, 2012.

MARKETS AND MARKETS. **Surfactants Market by Type (Anionic, Non-Ionic, Cationic, and Amphoteric), Substrate (Synthetic, and Bio-based), Application (Detergents, Personal Care, Textile, Elastomers & Plastics, Crop Protection, Food & Beverage) - Global Forecast to 2021.** 2016. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactants-market-493.html> Acesso em: 8 mar. 2018.

MEDINA, K. J. D. D. **Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético.** 2013. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Bioquímica, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. DE (ed.). **Microbiologia Ambiental.** 2.ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1211–1225, 2000.

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

MORAN, S.; RAI, D.K.; CLARK, B.R.; MURPHY, C.D. Precursor-directed biosynthesis of fluorinated iturin A in *Bacillus* spp. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 644–646, 2008.

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

MUSO-CACHUMBA, J. J. **Produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Bioquímica, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

NAGATA, N.; NAKAHARA, T.; TABUCHI, T. Fermentative Production of Poly(β - L -malic acid), a Polyelectrolytic Biopolyester, by *Aureobasidium* sp. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 4, p. 638–642, 1993.

NELSON, DL; COX, MM. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIGAM, P. S.; PANDEY, A. (ed.). **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation.** [s.l.] Springer, 2009.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 31, p. 63–67, 2003.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.

- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.
- PANDEY, A.; NEGI, S.; BINOD, P.; LARROCHE, C. (ed.). **Pretreatment of biomass processes and technologies**. Amsterdam: Elsevier, 2015.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69–80, 2000.
- PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Strategies for scaling-up packed-bed bioreactors for solid-state fermentation: The case of cellulolytic enzymes production by a thermophilic fungus. **Chemical Engineering Journal**, v. 361, p. 1142–1151, 2019.
- PINTO, G. A. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Solid state fermentation: An alternative to reuse and valorization of tropical agroindustrial residues**. Embrapa Comunicado Técnico, v. 102, p. 1–5, 2005.
- PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- POU-LLINAS, J.; DRIGUEZ H. D-Xylose as inducer of the xylan-degrading enzyme system in the yeast *Pullularia pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 134–138, 1987.
- PRICE, N.P.J.; MANITCHOTPISIT, P.; VERMILLION, K.E.; BOWMAN, M.J.; LEATHERS, T.D. Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. **Carbohydrate Research**, v. 370, p. 24–32, 2013.
- RABELO, S.C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7887–7895, 2011.
- REDDY, A. S.; CHEN, C. Y.; BAKER, S. C.; CHEN, C. C.; JEAN, J. S.; FAN, C. W.; CHEN, H. R.; WANG, J. C. Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant as stabilizing agent. **Materials Letters**, v. 63, n. 15, p. 1227–1230, 2009.
- ROBBEL, L.; MARAHIEL, M. A. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27501–27508, 2010.
- RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211–219, 2005.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.
- SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016.
- SARUBBO, L. A.; ROCHA, R. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n. 8, p. 707–723, 2015.

SAUR, K.M.; BRUMHARD, O.; SCHOLZ, K.; HAYEN, H.; TISO, T. A pH shift induces high-titer liamocin production in *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 4741–4752, 2019.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant Production: Emerging Trends and Promising Strategies. **Journal of Applied Microbiology**, 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.14057> Acesso em: 15 mar. 2019.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. Technical report NREL/TP-510-42618 prepared for National Renewable Energy Laboratory, Golden Co., 2011.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (ed.). **Biosurfactants From Genes to Applications**. Münster: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

SOCOL, C. R.; COSTA, E. S. F. da; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 2017.

SOUZA, A. P. D. E. **A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de *Saccharum sp.*** 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

TERÁN-HILARES, R. **Hydrodynamic cavitation as a new approach for sugarcane bagasse pretreatment aiming to second generation ethanol production**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Bioquímica, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

TERÁN-HILARES, R.; RESÉNDIZ, A. L.; MARTÍNEZ, R. T.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C. Successive pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane bagasse in a packed bed flow-through column reactor aiming to support biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 42–49, 2016.

TERÁN-HILARES, R.; ORSI, C. A.; AHMED, M.A.; MARCELINO, P.F.; MENEGATTI, C.R.; DA SILVA, S.S.; DOS SANTOS, J.C. Low-melanin containing pullulan production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Aureobasidium pullulans* in fermentations assisted by light-emitting diode. **Bioresource Technology**, v.230, p. 76-81, 2017.

TOMAZELA, J.M. **Espumas cobrem Tietê e chegam a casas em Pirapora do Bom Jesus**. 2015. Disponível em: <https://sustentabilidade.estadao.com.br/noticias/geral,espumas-cobrem-o-tiete-e-chegam-as-casas-em-pirapora-do-bom-jesus,1711815> Acesso em: 20 set. 2018.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. **Sustainability**, v. 9, n. 2, p. 1–28, 2017.

ZALAR, P.; GOSTINČAR, C.; DE HOOG, G. S.; URŠIČ, V.; SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 21–38, 2008.