

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ITZCÓATL MUÑOZ JIMÉNEZ

**Imobilização celular de *Cutaneotrichosporon mucoides* em gel de alginato de cálcio
visando a produção de biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de
bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado**

Lorena

2019

ITZCÓATL MUÑOZ JIMÉNEZ

**Imobilização celular de *Cutaneotrichosporon mucoides* em gel de alginato de cálcio
visando a produção de biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de
bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado**

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 Microbiologia Aplicada.

Orientador: Dr. Silvio Silvério da Silva

Versão original

Lorena

2019

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

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

Muñoz Jiménez, Itzcóatl

Imobilização celular de Cutaneotrichosporon mucoides em gel de alginato de cálcio visando a produção de biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado / Itzcóatl Muñoz Jiménez; orientador Silvio Silvério da Silva - Versão Original. - Lorena, 2019.

87 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. Biossurfactantes. 2. Alginato de cálcio. 3. Bagaço de cana-de-açúcar. 4. Cutaneotrichosporon mucoides. I. Título. II. Silvério da Silva, Silvio, orient.

DEDICATORIA

A Gerita, mi sobrino, quien llegó a nuestras vidas después de una gran pérdida.

Te amamos.

AGRADECIMENTOS

A mis padres, por su eterna entrega y confianza, por no dejarme solo en ningún momento, por darme todas las herramientas que he necesitado a lo largo de estos años como estudiante y futuro investigador. A mi hermano, por cada cerveza y cada aventura vivida, a su esposa Olga Adriana, por darnos un ser maravilloso: “Gerita”. A mis primos y mis tíos, por sus palabras de aliento, por cada mensaje recibido a lo largo de toda esta aventura. A mis abuelos maternos: Sr. Armando Jiménez Bernal y Sra. Blanca Rosa Navarro Tápia, gracias por haber caminado a mi lado cada día, desde que llegué a Brasil hasta el día de hoy. A mis abuelos paternos: Sr. Félix Gutierrez y Sra. Juana González, gracias por haberme ayudado a dar mis primeiros pasos, por cada abrazo y por cada bendición recibida; a ustedes cuatro, todo mi agradecimiento, honra y respeto de lo mas profundo de mi corazón.

Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, gracias por la confianza depositada en mi y por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, gracias por todo el aprendizaje y por brindarme todo el apoyo a lo largo de este proceso, siempre será para mi un orgullo poder decir a las personas que usted fue mi orientador.

A Paulo, por haberme ayudado al máximo a lo largo de toda mi maestria, por cada enseñanza recibida y por haber tenido toda la paciencia para ayudarme en cada experimento, muchas gracias Paulo.

A mis amigos: Dr. Felipe Antunes, gracias por haber estado ahí en mis momentos más críticos, por haber guiado mi camino y por corregir mi trayecto cuando estaba por desviarme; Javier Muso, muchas gracias “karnalito” por haberme recibido como a un hermano desde mi primer día acá, que la vida te siga llenando de bendiciones a tí a tu familia. Andrés Hernández, gracias por todo amigo, por todas las veces que me extendiste la mano cuando más lo necesité, que tu vida esté repleta de salud, momentos felices, mucha paz y que tu carrera profesional continúe brillando. Ruly, Diego, Daiana, Diego Colombia, Salvador, Edith y Jesús, mi segunda familia., gracias por cada churrasco, por cada conversación llena de risas, por cada cerveza destapada, por cada enseñanza aprendida, por haberme hecho sentir querido y fuerte cuando mas lo necesité.

A la Universidad de São Paulo por la oportunidad

A CAPES por el apoyo financeiro

A la vida.

RESUMO

MUÑOZ-JIMÉNEZ, I., **Imobilização celular de *Cutaneotrichosporon mucoides* em gel de alginato de cálcio visando a produção de biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado**. 2019. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

A biomassa lignocelulósica, devido a sua composição polimérica tem sido descrita nos últimos anos como uma importante fonte de açúcares como glicose e xilose, sendo uma matéria prima para a substituição de outras derivadas do petróleo ou fontes não renováveis. Trabalhos recentes apontam o potencial da utilização da biomassa na produção de diversos bioprodutos, tais como etanol, xilitol, biopolímeros e metano entre outros. Os biossurfactantes (BS) são metabólitos primários ou secundários que ao serem secretados, modificam a tensão superficial/interfacial de líquidos e emulsificam substratos insolúveis. No presente trabalho foi estudada a capacidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (HHBCA) na produção de BS pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* utilizando um biorreator de leito fluidizado e a levedura imobilizada em gel de alginato de cálcio. Na primeira etapa, ensaios em frascos Erlenmeyer, foram realizados visando diminuir a concentração de extrato de levedura utilizado no meio de cultivo com o HHBCA. Posteriormente foram realizados os testes de produção de BS por células de *C. mucoides* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio. Os resultados obtidos do experimento com células imobilizadas após 48 h de fermentação, 50 % da fonte de carbono foi consumida e um índice de emulsificação (IE_{24}) de 36 % foi observado. Ao final das 96 h de fermentação observou-se um IE_{24} de 49% e um consumo de 100% da fonte de carbono (xilose). Na segunda etapa foram realizados ensaios em biorreator de bancada (reator de leito fluidizado) utilizando a levedura *C. mucoides* e alginato de cálcio como suporte celular, visando a reutilização do pre-inóculo, facilitar os processos de *downstream* da bio-molécula e proteger a células dos possíveis compostos tóxicos presentes no HHBCA. Os resultados apontam que, efetivamente é possível produzir BS utilizando células de *C. mucoides* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio. Assim mesmo, os resultados sugerem sistemas com baixa aeração e baixa concentração de fonte de carbono. Durante o processo fermentativo, não foi observada formação de espuma. Uma observação importante que aponta os biorreatores de leito fluidizado como alternativa promissora na produção deste bioproduto.

PALAVRAS-CHAVE: Biossurfactantes. Alginato de cálcio. Bagaço de cana de açúcar. *Cutaneotrichosporon mucoides*

ABSTRACT

MUÑOZ-JIMÉNEZ, I., **Imobilização celular de *Cutaneotrichosporon mucoides* em gel de alginato de cálcio visando a produção de biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado.** 2019. 87 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Lignocellulosic biomass due to its polymer composition has been described in recent years as an important source of sugars such as glucose and xylose, being a raw material for the substitution of other derivatives of petroleum or nonrenewable sources. Recent works point out the potential of the use of biomass in the production of various bioproducts, such as ethanol, xylitol, biopolymers and methane among others. Biosurfactants (BS) are primary or secondary metabolites that upon secretion, modify the surface / interfacial tension of liquids and emulsify insoluble substrates. In the present work the capacity of the sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate (HHBCA) in the production of BS by the yeast *Cutaneotrichosporon mucoides* was studied using a fluidized bed bioreactor and the yeast immobilized in calcium alginate gel. In the first stage, tests in Erlenmeyer flasks were carried out aiming to decrease the concentration of yeast extract used in the culture medium with HHBCA. Subsequently, BS production tests were performed by *C. mucoides* cells immobilized on calcium alginate beads. In the experiment with immobilized cells after 48 h of fermentation, 50% of the carbon source was consumed and an emulsification index (IE₂₄) of 36% was observed. At the end of the 96 h of fermentation an IE₂₄ of 49% and a consumption of 100% of the carbon source (xylose) was observed. In the second stage, the experiments were carried out in a bench reactor (fluidized bed reactor) using *C. mucoides* yeast and calcium alginate as cellular support, aiming at the reuse of the pre-inoculum, facilitating the downstream processes of the bio-molecule and protecting the cells of the possible toxic compounds present in HHBCA. The results indicate that it is indeed possible to produce BS using *C. mucoides* cells immobilized on calcium alginate beads. Likewise, the results suggest systems with low aeration and low concentration of carbon source. During the fermentation process, no foaming was observed. An important observation that points to fluidized bed bioreactors as a promising alternative in the production of this bioproduct.

KEYWORDS: Biosurfactants. Calcium alginate. Sugar-cane bagasse. *Cutaneotrichosporon mucoides*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Interação das moléculas de água na superfície e no seio do líquido.....	17
Figura 2- Exemplo das forças superficiais de um líquido.....	18
Figura 3- Estrutura e regiões polar e apolar de um biossurfactante.....	19
Figura 4- Representação esquemática de: a) micela reversa ou invertida, b) micela normal.....	20
Figura 5- Análise da tensão superficial de acordo com a concentração de surfactante em soluções aquosas.....	21
Figura 6- Espuma formada no Rio Tietê na cidade de Pirapora de Bom Jesus.....	24
Figura 7- Absorção celular de substratos hidrofóbicos por microrganismos mediante a excreção de biossurfactantes.....	31
Figura 8- Principais componentes da biomassa lignocelulósica.....	35
Figura 9- Evolução do número de publicações envolvendo biomassa lignocelulósica e biossurfactantes na última década.....	36
Figura 10- Parte da estrutura da celulose.....	37
Figura 11- Estrutura química da celulose formando pontes de hidrogênio.....	38
Figura 12- Fibras e microfibras de celulose na estrutura da biomassa lignocelulósica.....	38
Figura 13- Liberação de monômeros de glicose mediante a ação de enzimas celulasas.....	39
Figura 14- Estrutura química de uma xiloglucana.....	40
Figura 15- Estrutura química de uma xilana.....	40
Figura 16- Representação da estrutura química da lignina.....	41
Figura 17- Esquema de um reator de leito fluidizado com fundo cônico.....	46
Figura 18- Principais métodos de imobilização celular.....	48
Figura 19- Micrografias ópticas das células de <i>C. mucoides</i>	50
Figura 20- Representação esquemática das etapas da presente pesquisa.....	53
Figura 21 - Gota pendente em tensiômetro Easy Drop.....	60
Figura 22- Microfotografia da superfície do bagaço de cana-de-açúcar obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	63
Figura 23- Comparação da produção de biossurfactante e crescimento celular nas cinco condições de cultivo (g/L de extrato de levedura): A) condição I; B) condição II; C) condição III; D) condição IV; E) condição V.....	67

Figura 24- Crescimento celular (g/L de células) em: A) meio de cultura sintético; B) meio de cultura suplementado com HHBCA.....	68
Figura 25- IE ₂₄ dos ensaios realizados com diferentes concentrações de fonte de carbono: A) 20, B) 50 e C) 60 g/L de xilose.....	70
Figura 26- Emulsões obtidas em meios de cultivo suplementados com HHBCA após 24 h de fermentação.....	70
Figura 27- A) Fotografia das esferas de alginato de cálcio e B) microscopia de uma esfera de alginato de cálcio (aumento de 40x).....	71
Figura 28- Células de <i>C. mucoides</i> no interior da esfera de alginato de cálcio.....	72
Figura 29- Produção de biossurfactante em HHBCA em sistema com células livres (A) e com células imobilizadas (B)	73
Figura 30- Gráfico de pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes xilose (g/L) e vazão de ar no crescimento celular (g/L).....	75
Figura 31 – Superfície de resposta do efeito das variáveis independentes na produção de biomassa celular.....	76
Figura 32- Gráfico de pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes xilose (g/L) e vazão de ar na redução da tensão superficial.....	77
Figura 33 - Gráfico de pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes xilose (g/L) e vazão de ar na concentração de BS.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos surfactantes baseada na carga da região polar.....	21
Tabela 2- Principais aplicações industriais dos surfactantes químicos.....	23
Tabela 3- Surfactantes sintéticos no mercado: tipo de molécula e CMC.....	25
Tabela 4- Classificação de biossurfactantes e microrganismos produtores.....	27
Tabela 5- Algumas aplicações dos Biossurfactantes.....	33
Tabela 6- Área cultivada (ha) e biomassa produzida (Ton) dos principais cultivos agrícolas no Brasil.....	43
Tabela 7- Alguns tipos de reatores utilizados na produção de biossurfactantes.....	44
Tabela 8- Principais técnicas de imobilização celular e suas características.....	47
Tabela 9- Planejamento experimental.....	57
Tabela 10- Composição percentual das principais frações encontradas no bagaço de cana-de-açúcar.....	62
Tabela 11- Composição físico-química do HHBCA.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Uma breve conceituação e a importância dos surfactantes na sociedade atual	17
2.1.1 Tensão superficial.....	17
2.1.2 Compostos ativadores de superfícies.....	18
2.2 Biosurfactantes: conceitos e tipos.....	26
2.3 Mercado dos BS e cenários futuros como substitutos dos surfactantes sintéticos	32
2.4 Utilização de subprodutos agroindustriais na produção de biosurfactantes e as biorrefinarias lignocelulósicas	34
2.4.1 Biomassa Lignocelulósica	34
2.5 Produção sustentável de BS: o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar como uma matéria-prima alternativa.....	42
2.6 Produção de BS em reatores	44
2.7 Reator de leito fluidizado como alternativa para a produção de BS	45
2.8 Imobilização celular, técnicas e vantagens em processos biotecnológicos	46
2.9 <i>Cutaneotrichosporon mucoides</i> como produtora de BS.....	49
3 OBJETIVOS.....	52
3.1 GERAL	52
3.2 ESPECÍFICOS	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Caracterização físico-química do bagaço de cana de açúcar	54
4.2 Preparo e caracterização físico-química do HHBCA.....	54
4.3 Destoxificação do HHBCA.....	54
4.4 Manutenção do microrganismo e preparo do inóculo para as fermentações.....	55
4.5 Avaliação da concentração de extrato de levedura no meio de cultivo com HHBCA detoxificado	56
4.6 Avaliação do efeito das concentrações de HHBCA no meio de cultivo no crescimento celular	56
4.7 Imobilização das células de <i>C. mucoides</i> em esferas de alginato de cálcio.....	56

4.8 Teste de produção de BS em frascos Erlenmeyer por células de <i>C. mucoides</i> imobilizadas em esferas de alginato de cálcio em meio de cultivo com HHBCA destoxificado.....	57
4.9 Definição de condições de fermentação para a produção de BS em meio com HHBCA destoxificado utilizando células imobilizadas de <i>C. mucoides</i> em reator de leito fluidizado	57
4.10 Métodos analíticos	58
4.10.1 Determinação das concentrações de açúcares (xilose, arabinose e glicose), ácidos orgânicos (ácido fórmico e ácido acético) e furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural)....	58
4.10.2 Determinação das concentrações de compostos fenólicos totais.....	59
4.10.3 Determinação da concentração celular.....	59
4.10.4 Determinação do índice de emulsificação (I.E).....	59
4.10.5 Determinação da tensão superficial (TS).....	60
4.10.6 Extração de biossurfactantes.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 Caracterização composicional do bagaço de cana-de-açúcar.....	62
5.2 Caracterização físico-química do HHBCA	63
5.3 Avaliação da concentração de extrato de levedura no meio de cultivo com HHBCA destoxificado.....	65
5.4 Efeito das concentrações de HHBCA no meio de cultivo no crescimento celular e no índice de emulsificação	68
5.5 Imobilização das células de <i>C. mucoides</i> em esferas de alginato de cálcio	71
5.6 Produção de biossurfactante em frascos Erlenmeyer com células de <i>C. mucoides</i> imobilizadas.....	72
5.7 Produção de biossurfactantes em reator de leito fluidizado com células imobilizadas de <i>C. mucoides</i>	74
5.7.1 Efeito das concentrações de xilose e aeração no crescimento celular.....	74
5.7.2 Efeito das concentrações de xilose e aeração na produção de BS.....	76
6 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes (BS) ou compostos tenso-ativos, apresentam amplas características os quais fazem deles moléculas com um elevado valor agregado. Além de possuírem as mesmas (ou melhores) propriedades que os surfactantes sintéticos de reduzir ou alterar as tensões superficiais e interfaces, os BS podem ser obtidos a partir de processos biotecnológicos utilizando fontes de carbono renováveis, diferentemente dos surfactantes sintéticos os quais são principalmente sintetizados utilizando derivados do petróleo.

Assim como os surfactantes sintéticos, os BS apresentam uma estrutura molecular anfifílica, com uma parte polar e uma parte apolar, que confere características tensoativas e emulsificantes. Nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia a formação de emulsões é uma das etapas de maior importância.

Estima-se que a produção anual de surfactantes sintéticos é de 10 milhões de toneladas, dos quais cerca de 50% é empregada como detergentes industriais e domésticos (VAN BOGAERT et al., 2007), não entanto este tipo de moléculas de importância industrial são produzidas por processos químicos os quais geram resíduos tóxicos para o meio ambiente.

Os BS são metabólitos ativadores de superfícies e são produzidos por uma ampla variedade de microrganismos, além disso apresentam baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, assim como resistência a altas temperaturas e pH extremos. Os BS podem ser obtidos a partir de processos biotecnológicos e assim se apresentam como importantes moléculas para substituir aos surfactantes químicos em processos domésticos e industriais, porém os custos de produção ainda são um fator limitante principalmente pelos custos das matérias primas (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; CAMILIOS-NETO et al., 2011; FAHIM et al., 2013).

Em trabalhos feitos para produção de BS utilizando resíduos orgânicos, são comumente empregados a glicerina resultante da indústria de biodiesel e os óleos residuais das indústrias alimentícias como matérias-primas (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

O recente progresso das biorrefinarias lignocelulósicas expandiu o uso do bagaço de cana-de-açúcar que, além de ser uma das principais matérias primas para a produção de etanol de segunda geração (CHANDEL et al., 2014), xilitol (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al.,

2016) e biopolímeros (HILÁRES-TERÁN et al., 2017), pode ser usado como matéria prima para a produção de BS (MARCELINO et al., 2017).

Além dos custos de produção, a formação de espuma na produção de BS em fermentações submersas tem sido reportada como um problema comum. O uso de diferentes configurações de biorreatores pode auxiliar na redução da espuma formada no processo. Os biorreatores de leito fluidizado com células imobilizadas são geralmente utilizados em processos fermentativos para a produção de vários compostos de interesse industrial devido à sua boa capacidade de aeração e transferência de oxigênio no meio de cultivo, e a facilidade de separação das células do meio ao final de cada ciclo fermentativo (COLLOT et al., 1999; FAHIM et al., 2013).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção de BS procurando aproveitar o hidrolisado hemicelulósico do bagaço da indústria sucroalcooleira no Brasil com a levedura *Cutaneotrichosporun mucoides* imobilizada em esferas de gel de alginato de cálcio visando a re-utilização do microrganismo e a diminuição dos tempos de produção e purificação dessa biomolécula.

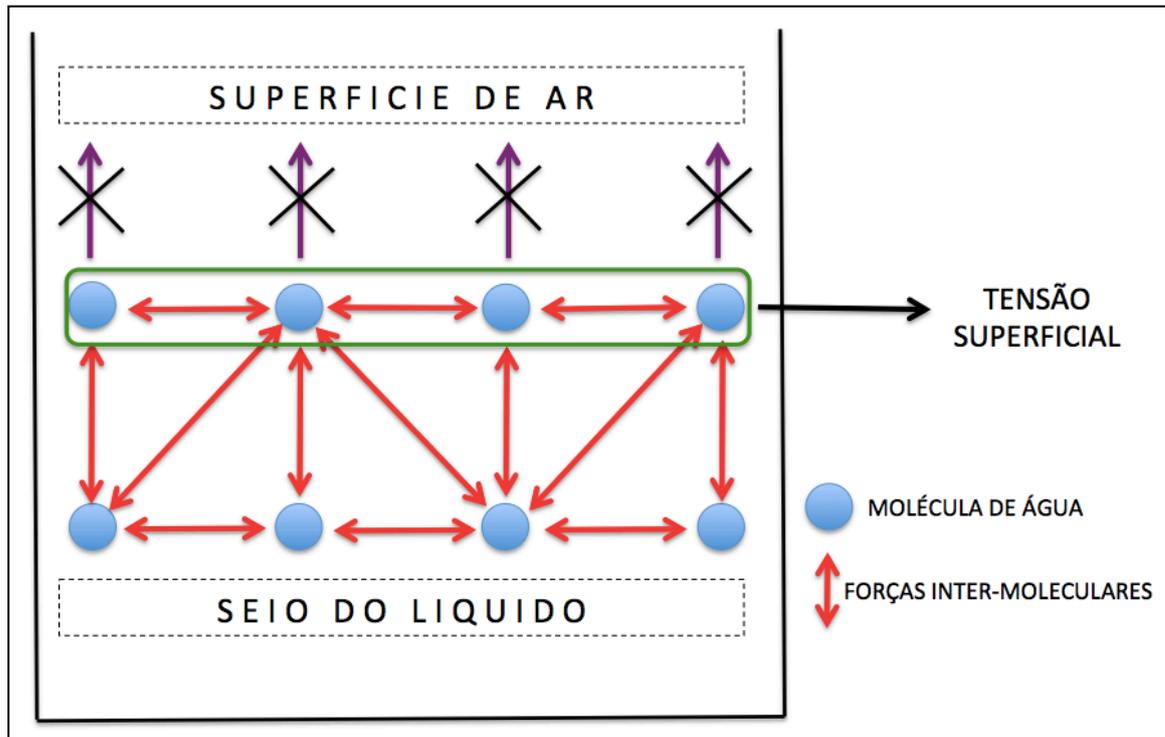
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uma breve conceituação e a importância dos surfactantes na sociedade atual

2.1.1 Tensão superficial

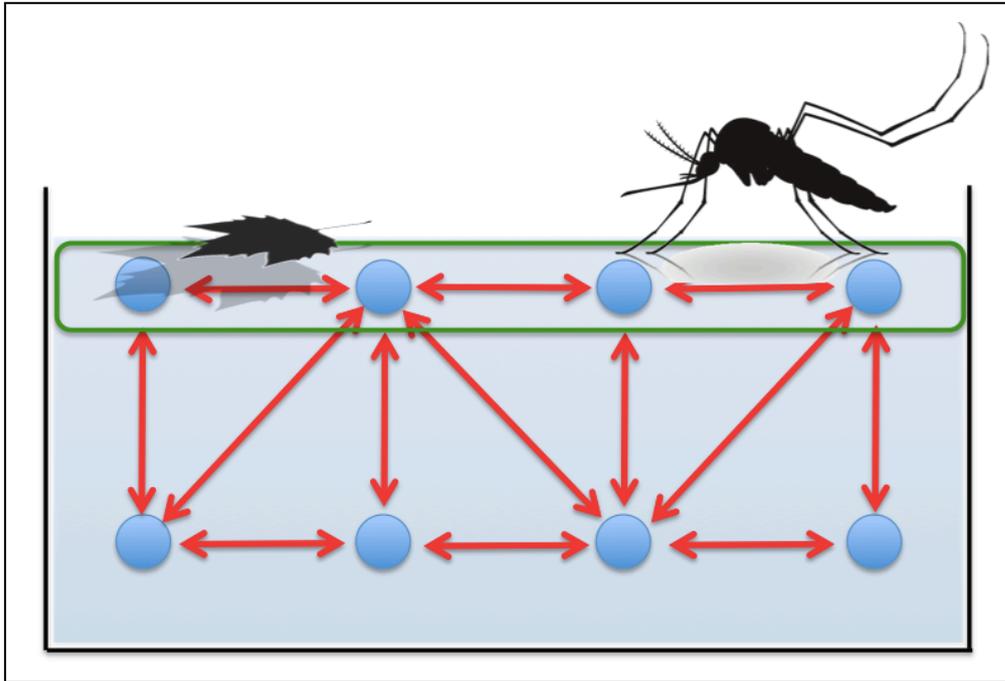
A tensão superficial é definida como a força que uma molécula de água exerce nas moléculas laterais na superfície de um líquido, uma vez que não existem moléculas de água acima da superfície, uma determinada elasticidade é conferida aos líquidos (DALTIM, 2011) (Figura 1).

Figura 1- Interação das moléculas de água na superfície e no seio do líquido



Fonte: Autoria própria

É um fenômeno físico que pode ser observado na formação de gotas de água ou quando algum objeto consegue ficar em alguma superfície líquida sem se afundar (MARCELINO, 2016) (Figura 2).

Figura 2- Exemplo das forças superficiais de um líquido

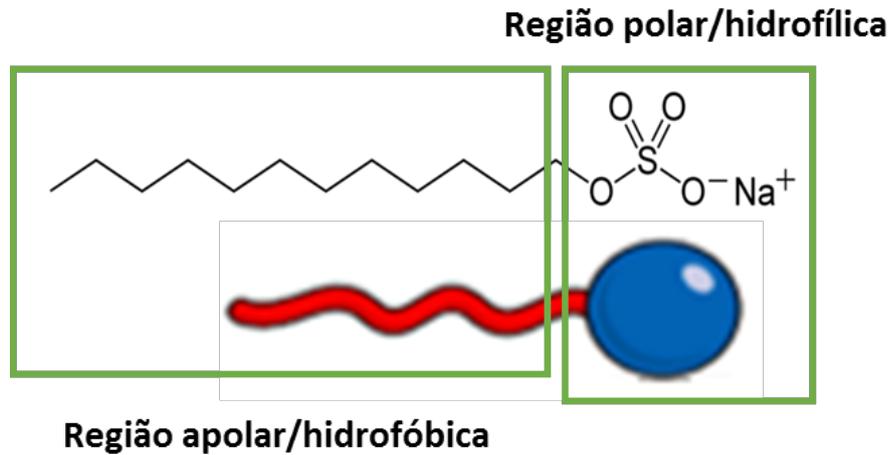
Fonte: Autoria própria

Em um líquido as moléculas da superfície, estariam sendo atraídas pelas moléculas da camada inferior, e pelas moléculas do lado, criando assim, um tipo de membrana a qual tem a força suficiente para suportar o peso de objetos sobre ela (MARCELINO, 2016).

2.1.2 Compostos ativadores de superfícies

Os surfactantes, termo originado da expressão *surface active agent*, refere-se aos compostos com estrutura molecular anfipática/anfifílica, ou seja, apresentam uma região polar/hidrofílica e outra apolar/hidrofóbica (Figura 3) e devido a isso são capazes de diminuir a tensão superficial de líquidos e emulsificar substâncias com diferentes polaridades, garantindo uma variedade de aplicações industriais a estas moléculas (HEALY et al., 1996; MARCELINO et al., 2017). Estes compostos são de interesse industrial auxiliando em processos de emulsificação, estabilização de formulações (tintas, praguicidas, etc.) e na remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos, assim como agentes redutores de viscosidade em concretos e na produção de cerâmicas, além de ser amplamente utilizados na indústria alimentícia (MARCELINO, 2016).

Figura 3- Estrutura e regiões polar e apolar de um biossurfactante.

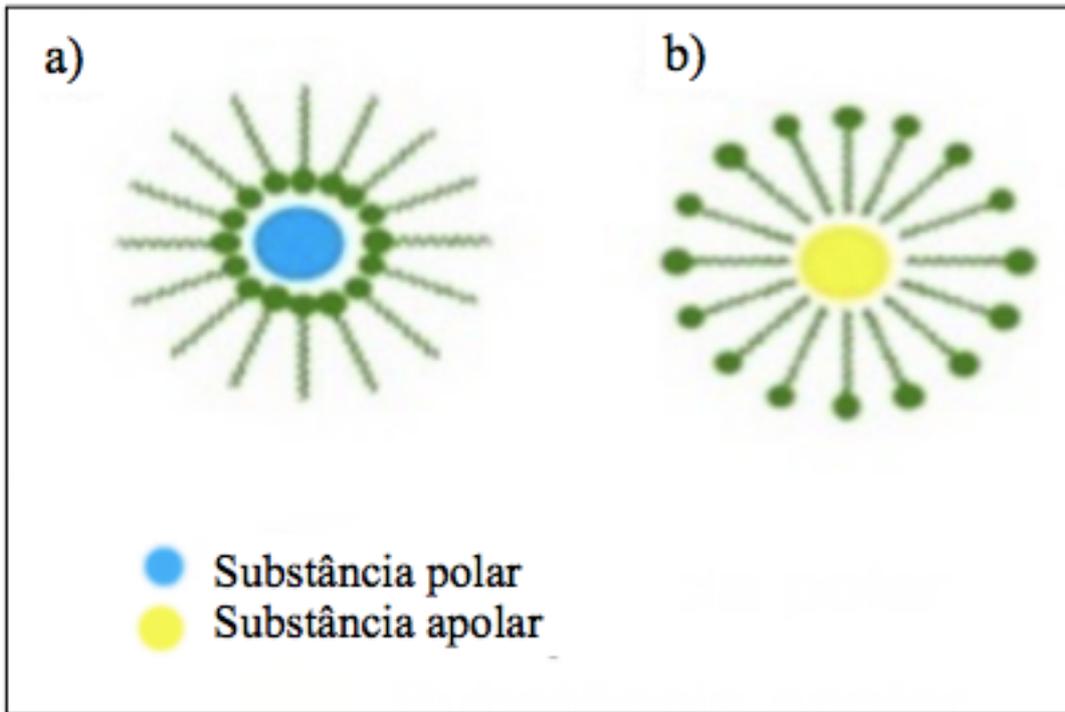


Fonte: Autoria própria.

De acordo com Zhang, Chai e Barnes (2017), outra importante propriedade é a sua capacidade de se organizarem em sistemas micelares. As micelas são agregados de moléculas de surfactante resultantes das interações químicas entre os grupos de cabeça polar do surfactante com substâncias polares e os grupos da cauda apolar com substâncias apolares.

A principal importância da micelização é que elas conferem aos surfactantes a capacidade de emulsificar, solubilizar, estabilizar e modificar a tensão superficial de compostos ou substâncias que comumente não são solúveis em água, como por exemplo óleos e gorduras. Diversos tipos de micelas têm sido descritos na literatura, em uma solução aquosa, quando há a presença de uma substância polar, as moléculas de surfactante se associam a partir da região polar (cabeça) e tem-se a chamada micela reversa ou inversa. Quando há a presença de uma substância apolar, as moléculas de surfactante se associam a partir da região apolar (cauda) formando o que é conhecido de micela normal (Figura 4).

Figura 4- Representação esquemática de: **a)** micela reversa ou invertida, **b)** micela normal.

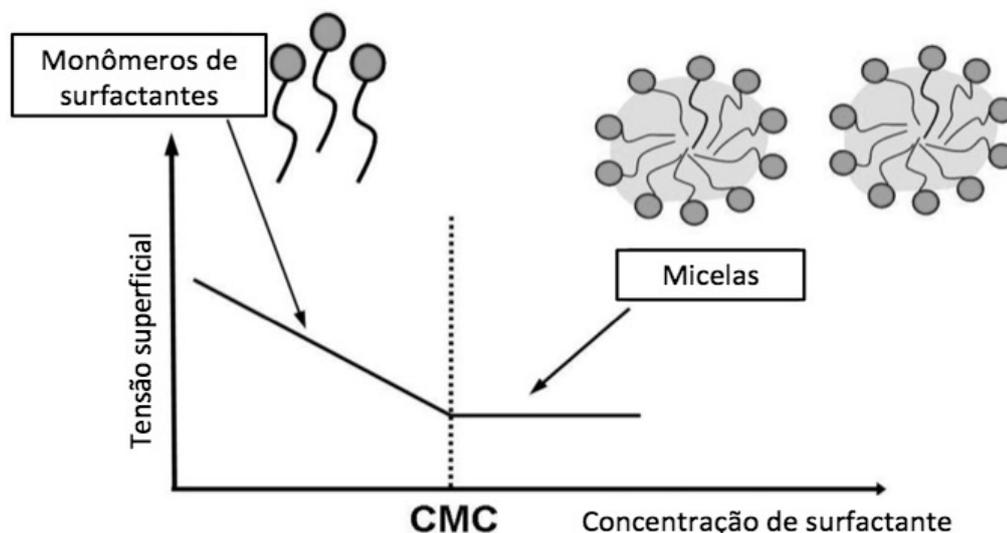


Fonte: Autoria própria

Quando um surfactante é colocado em uma solução, a tensão superficial tende a diminuir, até alcançar a concentração micelar crítica (CMC), a qual é definida como a concentração mínima de surfactante requerida para que aconteça a formação de micelas (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). A CMC é influenciada por parâmetros físico-químicos como temperatura, pH e condutividade determinando a aplicação do surfactante.

Acima da CMC a tensão superficial não diminui, permanecendo constante, como observado na Figura 5. Quando tem se uma solução aquosa misturada com poucas quantidades de tensoativo, as moléculas começam a se agrupar na superfície do líquido, assim que aumenta a concentração de surfactante na solução, as micelas começam a se formar, atingindo uma concentração micelar crítica e a tensão superficial começa a diminuir e se estabiliza.

Figura 5- Análise da tensão superficial de acordo com a concentração de surfactante em soluções aquosas.



Fonte: Adaptado de Pacwa-Płociniczak et al. (2011).

Com o aumento da concentração de surfactante, os monômeros do tenso-ativo tendem a se organizar em micelas, sendo alcançada a CMC.

Os surfactantes podem ser classificados de diversas formas, porém, a mais comum, adotada principalmente pela indústria, é baseada na carga presente na região polar (cabeça), conforme pode ser observado na Tabela 1, dividindo-os em quatro grandes grupos: catiônicos, aniônicos, anfóteros e não-iônicos (MULLIGAN; GIBBS, 2004).

Tabela 1- Classificação dos surfactantes baseada na carga da região polar

Tipo de surfactante	Carga presente na região polar	Principais exemplos
Catiônico	Positiva	Sal quaternário de amina graxa, sal quaternário de diamina graxa, sal quaternário de amônio, óxido de amina, etoxiamina e amina graxa etoxilada

(Continua)

Tipo de surfactante	Carga presente na região polar	Principais exemplos
Aniônico	Negativa	Alquil sulfato, alquil éter sulfato, alquilbenzeno sulfonato, alquil éter carboxilato e alquil fosfato
Anfóteros/ zwiteriônicos	Positiva/Negativa	Acil etilenodiaminas
Não-iônicos	Não há cargas	Álcool linear etoxilado, alquil fenol etoxilado, éster de ácido graxo, éter de sacarose, éster de <i>sorbitan</i> , alquilglicosídeo e éster de poliglicerol

Fonte: Adaptado de Daltin, 2011.

Além da classificação baseada na carga presente na parte polar, recentemente, os surfactantes vêm sendo divididos em sintéticos e naturais. Os surfactantes sintéticos são produzidos a partir de derivados do petróleo, como por exemplo, o para-dodecilbenzenossulfonato de sódio (SDS) e o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) enquanto os naturais ou biossurfactantes (BS), sintetizados por plantas (saponinas), animais (fosfolipídeos, sais biliares e surfactantes pulmonares) e microrganismos (glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas) (VAN BOGAERT et al., 2007; MARCHANT; BANAT, 2012).

Considerando as propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, as aplicações industriais apresentadas pelos surfactantes sintéticos apresentadas na Tabela 2, o mercado para estes produtos têm se mostrado em expansão nas últimas décadas. Conforme dados da *Markets & Markets*, o valor estimado do mercado global de surfactantes até 2021 é de aproximadamente 40 bilhões de dólares. As principais indústrias produtoras de surfactantes são Akzo Nobel N.V. (Holanda), Air Products and Chemicals, Inc. (Estados Unidos.), BASF SE (Alemanha), Clariant AG (Suíça), e Du Pont de Nemours and Company em Estados Unidos.

Tabela 2- Principais aplicações industriais dos surfactantes químicos

Indústria	Aplicações
Têxtil	<ul style="list-style-type: none"> • Remoção de ceras naturais presentes em fibras de algodão • Dispersão de pigmentos e corantes • Amaciante de fibras • Aumento da resistência de tecidos em emulsões de resinas
Couros	<ul style="list-style-type: none"> • Remoção das gorduras naturais • Melhoramento da aparência e a resistência do couro
Petrolífera	<ul style="list-style-type: none"> • Fluidificantes • Emulsificantes de produtos utilizados na pavimentação de ruas • Aditivos de gasolina
Agroquímica	<ul style="list-style-type: none"> • Homogeneização de agroquímicos • Dispersantes de diluições de géis • Auxiliam na formação de filmes e misturas mais finos e homogêneos quando são aplicados em plantas
Alimentícia	<ul style="list-style-type: none"> • Homogeneização de gorduras em água • Umectação e dispersão em processos de hidratação
Construção civil	<ul style="list-style-type: none"> • Redução de viscosidade em concretos • Impermeabilizantes • Produção de cerâmicas
Tintas	<ul style="list-style-type: none"> • Dispersantes, solubilizantes e emulsificantes de óleos, resinas e pigmentos
Cosméticos	<ul style="list-style-type: none"> • Ajustadores de viscosidade em formulações • <i>Drug delivery</i> • Remoção de gorduras naturais de peles oleosas • Hidratação da pele

Fonte: Adaptado de Daltin (2011) e Marcelino (2016).

Conforme apresentado na Tabela 2, os surfactantes sintéticos tem como principal nicho a indústria de produtos de limpeza, como na formulação de sabões e detergentes, a indústria petrolífera e a indústria de cosméticos e produtos de higiene pessoal (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Apesar da importância dos surfactantes sintéticos para as indústrias e a sociedade moderna, estes produtos vêm causando grandes complicações ao meio ambiente, pois esgotos domésticos e industriais possuem elevadas quantidades de detergentes. A descarga não-controlada de substâncias surfactantes nas águas, pode levar a prejuízos ambientais e estéticos, como o que ocorre frequentemente na cidade de Pirapora de Bom Jesus, onde a espuma formada no Rio Tietê se espalha pela cidade nas épocas de estiagem (Figura 5).

Figura 6- Espuma formada no Rio Tietê na cidade de Pirapora de Bom Jesus



Fonte: Arquivo pessoal.

Segundo Lewis, (1991) e Mann (2009), além da formação de espuma, os surfactantes sintéticos também são responsáveis pela inibição do crescimento e morte de microrganismos de importância biológica, como por exemplo, as bactérias fixadoras de nitrogênio e algumas microalgas.

Outros estudos apontam também, os detergentes sintéticos como responsáveis pelo processo de eutrofização de lagos e rios assim como responsáveis por causar a diminuição de populações de espécies de anfíbios e outros organismos vivos (DE WOLF; FEIJTEL, 1998; MANN et al, 2009)

Embora atualmente exista uma grande diversidade de surfactantes sintéticos no mercado (Tabela 3), novas tecnologias para produção dessas moléculas com as mesmas características que os surfactantes sintéticos e que possam evitar danos a natureza, estão sendo desenvolvidas na América Latina. Esta região se apresenta como um importante polo produtor de matérias-primas renováveis que podem ajudar a viabilizar processos de sínteses de bioprodutos. (BRUMANO; SOLER; DA SILVA, 2016).

Tabela 3- Surfactantes sintéticos no mercado: tipo de molécula e CMC

Surfactante	Tipo de molécula	CMC* (% m/V)
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	Aniônico/surfactante sintético	0,2
Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB)	Catiônico/surfactante sintético	-
3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio-1-propanosulfonato (CHAPS)]	Zwiteriônico/surfactante sintético	0,49
Ramnolípídeo (extrato bruto)	Aniônico/biossurfactante	0,0013
Soforolípídeo (extrato bruto)	Aniônico/biossurfactante	0,0082
Saponina	Não-iônico/biossurfactante	0,1

*CMC: concentração micelar crítica

Fonte: Kłosowska-Chomiczewska et al. (2017) e Kim et al. (2005)

Visando propor novas alternativas de substâncias surfactantes, os biossurfactantes microbianos têm se destacado frente aos surfactantes sintéticos na atualidade devido as suas características ecologicamente corretas. Os BS apresentam elevada biodegradabilidade e baixa toxicidade e a possibilidade de sua produção a partir utilização de matérias-primas renováveis, como os subprodutos agroindustriais. Além disso, possuem propriedades tensoativas e emulsificantes destacadas (Tabela 3), quando comparados aos similares sintéticos. Alguns apresentam atividades biológicas importantes, tais como,

efeitos antitumorais, antimicrobianos e larvicidas, ampliando ainda mais as opções de aplicações industriais destes compostos (MARCELINO et al., 2017).

2.2 Biossurfactantes: conceitos e tipos

Os Biossurfactantes (BS) microbianos são metabólitos primários ou secundários que ao serem secretados, modificam a tensão superficial/interfacial de líquidos e emulsificam substratos insolúveis (UZOIGWE et al., 2015)

Atualmente foram descritas mais de 2000 estruturas destes compostos e apesar do termo biossurfactante ser utilizado extensivamente para descrever tanto os tensoativos como os emulsificantes biológicos, recentemente, alguns autores têm contestado tal definição, e recomendam classificá-los em dois grupos distintos: os biotensoativos/biossurfactantes e bioemulsificantes (UZOIGWE et al., 2015).

Devido a diversidade estrutural que os BS apresentam, geralmente são classificados em glicolipídeos, fosfolipídeos, lipopeptídeos/lipoproteínas, ácidos graxos, lipídeos neutros e poliméricos. Os tipos mais comuns de BS citados pela literatura são o glicolipídeos, lipopeptídeos e os poliméricos. Ressalta-se que o tipo de BS produzido depende do microrganismo e das condições nutricionais (fontes de carbono) e de cultivo (pH, temperatura, aeração e agitação) empregadas no processo (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Segundo Randhawa (2014) existem pelo menos cinco grandes categorias de BS:

Glicolipídeos

Geralmente são moléculas compostas de carboidratos ligados às cadeias de ácidos graxos de origem lipídico, são considerados BS de baixa massa molar (ELDIN; KAMEL; HOSSAM, 2019).

Fosfolipídeos e ácidos graxos

Os fosfolipídeos são lipídeos que contêm grupos fosfato na sua estrutura, enquanto os ácidos graxos são longas cadeias carboidratadas, podem conter desde dois até mais de vinte carbonos na sua estrutura.

Lipopetídeos e lipoproteínas

Classificados como biosurfactantes de alto peso molecular, os lipopetídeos e as lipoproteínas são peptídeos geralmente utilizados para carregar lipídeos no sangue que são insolúveis em água; apresentam propriedades antimicrobianas.

Biosurfactantes poliméricos

Geralmente utilizados para estabilizar emulsões e suspensões em sistemas aquosos; são biosurfactantes de alto peso molecular com propriedades de viscosidade, geralmente utilizados em amplos processos industriais.

Biosurfactantes particulados

São compostos de alto peso molecular e estrutura complexa, membranas e vesículas extracelulares são exemplos destes tipos de biosurfactantes.

Além disso, surfactantes biológicos também podem ser classificados de acordo com suas massas molares, em BS com alta massa molar e BS com baixa massa molar. A Tabela 4 apresenta alguns tipos de BS produzidos quanto a sua natureza estrutural e a os microrganismos produtores.

Tabela 4- Classificação de biosurfactantes e microrganismos produtores

Tipo de biosurfactante	Microrganismos produtores
Glicolipídeos	
Micolatos de trealose	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter paraffineu</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>
Ésteres de trealose	<i>Mycobacterium fortium</i> , <i>Micromonospora sp.</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. paraffinicum</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>

(Continua)

(Continuação)

Tipo de biossurfactante	Microrganismos produtores
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola/apicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Candida</i> sp.
Floculosina	<i>Pseudomonas flocculosa</i>
Fosfolipídeos e ácidos graxos	<i>Candida</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Mycococcus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Syringomicina, Siringopeptina	<i>Pseudomonas syringae</i>
Polimixina E1	<i>Bacillus polymyxa</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Ornitina-lipídeo	<i>Pseudomonas rubescens</i> , <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Cerilipina	<i>Glucunobacter cerius</i>
Serrawetina W1, W2, W3	<i>Serratia marcescens</i>
Lisina-lipídeo	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Surfactina, subtilisina, subsporina	<i>Bacillus subtilis</i>

(Continua)

(Continuação)

Tipo de biossurfactante	Microrganismos produtores
Amfomicina	<i>Streptomyces canus</i>
Clamidocina	<i>Diheterospora chlamydosporia</i>
Ciclosporina A	<i>Tolypocladium in atum</i>
Enduracidina A	<i>Streptomyces fungicidicus</i>
Globomicina	<i>Streptomyces globocaciense</i>
Bacilomicina	<i>Bacillus subtilis</i>
Iturina A	<i>Bacillus subtilis</i>
Putisolvina I and II	<i>Pseudomonas putida</i>
Artrofactina	<i>Arthrobacter</i>
Fengicina (Plipastatina)	<i>Bacillus thuringiensis CMB26</i>
Micobacilina	<i>Bacillus subtilis</i>
Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>
Biossurfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus RAG-1,</i> <i>Arthrobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus A2</i>
Manoproteína	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Carboidrato-proteína	<i>Candida petrophillum, Endomycopsis</i> <i>lipolytica</i>

(Continua)

Tipo de biossurfactante	Microrganismos produtores
Manose/eritrose lipídeo	<i>Shizonella melanogramma, Ustiloga maydis</i>
Complexo carboidrato-proteína-lipídeo	<i>Pseudomonas uorescences, Debaryomyces polymorphus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Alasan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Proteína PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Biossurfactantes particulados	
Vesículas de membrana	<i>Acinetobacter sp. H01-N</i>

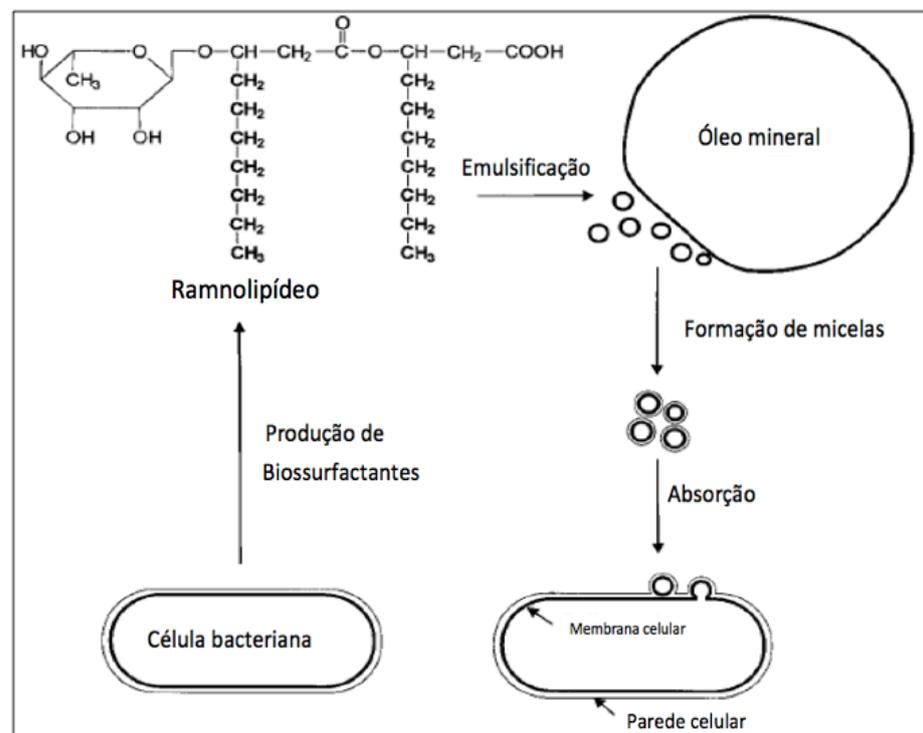
Fonte: Adaptado de RANDHAWA e RAHMAN (2014)

Conforme apresentado na Tabela 4, os BS são produzidos principalmente por bactérias, actinomicetos, leveduras e fungos filamentosos, porém, os procaríotos são os agentes produtores mais comuns e relatados. Nos últimos anos algumas leveduras e fungos filamentosos vêm se destacando na produção de BS por possuírem estruturas celulares mais resistentes aos BS secretados no meio de cultivo, tornando esses microrganismos importantes alvos de pesquisas para a produção desses metabólitos de interesse industrial (MONTEIRO et al., 2009).

Cameotra e Makkar (1998), descreveram a biossíntese de BS como um processo que incorpora duas rotas metabólicas: síntese de lipídeos/ácidos graxos e síntese de carboidratos. De acordo com Syldatk e Wagner (1987) e Hommel et al (1994), as partes hidrofílica e hidrofóbica poderiam ser sintetizadas pela via *de novo* mediante duas rotas independentes, ou a parte hidrofílica ser sintetizada pela via *de novo* enquanto a parte hidrofóbica ser induzida pelo substrato, a participação da síntese *de novo* na formação da parte hidrofóbica também foi descrita como uma possibilidade assim como que as duas partes, polar e apolar, sejam sintetizadas dependendo do substrato

Segundo os trabalhos realizados por Ito e Inoue (1982), O'Sullivan (1997), e Campos et al. (2013), uma das explicações mais aceitas para a produção dos BS pelos microrganismos descreve essa biomolécula como uma estratégia para facilitar o transporte e incorporação de substratos insolúveis (hidrocarbonetos e óleos) para o interior da célula (Figura 7).

Figura 7- Absorção celular de substratos hidrofóbicos por microrganismos mediante a excreção de biossurfactantes.



Fonte: Adaptado de RON e ROSNBERG (2002)

Na Figura 6 pode-se observar o esquema de incorporação de um substrato insolúvel (óleo) por uma célula bacteriana mediante a excreção de um ramnolipídeo. Chaves (2017) relata que os BS podem ser excretados no meio de cultura facilitando a solubilização de substratos ou permanecer aderentes a parede celular promovendo o transporte através da membrana.

A diversidade estrutural dos BS e suas propriedades físico-químicas e biológicas refletem em suas inúmeras aplicações sendo produtos importantes nas indústrias petroquímica, farmacêutica, alimentícia, química e de mineração, servindo principalmente, como emulsificantes, dispersantes, detergentes, espessantes, agentes quelantes, formadores de vesículas e antimicrobianos (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Ainda no que se refere as aplicações dos BS, tem-se como exemplos típicos:

- Na indústria alimentícia, Campos et al. (2013) os descreveram como importantes emulsionantes de óleos e gorduras.
- Na indústria química e petroquímica, Nguyen et al. (2010) utilizaram microemulsões de BS como detergentes, Banat; Makkar e Cameotra (2000), descreveram os BS como os melhores candidatos para substituir a os surfactantes sintéticos na indústria petroquímica e na limpeza de tanques industriais sujos com substratos hidrofóbicos.
- Na agricultura e meio ambiente, Ron e Rosenberg (2002), e Sachdev e Cameotra (2013), mostraram os BS como importantes auxiliares na biorremediação de solos poluídos com hidrocarbonetos e na degradação de pesticidas que se acumulam no solo. Banat; Makkar e Cameotra (2000), relataram o uso de BS como dispersantes de pesticidas e fertilizantes, agentes potenciadores da penetração de compostos ativos em plantas e na biorremediação de solos contaminados com metais pesados.
- Nas indústrias farmacêutica e médica, Brown (1991) e Lourith e Kanlayavattanakul (2009) descreveram os soforolípídeos, ramnolípídeos e outros tipos de BS como tensoativos e emulsificantes em formulações de cosméticos e produtos de cuidados pessoais. Os BS também podem ser utilizados como agentes antimicrobianos para impedir a formação de biofilmes de patógenos em superfícies cirúrgicas (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2016). Outros trabalhos relatam a utilização dos BS na recuperação de proteínas e outros compostos celulares de interesse farmacêutico (GHARAEI-FATHABAD, 2011). Os BS tem sido reportados como agentes antitumorais (GUDIÑA et al., 2013).

2.3 Mercado dos BS e cenários futuros como substitutos dos surfactantes sintéticos

Devido a grande aplicação dos BS, suas perspectivas de mercado para os próximos dois anos são promissoras com um aumento da produção em 4,3 % atingindo um volume de 462 mil toneladas e uma arrecadação de 2,2 bilhões de dólares. Os países da Europa e da América do Norte são responsáveis por 75 – 80 % do consumo global de biossurfactantes, enquanto os países emergentes e da Ásia- Pacífico, 20 – 25 %.

Tabela 5- Algumas aplicações dos biossurfactantes

Tipo de BS	Segmento industrial aplicado
Soforolipídeos	Indústria farmacêutica; Indústria química; Indústria petrolífera, Agricultura
Glicolipídeos	Indústria química; Indústria farmacêutica
Consórcio de biossurfactantes (EC-601, EC-1800, EC-2100W)	Indústria petrolífera, Indústria química
Alquilpoliglicosídeo (APG®), <i>Plantcare</i> 1200 GLY e <i>Rheocare</i> TTA	Indústria química, Indústria farmacêutica, agricultura
Sophoron ®	Indústria farmacêutica, Indústria química
Ramnolipídeos com alto grau de pureza (90, 95 e 98%)	Indústria farmacêutica, Indústria petrolífera
Ramnolipídeos (Zonix/Reco)	Indústria farmacêutica

Fonte: Adaptado de MARCELINO (2016) e BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA (2000).

Conforme relatado, os BS são substâncias de fundamental importância para o desenvolvimento sustentável global, porém, a produção em larga escala destes bioprodutos ainda é restrita aos custos. As matérias-primas utilizadas no processo produtivo de BS podem representar até 30 % do custo final (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Como por exemplo o BS surfactina com uma pureza de 98 %, comercializado pela empresa *Sigma-Aldrich* tem um valor no mercado de R\$ 198,3/mg e o BS RAG-1 produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* tem um preço de R\$ 200/Kg, enquanto os surfactantes sintéticos custam aproximadamente R\$ 7/Kg (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Além dos custos com matérias primas, os processos de *downstream* a serem realizados no isolamento e purificação dos BS também refletem no preço final desses bioprodutos.

Uma forma de viabilizar economicamente a produção industrial dos BS visando a substituição total dos surfactantes sintéticos é a utilização de matérias-primas renováveis e de fácil acesso tais como os subprodutos agroindustriais, além de estudar e adotar novas estratégias de isolamento e purificação destas biomoléculas.

2.4 Utilização de subprodutos agroindustriais na produção de biosurfactantes e as biorrefinarias lignocelulósicas

Dentro dos principais problemas ambientais do mundo atual encontram-se as emissões de gases do efeito estufa (GHG). Estes gases são consequência da utilização dos combustíveis fósseis e a dependência da sociedade moderna do petróleo e seus derivados. Nas últimas décadas tem sido desenvolvidas pesquisas para tentar mitigar ou remediar os efeitos negativos do recorrente uso do petróleo e ao mesmo tempo tornar a sociedade contemporânea menos dependente do setor petroquímico.

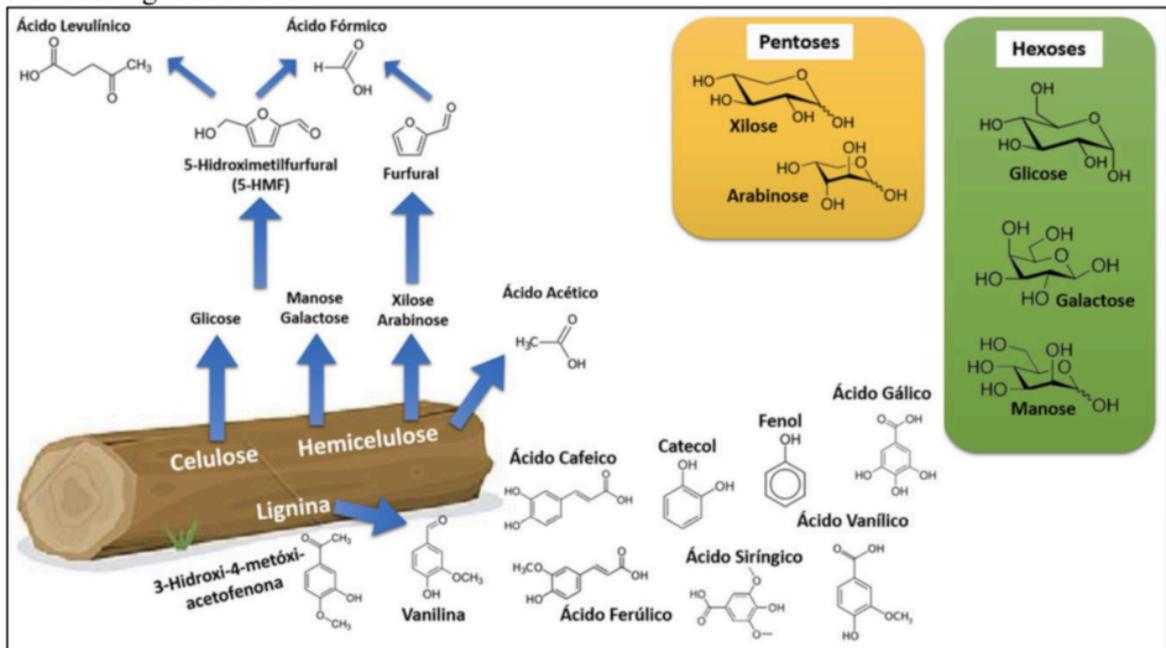
Uma das alternativas para tentar minimizar os problemas de dependência do petróleo e seus derivados é a utilização de biomassas lignocelulósicas como matéria-prima para a obtenção dos chamados bioprodutos a partir de processos biotecnológicos e assim consolidar o conceito das biorrefinarias lignocelulósicas, nas quais, a maior parte da biomassa lignocelulósica possa ser aproveitada na produção de produtos com alto valor agregado (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

2.4.1 Biomassa Lignocelulósica

A parede celular de vegetais é composta principalmente por celulose e hemicelulose, lignina e algumas proteínas. A porcentagem de cada fração vai depender da espécie e o origem da biomassa.

As matérias primas, provenientes da biomassa lignocelulósica são de extrema importância para a biotecnologia devido a sua estrutura, visto que em sua composição majoritária encontram-se polímeros como a celulose, hemicelulose e macromoléculas como a lignina (Figura 8).

Figura 8- Principais componentes da biomassa lignocelulósica



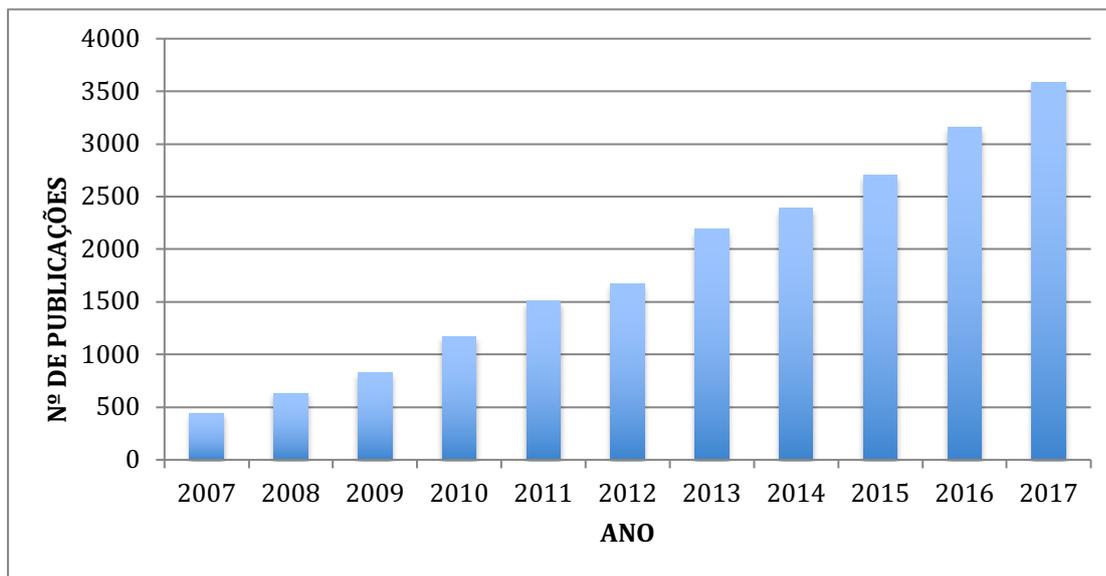
Fonte: Marcelino (2016)

A fração glicídica presente nas biomassas lignocelulósicas pode ser depolimerizada. Esses compostos podem ser despolimerizados por procedimentos químicos e/ou biológicos ser transformada em monômeros e ser utilizados como substrato em processos fermentativos (TERÁN-HILARES, 2017).

Apesar do potencial biotecnológico, a biomassa lignocelulósica ainda não tem sido totalmente explorada, como exemplo, temos o bagaço de cana-de-açúcar gerado na indústria sucroalcooleira brasileira, onde apenas uma parte deste subproduto é utilizado na geração de energia por combustão e o excedente é subutilizado, sendo comercializado na forma de rações sem aplicações mais nobres.

Visando agregar valor a biomassa lignocelulósica e ao mesmo tempo abranger conceitos de química verde, sustentabilidade e biotecnologia, a geração de bioprodutos a partir das frações celulósica, hemicelulósica e lignínica vêm sendo intensamente estudada na última década (Figura 9).

Figura 9- Evolução do número de publicações envolvendo biomassa lignocelulósica e biossurfactantes na última década



Fonte: Autoria própria

Porém, para o avanço na produção de produtos de alto valor agregado a partir da biomassa lignocelulósica e a concretização do conceito de biorrefinaria lignocelulósica ainda faz-se necessário um maior sinergismo entre academia e indústria e a adaptação de tecnologias adequadas para o aproveitamento integral da biomassa.

A cana-de-açúcar é uma cultura comum em países com clima tropical sendo o Brasil o maior produtor mundial, cuja safra 2017/2018 gerou em torno de 650 milhões de toneladas de cana. Após o processamento nas usinas sucroalcooleiras são geradas aproximadamente 170 toneladas de bagaço (50 % de umidade) (CANILHA et al, 2012). O bagaço da cana de açúcar apresenta em sua composição química 20 % de lignina, 25 % de hemicelulose e 42 % de celulose, e a possibilidade de hidrolisar a fração glicídica (celulose e hemicelulose) presente no bagaço de cana a monossacarídeos fermentescíveis, tais como glicose, xilose e arabinose, o torna uma importante matéria-prima para os processos biotecnológicos (RODRIGUES et al, 2003; CALDARÉLLI; DE MORAES; PASCHOALINO, 2017).

A seguir será apresentada uma breve descrição sobre a composição e as principais características da biomassa lignocelulósica:

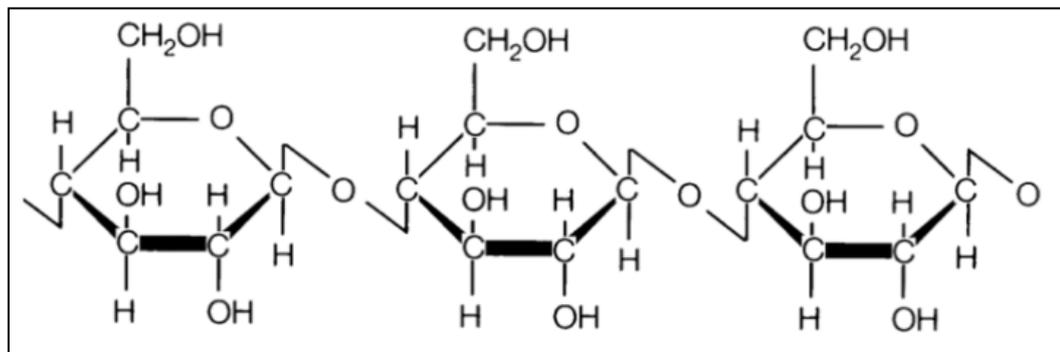
Celulose

A celulose é o principal componente da biomassa lignocelulósica, é um polissacarídeo de alta massa molecular formado por unidades de glicose unidas por ligações β (1-4). Se apresenta como uma substância fibrosa insolúvel em água sendo considerado o biopolímero mais abundante do planeta.

A celulose é encontrada principalmente na parede celular de plantas, porém, pode ser sintetizada por alguns animais e microrganismos, e são as fibras de plantas e madeira (42 % de celulose) as maiores fontes deste material no planeta.

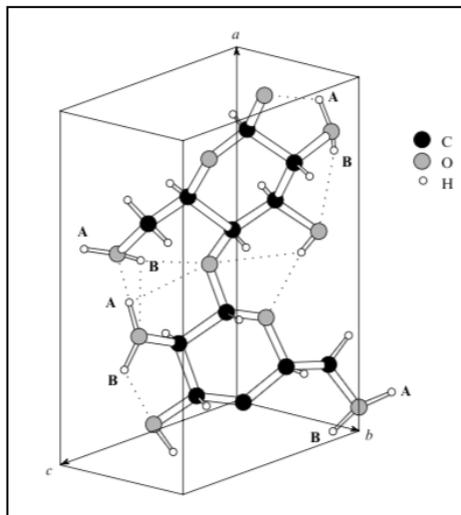
Foi isolada por primeira vez pelo químico Anselme Payen (1795-1871), apresenta uma estrutura linear composta por unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas β (1-4). O número de unidades de glicose em uma cadeia de celulose pode variar dependendo da origem, e pode estar na faixa de 1000 a 50000 formando um polímero linear (Figura 10); devido às múltiplas interações entre os grupos OH das β -D-glicose, a celulose tende a formar pontes de hidrogênio.

Figura 10- Parte da estrutura da Celulose



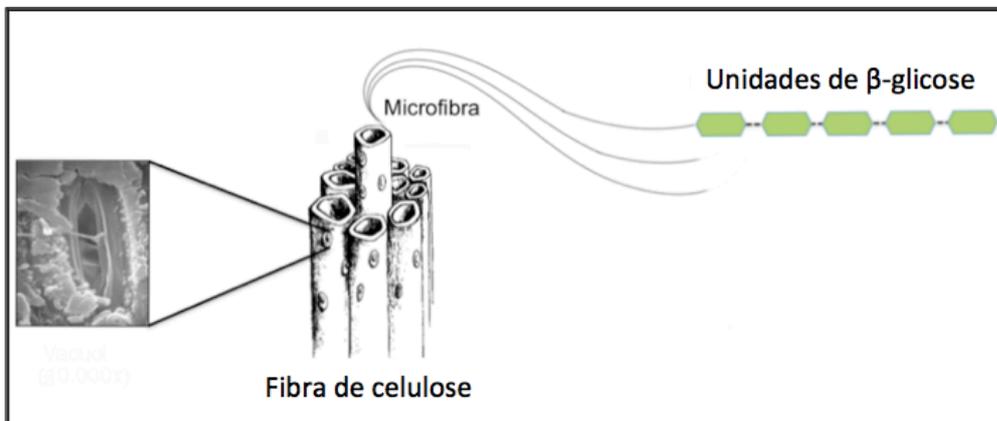
Fonte: Adaptado de Thygesen et al (2005)

A celulose tende a formar pontes de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 11), tem um grau de polimerização elevado, forma arranjos fibrosos e leva a formação de regiões amorfas e cristalinas (O'SULLIVAN, 1997; ANTUNES, 2015). Dependendo do arranjo das cadeias de celulose, são geradas nas fibrilas regiões “ordenadas” ou cristalinas e regiões “desordenadas”; as regiões ordenadas são conhecidas como cristalinas.

Figura 11- Estrutura química da celulose formando pontes de hidrogênio

Fonte: Kovalenko (2010)

Nas plantas, as moléculas de celulose tendem a se alinhar, formando micro e microfibrilas, as quais a sua vez se ordenam para formar as paredes celulares das fibras de celulose (Figura 12).

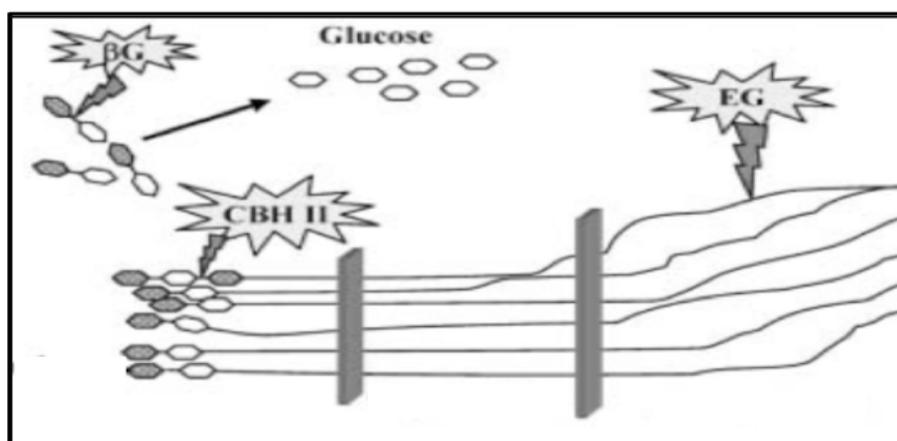
Figura 12- Fibras e microfibras de celulose na estrutura da biomassa celulósica

Fonte: Autoria própria

Para a obtenção de açúcares fermentescíveis (glicose) a partir da celulose, é necessária a degradação das fibrilas, sendo os tratamentos químicos e enzimáticos dos mais utilizados (D'ALMEIDA; AQUINO; MONTEIRO, 2006). Segundo Thygesen et al. (2005), os tratamentos enzimáticos para a despolimerização da celulose são feitos com exoglucanase para celulose cristalina e endoglucanase para celulose amorfa.

Na natureza existem microrganismos que possuem a capacidade de degradar ou hidrolisar a celulose pela utilização de um grupo de enzimas conhecidas como celulases. As celulases são classificadas em endoglucanases, as quais rompem as ligações internas das fibras de celulose principalmente nas regiões amorfas; celobiohidrolases, as quais atuam nos finais das cadeias geradas pela ação das endoglucanases, liberando moléculas de celobiose (dímeros de glicose), posteriormente estes dímeros serão hidrolisados a monômeros de glicose, como pode ser observado na figura 13.

Figura 13- Liberação de monômeros de glicose mediante a ação de enzimas celulases

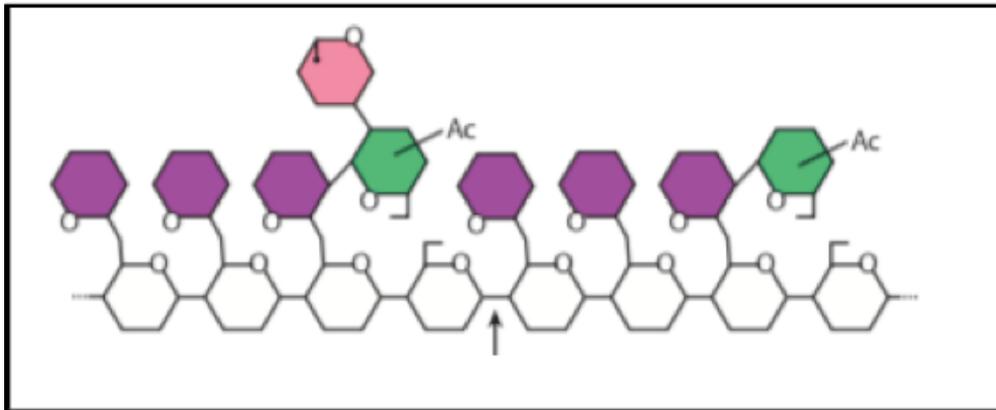


Fonte: Pérez et al (2002)

Em resíduos agroindustriais, a porcentagem de celulose é em torno de 40 % e muitos dos chamados “*petroleum-based products*” tais como plásticos, membranas, materiais de medicina, absorventes e fibras estão sendo substituídos por “*bio-based products*” sintetizados a partir de estas materias-primas renováveis (PHINICHKA; KAENTHONG, 2018).

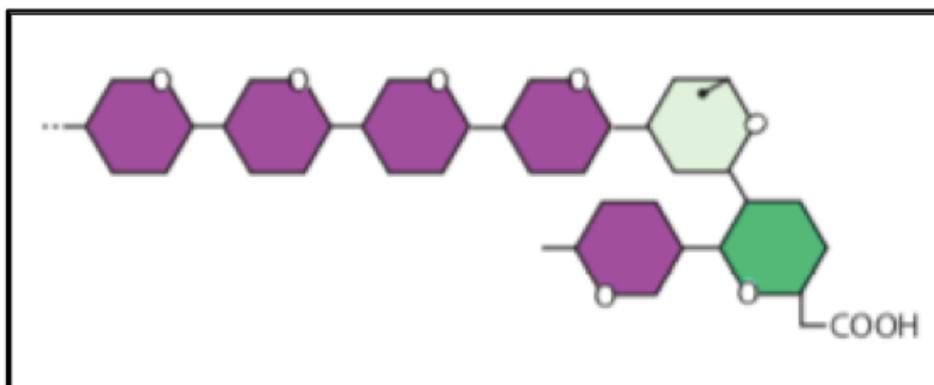
Hemiceluloses

São polissacarídeos de diferente composição estrutural, representam a segunda maior fração da biomassa lignocelulósica, e a sua composição vai depender da origem da biomassa. É o segundo polissacarídeo mais comum na natureza e a diferença da celulose, apresenta uma estrutura heterogênea principalmente composta por polímeros de pentoses e hexoses e representa 25-30 % da massa seca total da biomassa. Hemiceluloses incluem xiloglucanas, xilanas, mananas e glicomananas, e β -(1→3,1→4)-glucanas (Figura 14).

Figura 14- Estrutura química de uma Xiloglucana

Fonte: Scheller e Ulvskov (2010)

Hemiceluloses tem um grau de polimerização baixo, e a diferente da celulose, não formam arranjos fibrosos e regiões cristalinas, e como consequência a estabilidade físico-química é menor que da celulose. Fisicamente é um material sólido, esbranquiçado e amorfo; o polissacarídeo mais comum dentro das hemiceluloses isoladas na madeira é a xilana apresentada na figura 15 (YANG et al, 2007; MORÁN et al, 2008).

Figura 15- Estrutura química de uma xilana

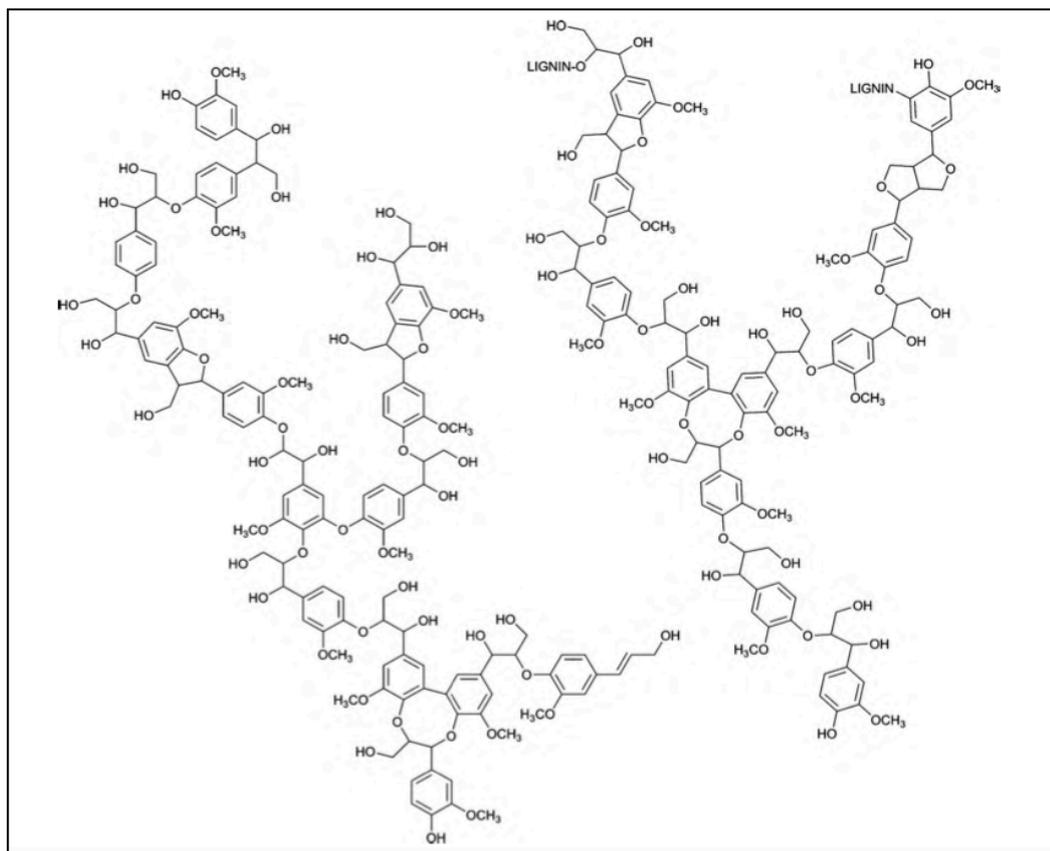
Fonte: Scheller and Ulvskov (2010)

Outros exemplos de hemiceluloses são a galactana e a arabinana, nomes dados a os polímeros quando as cadeias principais são formadas, por galactose e arabinose respectivamente. As hemiceluloses são importantes fontes renováveis de açúcares pentoses (C5), o qual as torna como uma importante fonte de substrato para processos biotecnológicos que envolvem o metabolismo de pentoses.

Lignina

A lignina é a terceira fração da biomassa lignocelulósica, sendo a responsável pela rigidez das plantas, na sua composição química encontram-se principalmente compostos aromáticos (Figura 16).

Figura 16- Representação da estrutura química da lignina



Fonte: Crestini et al. (2010)

É um dos subprodutos da indústria do papel, ao mesmo tempo é considerada uma fonte renovável de compostos químicos aromáticos e a sua desestruturação é um dos principais fatores para sua utilização como fonte de monómeros. (BOERJAN et al, 2003; RAHIMI et al, 2014).

Dentro dos principais grupos funcionais encontrados na lignina encontram-se:

- Grupos carbonilas (-CO-) e carboxilas (-COOH)
- Grupos éteres (R-O-R')
- Grupos ésteres (R-COO-R')
- Grupos hidroxilas (-OH)

- Grupos metoxilas (-O-CH₃)
- Fenóis

Dentre as três frações que compõem o bagaço de cana-de-açúcar, a hemicelulósica ainda é a menos explorada, sendo de fundamental necessidade o desenvolvimento de novas pesquisas para um melhor aproveitamento desta fração, principalmente em bioprocessos. Alguns trabalhos recentes apontam o potencial da utilização da hemicelulose na produção de diversos bioprodutos, tais como, etanol (CHANDEL et al., 2007), xilitol (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016) e biopolímeros (TERÁN-HILARES et al., 2017). No presente trabalho será estudado o potencial do hidrolisado hemicelulósico na produção de BS por leveduras.

2.5 Produção sustentável de BS: o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar como uma matéria-prima alternativa

Na literatura tem sido reportadas como matérias-primas convencionais para produção de BS óleos e gorduras de origens animal e vegetal, hidrocarbonetos, carboidratos e alguns efluentes industriais ricos em matéria orgânica (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; MERCADE; MANRESA, 1994; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Não entanto, a limitação do uso destas matérias-primas na produção atual de BS deve-se ao fato do elevado preço, o baixo volume gerado, e conseqüentemente, a disponibilidade e o teor de nutrientes também. Neste aspecto, o hidrolisado hemicelulósico enquadra-se como uma matéria-prima alternativa para a produção de BS concretizando e fortalecendo o conceito das biorrefinarias lignocelulósicas, como mais uma alternativa de bioproduto de alto valor agregado a ser produzido.

A biomassa lignocelulósica pode ser submetida a tratamentos físico-químicos como os processos de hidrólises ácida e ou alcalina, onde os polímeros que compõem a biomassa lignocelulósica são fracionados e solubilizados em monômeros fermentáveis. Dentro dos principais procedimentos de hidrólise encontram-se os tratamentos utilizando ácidos clorídrico (HCl) e sulfúrico (H₂SO₄), os quais despolimerizam a fração hemicelulósica principalmente em xilose (C₅), além de pequenas frações de arabinose, manose, galactose e glicose (CHANDEL; DA SILVA; SINGH, 2013).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol de primeira geração (KIM; DALE, 2004). No entanto, o potencial da cana-de-açúcar para a geração de biocombustíveis ou bioprodutos no conceito de biorefinaria ainda não tem sido 100 % explorado, principalmente devido as operações unitárias posteriores necessárias para a obtenção dos bioprodutos tais como etanol de segunda geração (2G), ácidos orgânicos e polióis (BOZELL; PETERSEN, 2010). Além da cana-de-açúcar, o Brasil é um importante produtor de soja, milho e trigo (Tabela 6)

Tabela 6- Área cultivada (ha) e biomassa produzida (Ton) dos principais cultivos agrícolas no Brasil

CULTIVO	AREA (1000 ha)	BIOMASSA PRODUZIDA (1000 t)
Trigo	2.16	5.78
Arroz	2.42	11.60
Sorgo	785,1	2.20
Mandioca	1.78	24.52
Soja	25.04	66.38
Ricino	129,6	25,8
Milho	7.59	38.86
Cana de açúcar	8.52	602.17
Cevada	88,4	305,1

Fonte: Adaptado de CANILHA et al. 2012.

Apesar das grandes oportunidades para a obtenção de bioprodutos utilizando biomassas lignocelulósicas, os trabalhos reportados na literatura para a obtenção de BS a partir de resíduos agro-industriais ainda são poucos.

2.6 Produção de BS em reatores

Entre os produtos que podem ser obtidos por processos biotecnológicos, os BS têm se destacado nos últimos anos. Diversos tipos de reatores têm sido reportados na literatura para produção de BS em processos biotecnológicos conforme pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7- Alguns tipos de reatores utilizados na produção de biossurfactantes.

MICROORGANISMO	REATOR	FONTE DE CARBONO	TENSÃO SUPERFICIAL MINIMA (mN m ⁻¹)	REFERÊNCIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CSTR (Batelada simples)	Glicose	29	GUERRA-SANTOS et al. (1984)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CSTR (Proceso continuo)	Glicose	35	GUERRA-SANTOS et al. (1984)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	<i>Solid-state cultivation</i> (SSC)	Bagaço de cana de açúcar e farelo de milho	ND	CAMILIOS-NETO et al. (2011)
Consortio microbiano	CSTR (Proceso continuo)	<i>Soil Slurry</i>	ND	CASSIDY e HUDAK (2001)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	SBRS (<i>Sequencing batch reactor</i>)	Óleo de palma e glicose	ND	PANSIRIPAT et al. (2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	SBRS (<i>Sequencing batch reactor</i>)	Óleo de palma	28	PORNSUNTHORNTAWEE et al. (2009)

Fonte: Arquivo pessoal

Guerra-Santos; Kappeli e Fiechter (1984) estudaram a produção de ramnolipideos por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando glicose como fonte de carbono (18,2 g/L) em um reator de tanque agitado (STR).

Cassidy e Hudak (2001) trabalharam com reator de fluxo contínuo (CSTR) e um *soil slurry-sequencing batch reactor* (SS-SBR) para avaliar a produção de biossurfactantes,

no entanto, não foi detectada produção de biosurfactantes no reator CSTR, enquanto em SS-SBR muita formação de espuma foi detectada.

Pansiripat et al. (2010) estudaram o efeito do óleo de palma na produção de ramnolipideos por uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (SP4) em reatores de bateladas sequenciadas, a produção de biosurfactantes foi detectada pelos cambios na tensão superficial (redução de 58,5%); Pornsunthorntawee et al. (2009) avaliaram a produção de BS por uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* em um *sequencing batch reactor* observando uma redução na tensão superficial de 67 para 28 mN m⁻¹.

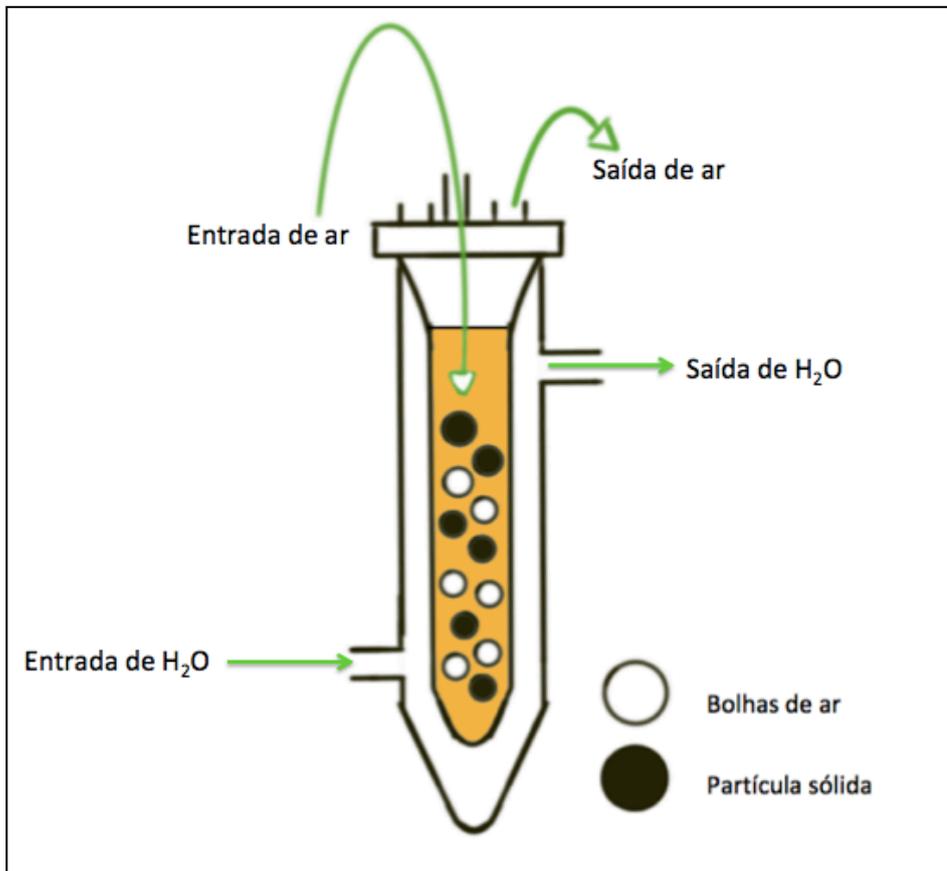
Embora os processos para produção de BS aparentam estar bem estabelecidos, um dos problemas mais comuns reportados na literatura é a excessiva formação de espuma durante o processo fermentativo causando entupimento das válvulas além da perda de microrganismo e volume de meio de cultivo. O uso de substâncias antiespumantes não é uma das melhores alternativas para evitar a formação de espuma durante a produção de BS pois pode afetar as propriedades da molécula produzida e inibir o crescimento microbiano.

Além disso, o uso de antiespumantes também pode interferir nos processos de purificação. Uma das soluções para evitar este problema na produção de BS é propor novos tipos de reatores e reatores de leito fluidizado tem sido propostos como uma alternativa para a produção de bioprodutos, sendo também uma das alternativas para produção de BS.

2.7 Reator de leito fluidizado como alternativa para a produção de BS

Os reatores de leito fluidizado (RLF) tem sido utilizados em processos de desnitrificação, em tratamentos de águas residuais da indústria têxtil, produção de nanotubos de carbono, remoção de metais pesados em águas residuais e produção de biodiesel (FIDALGO, 2014).

Os RLF (Figura 17), é um tipo de reator tubular com fundo cônico, sem agitação mecânica e uma das alternativas para produção de BS devido a que possuem certas vantagens quando são comparados com reatores que utilizam agitação mecânica como os STR.

Figura 17- Esquema de um reator de leito fluidizado com fundo cônico

Fonte: Autoria própria

Os RLF mantêm uma boa transferência de calor, uma ótima homogeneidade do meio de cultura pode ser alcançada, e não é necessária agitação mecânica ajudando a proteger as células de possíveis danos além de tornar os custos de energia elétrica necessária para o processo menores. O fenômeno de fluidização acontece quando partículas sólidas são suspensas em um fluxo geralmente ascendente até alcançar uma homogeneização dos sólidos na fase líquida o qual gera um ótimo contato entre as partículas sólidas e a fase líquida (meio de cultura) dentro do reator facilitando a incorporação dos nutrientes presentes no meio ao interior da célula (ANTUNES, 2015).

2.8 Imobilização celular, técnicas e vantagens em processos biotecnológicos

A imobilização celular é uma técnica de fixação de células em um suporte, que pode ser uma matriz porosa, um polímero, ou simplesmente uma superfície que permita a

interação da célula com os nutrientes do meio de cultura. Dentro dos materiais comumente usados na imobilização celular encontram-se o alginato de cálcio, a k-carragenina, o álcool polivinílico, o ágar, a gelatina, a quitosana e a poliacrilamida. A Tabela 8 apresenta algumas das principais técnicas ou metodologias de imobilização celular descritas por Antunes (2015).

Tabela 8- Principais técnicas de imobilização celular e suas características

Técnica	Características
Superfície	<ul style="list-style-type: none"> • Envolve a adesão de células a um suporte por meio de adsorção • Utiliza reagentes bifuncionais para as ligações intermoleculares entre as moléculas do catalisador (célula)
Auto-agregação de células por floculação	<ul style="list-style-type: none"> • Consiste em agregar ou flocular células de maneira natural • É o método de imobilização mais simples
Adsorção	<ul style="list-style-type: none"> • Baseia-se na adsorção dos catalisadores a uma matriz por meio de interações químicas
Retenção mecânica	<ul style="list-style-type: none"> • Envolve a utilização de barreiras pré-formadas como filtros de membrana microporosa e microcápsulas

Fonte: Adaptado de ANTUNES (2015).

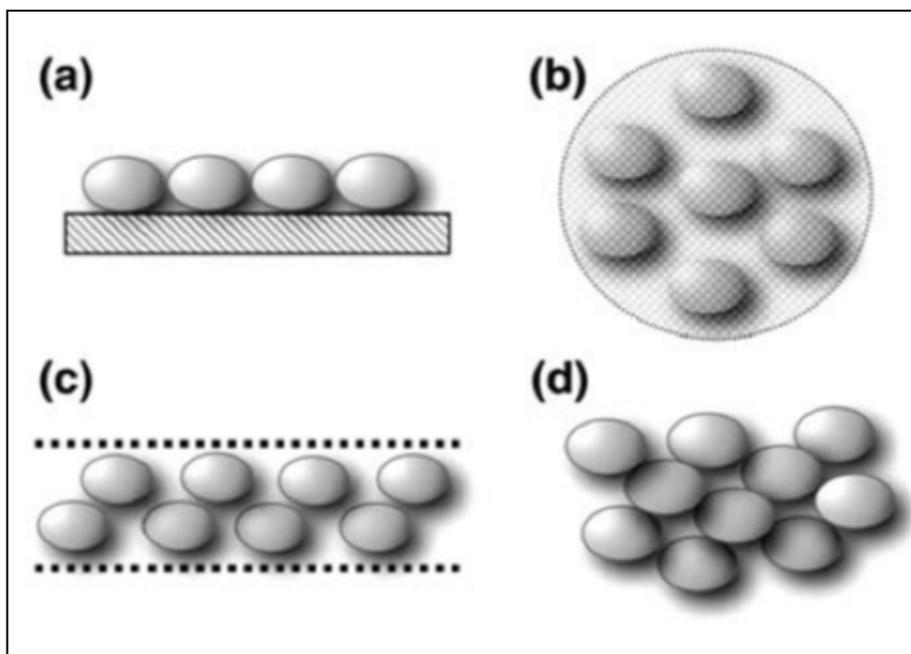
A imobilização celular permite aumentar a densidade celular no reator sem afetar negativamente o processo e propõem quatro mecanismos principais de imobilização celular:

- Fixação superficial (a)
- Incorporação dentro de uma matriz porosa (b)

- Fixação com ajuda de uma barreira (c)
- Auto-agregação (d)

A figura 18 apresenta os exemplos de imobilização celular descritos previamente.

Figura 18- Principais métodos de imobilização celular



Fonte: Verbelen *et al* (2006)

De acordo com Lee e Heo (2000) a imobilização celular em esferas de alginato de cálcio é uma das alternativas mais utilizadas quando trabalha-se com reatores do tipo leito fluidizado. Dentro das vantagens da imobilização celular em esferas de alginato de cálcio podem-se mencionar:

- Reutilização ou recuperação do biocatalisador (microrganismo), podendo ser realizados processos *feed batch*;
- Aumento da resistência das células a compostos tóxicos presentes no meio de cultivo;
- Ajudar a manter a homogeneidade do processo e devido a alta estabilidade do alginato;
- Eliminação da etapa do preparo do inóculo;
- Conservar as células imobilizadas e ativas para processos futuros.

Assim, os métodos de imobilização celular e a utilização de reatores de leito

fluidizado se apresentam como uma estratégia promissora para a produção e obtenção de BS em processos biotecnológicos, utilizando matérias primas renováveis e de fácil aceso, viabilizando a produção dessas biomoléculas.

2.9 *Cutaneotrichosporon mucoides* como produtora de BS

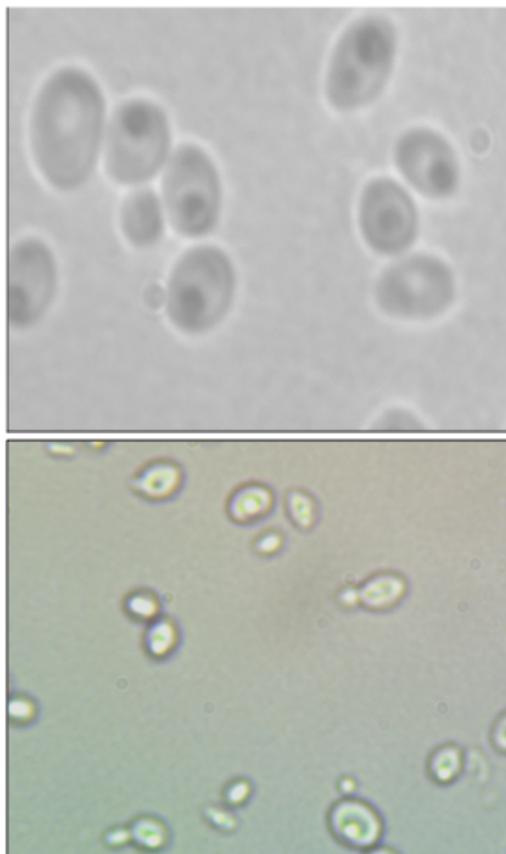
As leveduras do gênero *Trichosporon* pertencem ao Reino *Fungi*, Filo *Basidiomycota*, Sub-filo *Basidiomycotina* e Ordem *Trichosporonales* (MIDDELHOVEN; SCORZETI; FELL, 2004). São encontrados em todos os ambientes (solo, ar e água) e também fazem parte das microbiotas naturais de aves, mamíferos e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

Este gênero que atualmente conta com aproximadamente 40 espécies catalogadas, apenas 6 são oportunistas e responsáveis por lesões superficiais benignas, como a *pedra-branca*, a até mesmo infecções sistêmicas, as chamadas tricosporonoses, em pacientes imunodeprimidos, submetidos a quimioterapias, transplantados e portadores do HIV (MIDDELHOVEN; SCORZETI; FELL, 2004).

Porém, nos últimos anos, as espécies consideradas *GRAS*, têm se destacado pelo potencial de aplicação na indústria biotecnológica, sendo denominadas de leveduras oleaginosas, de extrema importância na produção de biodiesel, lipases e biossurfactantes. Além disso, as leveduras do gênero *Trichosporon* são produtoras de algumas enzimas de interesse industrial como xilanases, celulases, fenilalanina amônia liase, lacases e lipases.

A linhagem utilizada no presente trabalho, *Cutaneotrichosporon mucoides* (Figura 19) foi isolada da mata atlântica brasileira, mais precisamente de material lignocelulósico em decomposição, pelo grupo de pesquisa do Prof. Carlos Augusto Rosa (Departamento de Microbiologia – Universidade Federal de Minas Gerais), com o intuito de aplicá-la em processos biotecnológicos, como produção de etanol de segunda geração, xilitol entre outros produtos.

Figura 19- Micrografias ópticas das células de *C. mucooides*



Fonte: Arquivo pessoal

Em trabalhos anteriores realizados por Marcelino (2016), para identificação de leveduras produtoras de biossurfactantes em meios de cultura suplementados com hidrolisado hemicelulósico, a levedura *Cutaneotrichosporon mucooides* foi descrita como uma destacada produtora da biomolécula, as quais foram caracterizadas e descritas com uma capacidade emulsificante de 70% e com uma estabilidade de 144 h. Após uma análise estrutural, os biossurfactantes foram descritos como sofrorolípídeos com atividade larvicida contra *A. aegypti*.

Assim mesmo em trabalhos realizados por Guiotti (2018), IE₂₄ superiores a 50 % foram observados quando a levedura *Cutaneotrichosporon mucooides* foi utilizada em testes para produção de biossurfactantes em biorreator de bancada e em frascos Erlenmeyer, com meios de cultura suplementados com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-

açúcar. Não entanto, a formação de espuma foi um dos principais problemas observados no estudo.

Assim, a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* destaca-se como uma levedura que pode ser utilizada para produzir biossurfactantes, porém parâmetros operacionais ainda tem que ser otimizados.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a produção de biossurfactante em meio de cultivo enriquecido com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando um reator de leito fluidizado com células da levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

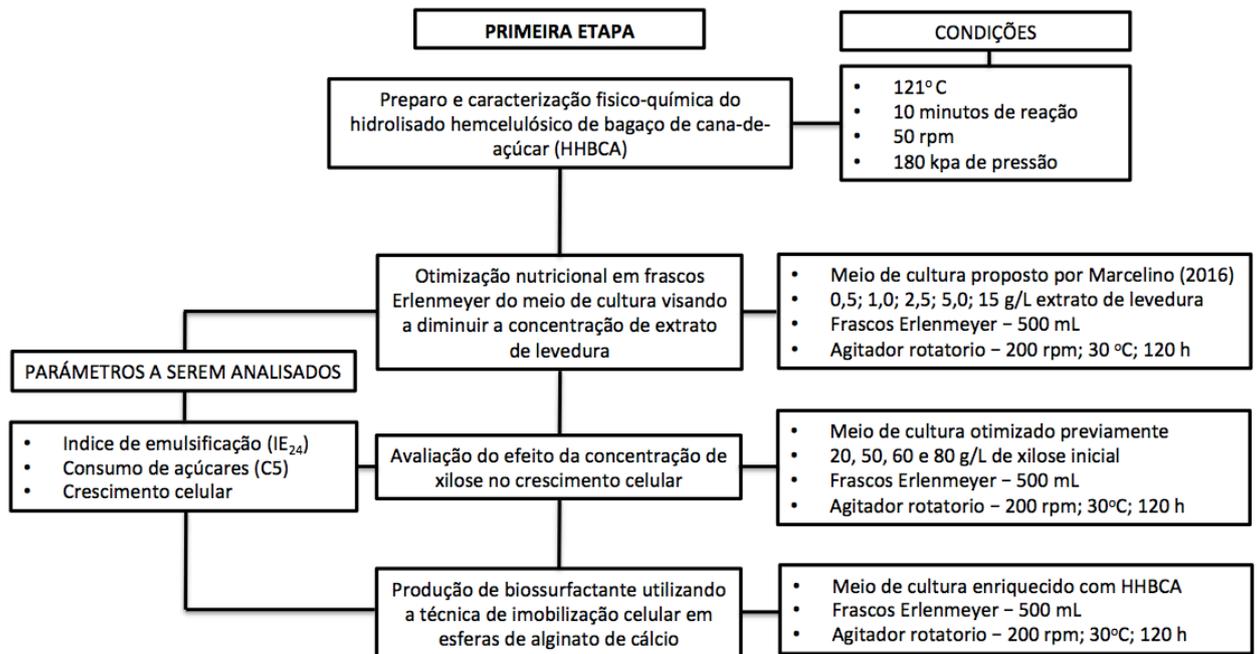
3.2 ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizado na preparação dos meios.
- Otimizar os parâmetros nutricionais (concentração de extrato de levedura) do meio de cultivo com hidrolisado hemicelulósico em frascos Erlenmeyer visando obter biossurfactante com propriedades físico-químicas apropriadas para aplicação industrial.
- Avaliar o efeito das concentrações de hidrolisado hemicelulósico utilizado no meio de cultura no crescimento celular da levedura *Cutaneotrichosporon mucoides*
- Imobilizar células de *Cutaneotrichosporon mucoides* em esferas de alginato de cálcio para realizar as fermentações para produção de biossurfactante, em condições pré-determinadas.
- Avaliar a estabilidade do sistema de produção de biossurfactante em biorreator de leito fluidizado utilizando células de *Cutaneotrichosporon mucoides* imobilizadas, de acordo com condições pré-determinadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho, as metodologias e técnicas foram divididas em duas etapas conforme pode ser observado a continuação:

Figura 20 – Representação esquemática das etapas da presente pesquisa.



Fonte: Autoria própria

Na **primeira etapa**, em ensaios feitos em frascos Erlenmeyer, foram realizados os testes da avaliação da produção de biossurfactante visando diminuir a concentração de extrato de levedura utilizado no meio de cultivo enriquecido com HHBCA destoxificado como fonte de carbono, posteriormente foram realizados testes para avaliar o efeito das concentrações de compostos tóxicos presentes no HHBCA realizando fermentações aumentando a concentração de xilose no meio de cultura procedente do HHBCA.

Uma vez obtidos os resultados mais favoráveis, procedeu-se a realizar os testes de produção de BS por células de *C. mucoides* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio em meio previamente re-acondicionado e enriquecido com HHBCA destoxificado.

Os parâmetros que foram avaliados nesta etapa do projeto foram consumo de açúcar (xilose) e o índice de emulsificação (%).

Na **segunda etapa** foram realizados os ensaios em biorreator de bancada do tipo leite fluidizado utilizando a técnica de imobilização celular com alginato de cálcio. O meio de cultura utilizado foi igual ao utilizado nos ensaios em frascos Erlenmeyer e os parâmetros analisados foram: consumo de açúcares (xilose); índice de emulsificação (%); pH e tensão superficial (mN/m).

4.1 Caracterização físico-química do bagaço de cana de açúcar

Foi feita uma caracterização físico-química do bagaço de cana de açúcar seguindo as metodologias propostas por Gouveia et al (2009) para determinar as porcentagens de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas.

4.2 Preparo e caracterização físico-química do HHBCA

A hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em um reator de aço inox (AISI 316) com volume útil de 350 L, aquecido indiretamente por resistência elétrica por meio de uma camisa de óleo. O reator foi operado em regime descontínuo, empregando-se as seguintes condições de hidrólise: uma proporção entre massa seca de bagaço de cana de açúcar e ácido sulfúrico concentrado (98 %) de 1:10 (100 mg de ácido : 1 g de bagaço), temperatura de 121 °C, tempo de reação de 10 minutos, agitação de 50 rpm e pressão de 180 kPa. Após a hidrólise, a celulignina foi separada do líquido por filtração e o hidrolisado hemicelulósico transferido e armazenado em bombonas plásticas de 50 L em câmara refrigerada a 4 °C.

O hidrolisado foi concentrado com ajuda de um concentrador a vácuo a 85°C até alcançar uma concentração de xilose de 110 g/L. A caracterização físico-química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) quantificando as concentrações dos açúcares glicose, xilose e arabinose, dos furanos (furfural, hidroximetilfurfural), ácidos acético e fórmico.

4.3 Destoxificação do HHBCA

O HHBCA foi submetido ao processo de destoxificação química para a remoção de compostos que podem inibir o crescimento microbiano, conforme proposto por Alves et al (1998). Primeiro, o pH do hidrolisado foi elevado até 7,0 com a adição gradual de

micropérolas de hidróxido de sódio (NaOH), posteriormente, o pH foi reduzido a 5,5 com ácido fosfórico (H₂PO₃) concentrado. Posteriormente, foi adicionado ao hidrolisado 1 % (m/V) de carvão ativado e foi incubado em agitador rotatório a 60 °C por 30 min. Em seguida, o hidrolisado foi centrifugado a 3000 rpm por 15 min para a remoção do carvão ativado e finalmente esterilizado para sua posterior utilização.

4.4 Manutenção do microrganismo e preparo do inóculo para as fermentações

A cepa da levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* com código SSS11 previamente definido em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, foi selecionada em este estudo por ser uma cepa produtora de BS.

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

O pré-inóculo das fermentações foi realizado em frascos Erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de meio mineral proposto por Kitamoto et al. (1990) (contendo g/L: 40 xilose, 2 fosfato monobásico de potássio, 11 nitrato de amônio e 2 sulfato de magnésio heptahidratado). As fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes foram autoclavadas separadamente a 110°C, 0,5 atm por 15 min. A levedura foi transferida das placas de manutenção para frascos Erlenmeyer com meio Kitamoto (1990) usando uma alça de platina e incubados em agitador rotatório a 200 rpm, 30 °C, por 48 horas.

Posteriormente, os cultivos foram interrompidos e centrifugados a 3000 rpm por 10 min para a separação da biomassa celular. As células foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9 % m/V) e após diluições adequadas inoculadas aproximadamente 1,0 x 10⁻⁷ células/mL, de acordo com a escala *Mc Farland* adaptada, nos frascos onde ocorrerão as fermentações (Levi, 2003 modificado).

4.5 Avaliação da concentração de extrato de levedura no meio de cultivo com HHBCA detoxificado

Para a otimização das concentrações da fonte de nitrogênio, utilizou-se o meio proposto por Marcelino (2017) contendo HHBCA detoxificado com 40 g/L de xilose, 5 g/L de sulfato de amônio, 2 g/L óleo de soja, 2 % (V/V) de extrato de farelo de arroz e extrato de levedura com concentração variando entre 0,5 - 15 g/L. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio e incubados em agitador rotatório a 200 rpm, 30 °C, por 96 horas. Foram coletadas alíquotas das fermentações periodicamente para a análise do processo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6 Avaliação do efeito das concentrações de HHBCA no meio de cultivo no crescimento celular

Foram feitos testes com o meio de cultivo proposto por Marcelino (2017) contendo HHBCA detoxificado com 20, 40, 60 e 80 g/L de xilose, 5 g/L de sulfato de amônio, 2 g/L óleo de soja, 2 % (V/V) de extrato de farelo de arroz e 2.5 g/L de extrato de levedura. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio e incubados em agitador rotatório a 200 rpm, 30 °C, por 96 horas. Foram coletadas alíquotas das fermentações periodicamente para a análise do processo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7 Imobilização das células de *C. mucoides* em esferas de alginato de cálcio

As células de *C. mucoides* foram imobilizadas em esferas de alginato de cálcio produzidas a partir da reação de precipitação, onde uma solução de cloreto de cálcio 15 g/L foi gotejada numa solução de alginato de sódio 10 g/L e uma suspensão com 1 g/L de células (absorvância a 600 nm). Após a imobilização, as esferas formadas foram mantidas a 4 °C em uma solução de cloreto de cálcio por um período de cura de 12 h e posteriormente foram utilizadas nas fermentações.

4.8 Teste de produção de BS em frascos Erlenmeyer por células de *C. mucooides* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio em meio de cultivo com HHBCA destoxificado

Após a definição do meio de cultivo que utilizou as menores concentrações possíveis de extrato de levedura para se obter BS com propriedades físico-químicas adequadas para futura aplicação industrial foram realizadas fermentações em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, com 20 mL do meio de cultivo e 5 mL de suporte com células imobilizadas (ANTUNES, 2015). Os ensaios foram conduzidos em agitador rotatório a 200 rpm e 30 °C por 96 h. Foram coletadas alíquotas das fermentações a cada 24 h para a análise do processo. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

4.9 Definição de condições de fermentação para a produção de BS em meio com HHBCA destoxificado utilizando células imobilizadas de *C. mucooides* em reator de leito fluidizado

Foi feito um planejamento experimental 2^k , utilizando 2 fatores (concentração da fonte de carbono e vazão de ar por min) a 2 níveis cada um com três replicatas no ponto central, a matriz experimental é apresentada a seguir:

Tabela 9 – Planejamento experimental

Ensaio	Variáveis	
	X1	X2
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fonte: Autoria própria

Onde o fator X1: é a concentração em g/L de xilose e o fator X2: é a vazão de ar alimentada ao reator. Os níveis + e – foram: 20 e 80 g/L para o fator X1 respectivamente, enquanto para o fator x2 foram 0,2 e 0,6 vvm respectivamente; sendo os pontos centrais 50 g/L e 0,4 vvm para os fatores X1 e X2 respectivamente.

O planejamento experimental 2^2 gerou um total de 7 experimentos, nos quais parâmetros como pH e temperatura não foram alterados, mas foram monitorados. Todos os experimentos foram feitos a uma temperatura de 30°C por 120 h; o pH foi monitorado durante o processo.

As fermentações foram realizadas com 500 mL de meio de cultivo e 10% v/v de suporte com células imobilizadas, o tempo de fermentação foi de 120 horas e foi utilizado um reator de coluna operado em configuração de leito fluidizado da marca *Bioengineering* (Wald, Suíça), modelo PID Fermenter AWS, com capacidade de 2,0 litros. Os parâmetros operacionais utilizados nas fermentações foram os mesmos adotados por Antunes (2015).

4.10 Métodos analíticos

4.10.1 Determinação das concentrações de açúcares (xilose, arabinose e glicose), ácidos orgânicos (ácido fórmico e ácido acético) e furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural).

As concentrações de açúcares, ácidos orgânicos e furanos realizadas no presente trabalho serão efetuadas por HPLC em cromatógrafo Agilent 1200 series (EUA). Os açúcares e os ácidos orgânicos serão determinados com o auxílio de uma coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), o detector de índice de refração RID-6A, com eluente ácido sulfúrico 0,01N a um fluxo de 0,6 ml/min, uma temperatura da coluna de 45 °C e o volume de amostra injetado será de 20 µl. Antes de se efetuar as análises em HPLC, as amostras serão filtradas em filtro Sep Pak C18 (WATERS).

Para a determinação das concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural será utilizada uma coluna HP-RP18 (200 x 4,6mm), o detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS (comprimento de onda de 276 nm), o eluente acetonitrila/água (1:8) com 1 % (V/V) de ácido acético, a um fluxo de 0,8 ml/min, uma temperatura da coluna de 25 °C e o volume de amostra injetado será de 20 µl. Antes de se efetuar as análises em HPLC, as amostras foram filtradas em membranas MINISART 0,22 µm (SARTORIUS).

4.10.2 Determinação das concentrações de compostos fenólicos totais

As concentrações de compostos fenólicos totais foram realizadas por espectrofotometria utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e solução padrão de ácido gálico e leituras das absorvâncias a 740 nm (SINGLETON; JOSEPH; ROSSI, 1965).

4.10.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por espectrofotometria utilizando uma correlação linear estabelecida com curva de calibração entre o peso seco e a absorvância da amostra a 600 nm. As concentrações celulares na fase líquida foram determinadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 600 nm, a absorvância foi co-relacionada com o peso seco (g/L de células) baseados em curvas de calibração previamente feitas.

Para determinar a concentração celular dentro das esferas de alginato de cálcio, foi empregada a metodologia proposta por de Carvalho (2005); na qual, um volume conhecido de esferas de alginato foi pesado e dissolvido em uma solução de citrato de potássio (2%), posteriormente realizou-se uma centrifugação da solução para separar as células as quais foram re-suspendidas em água e foram lidas em espectrofotômetro a uma ABS de 600 nm.

4.10.4 Determinação do índice de emulsificação (I.E)

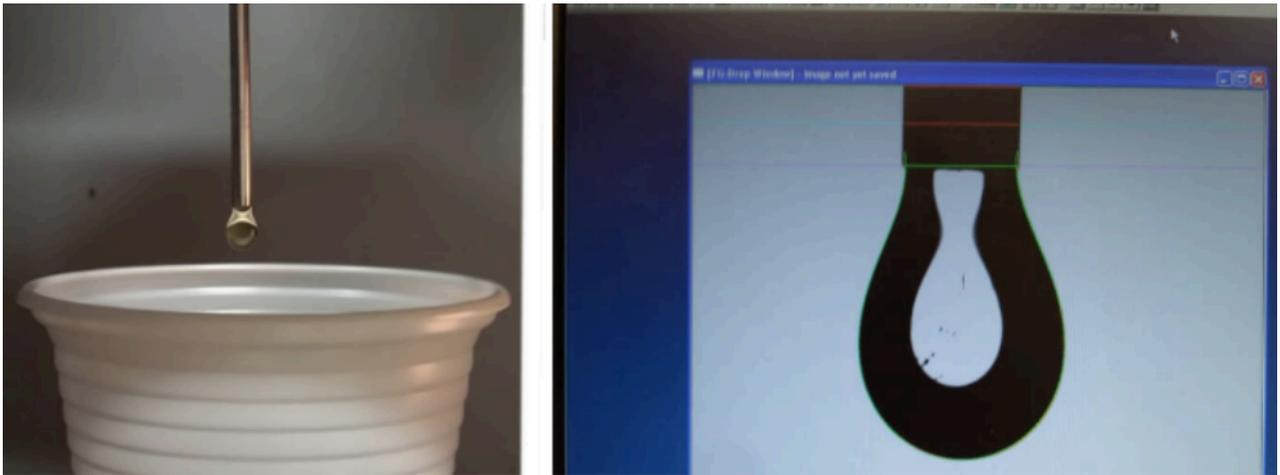
A determinação do índice de emulsificação das amostras foi feita de acordo com uma adaptação da metodologia descrita por Chen et al (2007), onde 1 mL do sobrenadante de cada cultivo foi misturado com 1 mL de querosene e submetido a agitação (9000 rpm) em vórtex PHOENIX AP56 por 1 minuto. O I.E foi expresso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

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

4.10.5 Determinação da tensão superficial (TS)

Para a determinação da TS foi utilizada a metodologia da gota pendente em tensiômetro Easy Drop – DSA 100 previamente calibrado

Figura 21 - Gota pendente em tensiômetro Easy Drop



Fonte: Arquivo pessoal.

Como apresentado na figura 21, a TS foi determinada utilizando a metodologia de gota pendente, onde aproximadamente 10 μL de amostra foram gotellados utilizando um tensiômetro proporcionado pela empresa BASF.

4.10.6 Extração de biossurfactantes

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

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

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização composicional do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos do presente trabalho foi caracterizado quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas. Os resultados podem ser observados na tabela 10, onde também foram comparados com outros estudos da mesma biomassa.

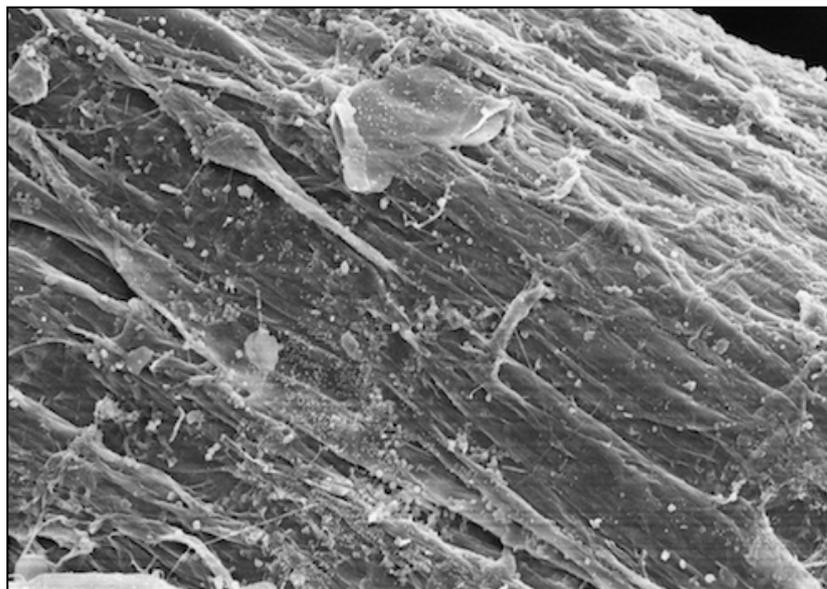
Tabela 10- Composição percentual das principais frações encontradas no bagaço de cana-de-açúcar

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referência
45	17	35	1,5	Presente estudo
39	25	22	1,4	ANTUNES (2015).
43	28	20	2,9	ARRUDA (2011).
34	23	28	6,6	PEREIRA-BRUMANO (2017).

Fonte: Autoria própria.

Conforme apresentado na tabela 10, as porcentagens de lignina, celulose e hemicelulose obtidos da caracterização do bagaço de cana, são similares aos encontrados em outros estudos. No entanto, foram observadas algumas variações com dados reportados na literatura e os obtidos neste estudo. Segundo Canilha et al. (2012) essas variações podem estar relacionadas a fatores edafoclimáticos como temperatura, umidade, tipo de solo além da idade do vegetal ou condições de cultivo. O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste estudo foi analisado também por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A imagem obtida é apresentada na figura 22:

Figura 22- Microfotografia da superfície do bagaço de cana-de-açúcar obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Fonte: Arquivo pessoal.

Na figura 22 pode-se observar uma estrutura rígida, com aparência de fibras empacotadas denominadas macrofibrilhas (DING; HIMMEL, 2006), as quais apresentam homogeneidade, característica típica de compostos lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar (*in natura*). Não foram encontradas rupturas nem desfibrilação da biomassa.

5.2 Caracterização físico-química do HHBCA

Após o tratamento térmico-ácido do bagaço de cana-de-açúcar, o hidrolisado obtido foi caracterizado quimicamente para determinar os teores de açúcares, principalmente xilose. Posteriormente, o hidrolisado foi concentrado a vácuo com a finalidade de aumentar o teor de xilose pois a concentração desse monossacarídeo encontrada no HHBCA, logo após o processo de hidrólise, não o tornaria eficiente para utilizá-lo como substrato em processos fermentativos.

No proceso de concentração a vácuo, além da xilose e outros açúcares, compostos como fenóis e furanos (furfural e 5-hidroximetil-furfural), considerados tóxicos ao metabolismo celular (LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998), também foram concentrados. Para evitar problemas no proceso fermentativo foi necessário destoxificar o HHBCA utilizado. No processo de destoxificação empregado neste trabalho, utilizou-se a alteração do pH seguida da adsorção por carvão ativado.

As concentrações de açúcares e compostos inibidores (ácido acético, 5-HMF e furfural) foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11- Composição físico-química do HHBCA

COMPONENTES (g/L)	HHBCA		
	HHBCA	CONCENTRADO NÃO-DESTOXIFICADO	HHBCA CONCENTRADO DESTOXIFICADO
Glicose	1,4	6,8	5,4
Xilose	16,6	110	100
Arabinose	1,4	5,1	4,2
Ácido Acético	2,8	57,1	4,76
5 - HMF	0,03	0,15	0,07
Furfural	0,48	0,30	0,07

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com a Tabela 10, o tratamento ácido-térmico ao qual o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido, proporcionou uma hidrólise principalmente de sua fração hemicelulósica, uma vez que a xilose foi o monossacarídeo que apresentou uma maior proporção em relação a glicose e arabinose. Resultado similar foi reportado por Antunes et al. (2014) que observou uma concentração de xilose de 10,9 g/L no HHBCA não destoxificado e não concentrado. Enquanto no HHBCA destoxificado e concentrado, Marcelino et al (2017) reportaram uma concentração de xilose próxima de 60 g/L.

O fato de que os resultados obtidos no presente trabalho, apresentam concentrações de xilose superiores às encontradas na literatura, é devido a que nosso hidrolisado foi concentrado o maior numero de vezes possível com a finalidade de utilizar a menor

quantidade nas formulações dos meios de cultivo. Antunes et al (2014) reportaram concentrações de xilose de 30 g/L após realizados os processos de concentração a vácuo num fator de três, enquanto Simões (2011), reportou uma concentração de 19,8 g/L de xilose após a redução por vácuo do volume inicial num fator de cinco.

Após o processo de concentração a vácuo do HHBCA, um processo de destoxificação foi necessário pois condições como temperatura e pH utilizadas durante o processo de hidrólise ácida, são responsáveis da liberação de compostos tóxicos para o metabolismo microbiano.

A presença de ácido acético no HHBCA, deve-se ao fato da liberação de grupos acetil presentes na hemicelulose. Os compostos fenólicos são oriundos da hidrólise de uma parte da lignina, enquanto os furanos são produtos da desidratação de monossacarídeos devido as drásticas condições físico-químicas do meio reacional (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998; CHANDEL et al, 2007). Conforme demonstrado na Tabela 11, observou-se que as concentrações de açúcares foram reduzidas entre 10 e 20 % após esse procedimento, sendo a concentração final de xilose quantificada em 100 g/L.

Os resultados obtidos no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção do HHBCA corroboram com a exploração dessa biomassa para pesquisas de desenvolvimento de biorrefinarias lignocelulósicas que visem aproveitar a fração hemicelulósica desse material para a obtenção de importantes *bio-based products*.

5.3 Avaliação da concentração de extrato de levedura no meio de cultivo com HHBCA destoxificado

Propostas de meios de cultivo previamente otimizados por Marcelino (2016) foram utilizadas neste trabalho. Os resultados dos testes de limitação de fonte de nitrogênio são apresentados na figura 23.

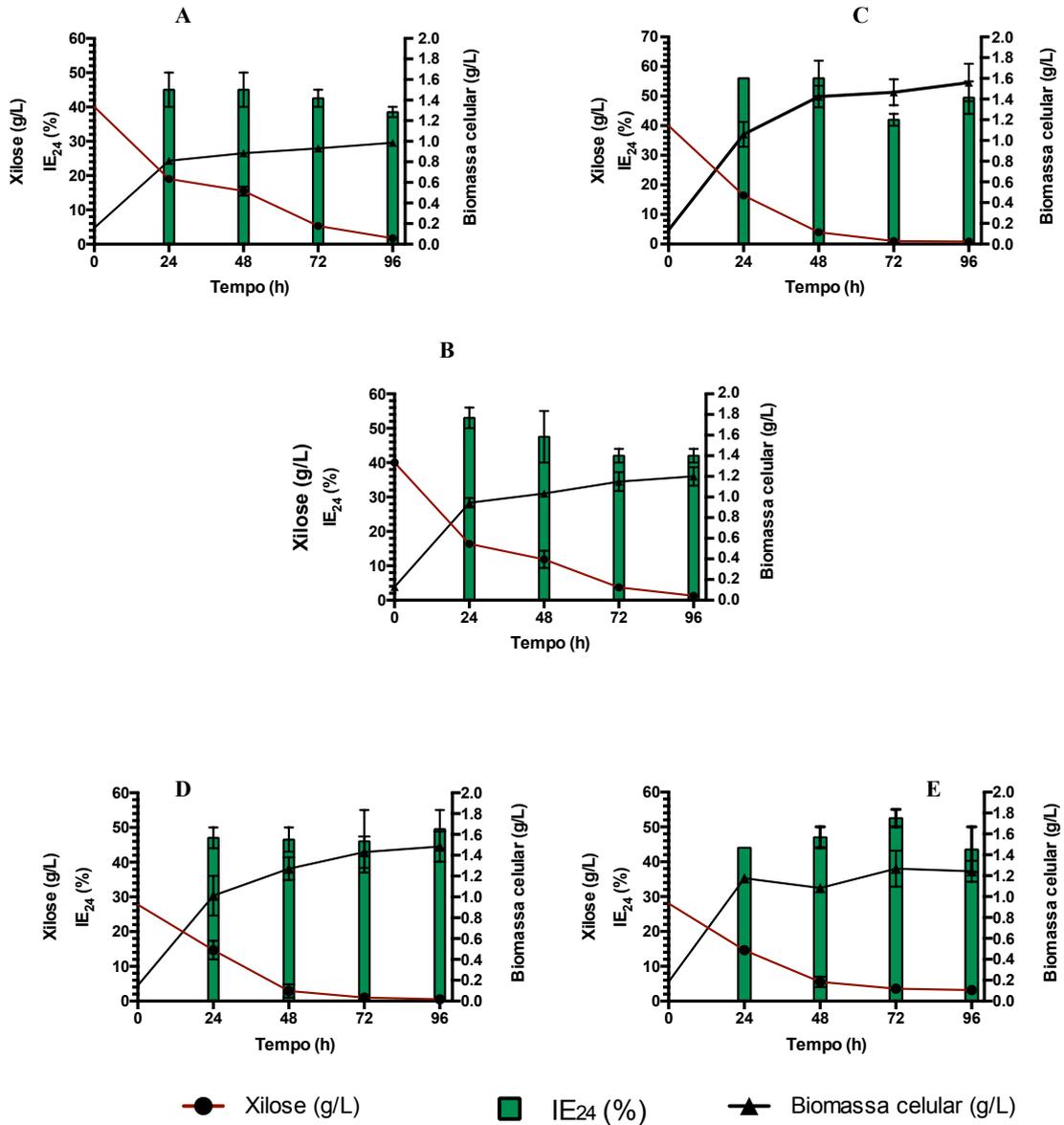
Como pode-se observar, as condições III e IV apresentaram um crescimento celular elevado (13 e 16 g/L de células). No decorrer dos experimentos foram monitorados o crescimento microbiano (em absorbância a 600 nm) e a produção de BS baseando-se no índice de emulsificação (IE), uma vez que o biossurfactante produzido por *C. mucooides* nestas condições apresenta destacadas propriedades emulsificantes.

Ao mesmo tempo foi observado que, nas condições III, IV e V após 48 h de fermentação, mais de 90 % da fonte de carbono (xilose) tinha sido consumida pela levedura, enquanto nas condições I e II, tal fato só foi observado em 96 h de cultivo.

Além disso, os índices de emulsificação (IE_{24}) nas condições IV e V, foram respectivamente, 45 e 50 %, enquanto na condição III foi observado um IE_{24} maior que 50 % logo após 24 h de fermentação. Fica evidente neste experimento, que realmente a limitação de nitrogênio é um fator determinante na produção de BS. Conforme relatado por Fontes; Amaral e Coelho (2010) e Casas e Garcia-Ochoa (1999), quando altas concentrações de fonte de nitrogênio estão presentes no meio de cultura, a produção de BS é afetada negativamente, uma vez que o metabolismo é desviado para vias que favorecem o crescimento celular.

Segundo Albrecht; Rau e Wagner (1996), Em baixas concentrações de fontes de nitrogênio, ocorre um decréscimo da atividade da enzima isocitrato desidrogenase (dependente de NAD^+ e $NADP^+$), que oxida isocitrato a α -cetogluturato no ciclo de Krebs. Tal fenômeno leva a um acúmulo de isocitrato e citrato na mitocôndria ambos são transportados para dentro do citosol, onde o citrato é clivado pela citrato sintase, originando acetil-coA, metabólito precursor da síntese de ácidos graxos aumentando, dessa forma, a produção de BS.

Figura 23- Comparação da produção de biossurfactante e crescimento celular nas cinco condições de cultivo (g/L extrato de levedura): **A)** condição I; **B)** condição II; **C)** condição III; **D)** condição IV; **E)** condição V



Fonte: Arquivo pessoal

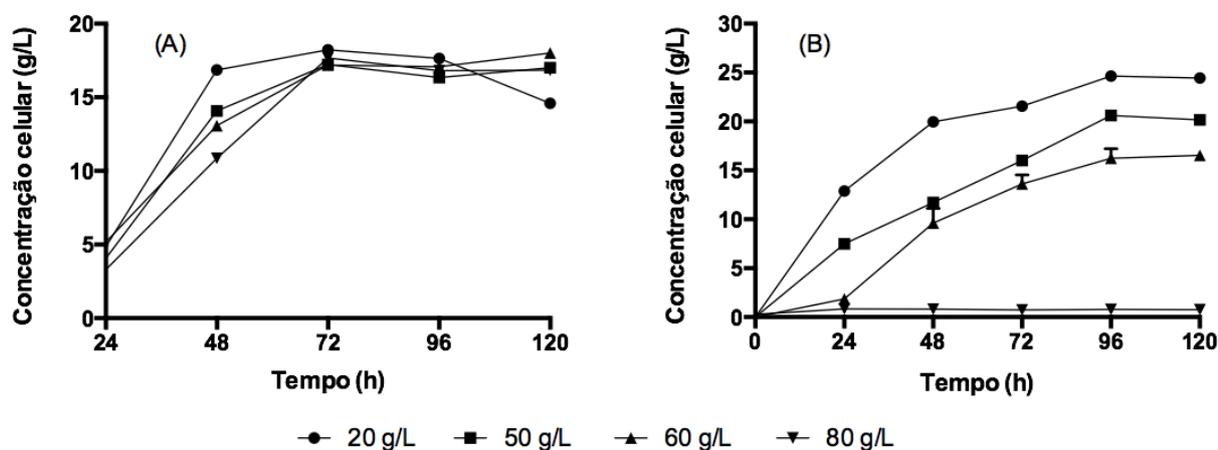
Em um estudo realizado por Fontes; Amaral e Coelho (2010), o efeito da fonte de nitrogênio na produção de BS pela levedura *Yarrowia lipolytica* foi avaliado, e um IE₂₄ 67,7% foi observado em meio de cultura contendo 0,5 g/L de extrato de levedura (a menor concentração empregada) e glicose como fonte de carbono.

Nas condições I e II, as concentrações de extrato de levedura empregadas no meio de cultivo foram inferiores as outras condições. Observou-se um IE₂₄ de 50 % e crescimento celular menor entre 0,9 e 1,2 g/L de células. Os resultados de índice de emulsificação obtidos no presente estudo, em condições com menores concentrações de fontes de nitrogênio, são similares aos obtidos por Chaves (2017), que observou-se IE₂₄ na faixa de 52,9 - 53,9 % em estirpes de *Candida davisiana*, *Cryptococcus adeliensis*, *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

5.4 Efeito das concentrações de HHBCA no meio de cultivo no crescimento celular e no índice de emulsificação

Meios de cultivo com diferentes concentrações de xilose e de HHBCA foram testados nestes experimentos. Os resultados são apresentados na figura 24.

Figura 24- Crescimento celular (g/L de células) em: **A)** meio de cultura sintético; **B)** meio de cultura suplementado com HHBCA.



Fonte: Autoria própria.

Conforme pode ser observado na figura 24 (A), concentrações de 20, 50, 60 e 80 g/L de xilose (condições I; II; III e IV respectivamente) favorecem o crescimento da levedura. Ainda na maior concentração de xilose (80 g/L) não foi observada inibição do crescimento celular pois foi obtida uma concentração de ~10 g/L de células logo após 48 h de fermentação. Na condição I (Figura 25-A), foi observado um IE₂₄ maior que 60% após 24 h de fermentação, resultados similares aos obtidos por Chaves (2017) em ensaios realizados com células das leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Metschnikowia australis* com xilose como única fonte de carbono (IE₂₄ de 61% e 58% respectivamente).

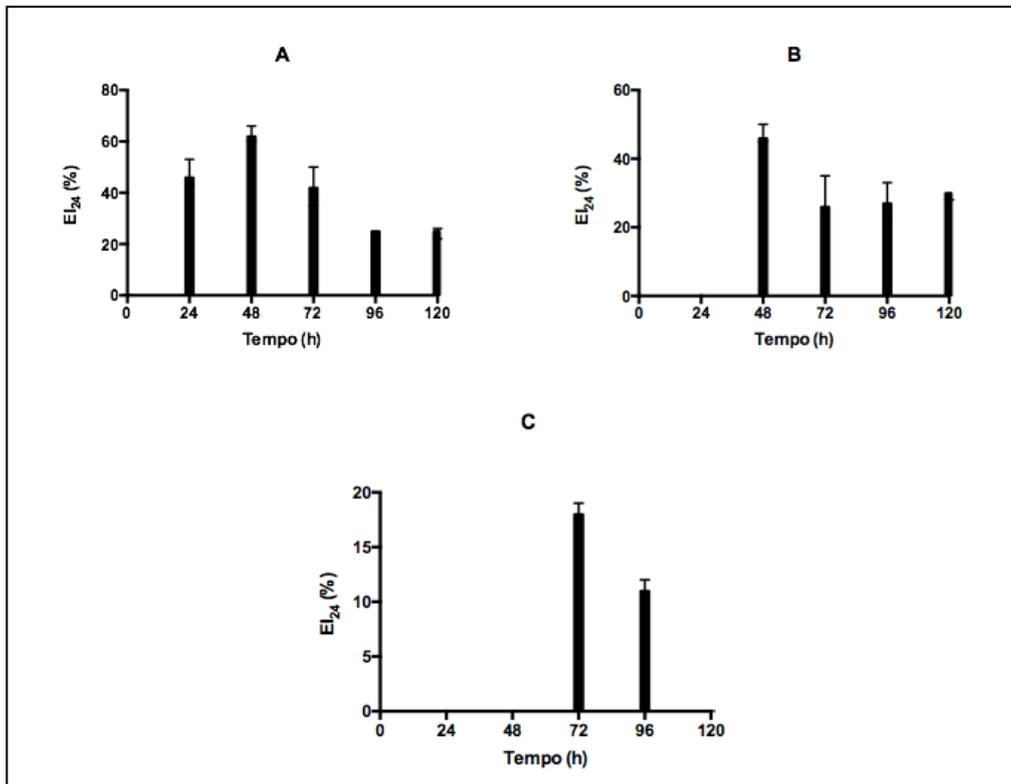
Previamente, Marcelino (2016) estudou a produção de BS por leveduras previamente isoladas em meios de cultivo suplementados com HHBCA (40 g/L de xilose), foi observado um IE₂₄ de 70 % e uma concentração celular de 20 g/L utilizando o logo após 48 h de fermentação.

Os resultados dos experimentos realizados com meio de cultura suplementado com HHBCA com 20, 50, 60 e 80 g/L de xilose são apresentados na Figura 25 (B). Foi observado que elevadas quantidades de hidrolisado inibem o crescimento da levedura, pois a biomassa celular começou a diminuir até ser inibida completamente em concentrações de 80 g/L de xilose (condição IV), e porém a produção de BS constatando o relatado por Chaves (2017), quem afirmou que a fonte de carbono está associada à produção de BS.

Tal efeito não foi observado nos ensaios realizados com meio de cultivo sintético, segundo Monteiro et al. (2009) e Marcelino (2016) a produção de BS, o IE₂₄ e a massa celular apresentam uma correlação linear, efeito observado nestes experimentos, pois, quanto maior a quantidade de HHBCA utilizada nas formulações dos meios de cultivo, menor a quantidade de células e menor a produção de BS.

Este fato pode ser um indicativo de que fenólicos e furanos presentes no HHBCA estão apresentando um efeito tóxico na célula. Conforme reportado por Mussatto et al (2005) estes compostos atuam como inibidores do crescimento celular e da síntese de metabólitos. Os resultados do IE₂₄ obtidos são apresentados na figura 25.

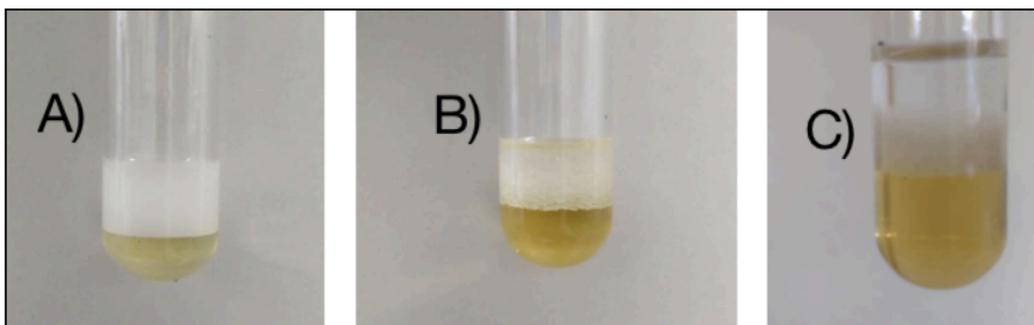
Figura 25- IE₂₄ dos ensaios realizados com diferentes concentrações de fonte de carbono: A) 20, B) 50 e C) 60 g/L de xilose.



Fonte: Autoria própria.

Na figura 25 podem-se observar os IE₂₄ obtidos em três das quatro condições estudadas em este experimento. Condições, I:20 g/L; II:50 g/L; III:60 e IV:80 g/L xilose. Os resultados mostram claramente que, concentrações elevadas de HHBCA apresentam um efeito negativo no metabolismo da levedura. As emulsões obtidas nestes experimentos são apresentadas na Figura 26.

Figura 26- Emulsões obtidas em meios de cultivo suplementados com HHBCA após 24 h de fermentação



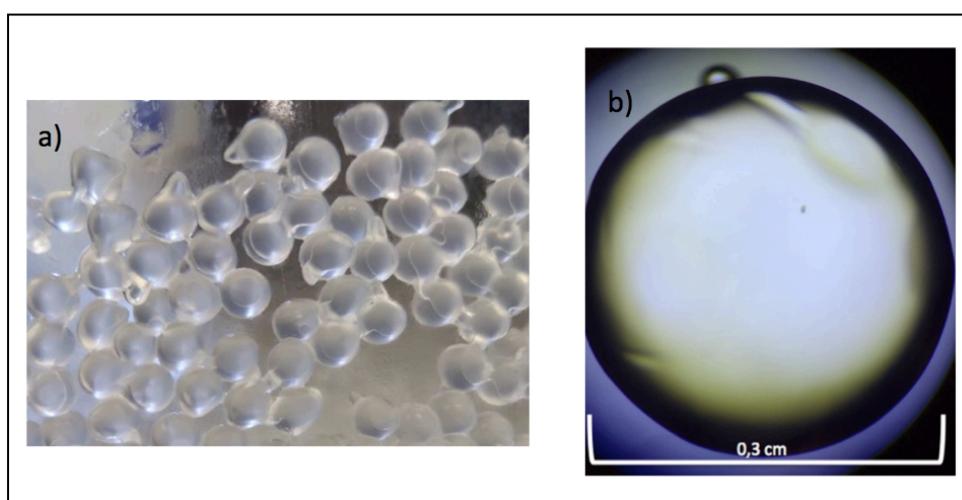
Fonte: Arquivo próprio.

Na figura 26 pode-se observar claramente como a emulsificação é afetada negativamente pelo aumento das concentrações de HHBCA nos meios de cultivo, pois na condição I (A) foi observada uma emulsão estável após 2 e 24 h de serem realizados os testes de IE₂ e IE₂₄.

5.5 Imobilização das células de *C. mucoides* em esferas de alginato de cálcio

A imobilização celular em esferas de alginato de cálcio foi feita segundo a metodologia descrita por Antunes (2015). As esferas de alginato de cálcio foram caracterizadas utilizando um paquímetro. O diâmetro médio das esferas foi aproximadamente em 3 mm (Figura 27), sendo esta propriedade variável e dependente da metodologia empregada no preparo das esferas.

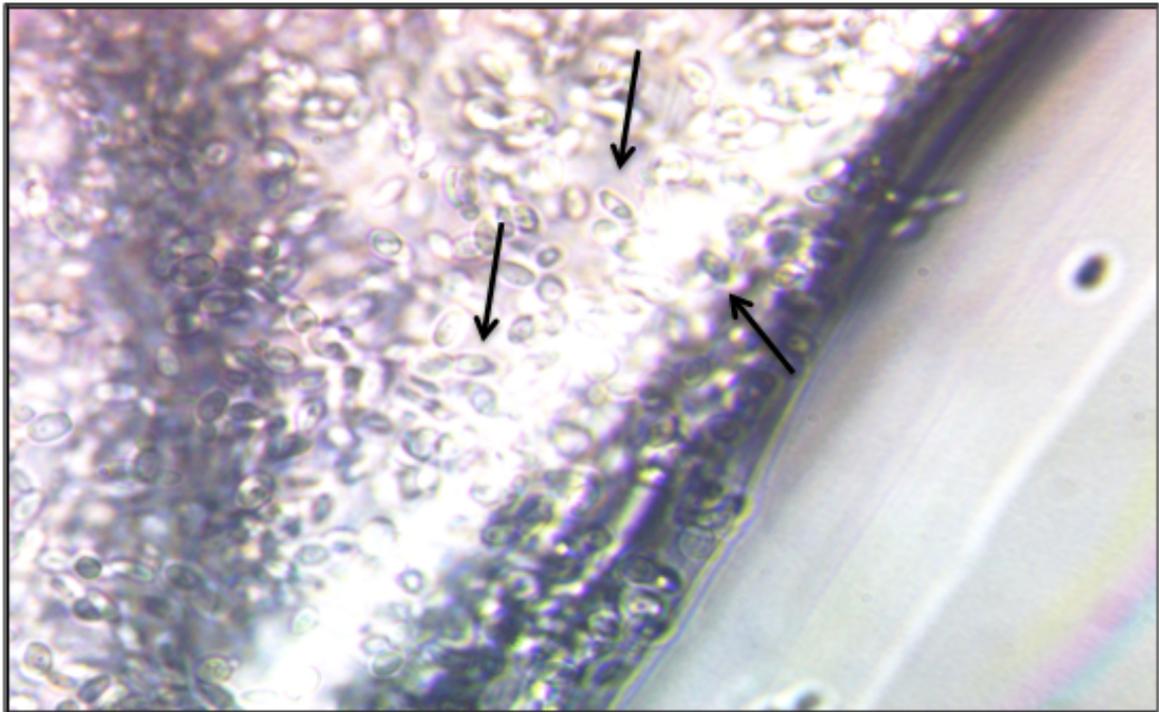
Figura 27- **A)** Fotografia das esferas de alginato de cálcio e **B)** microscopia de uma esfera de alginato de cálcio (aumento de 40x).



Fonte: Arquivo próprio.

A fim de comprovar a presença da levedura no interior da matriz de alginato, as esferas foram observadas no microscópio óptico (Figura 28).

Figura 28- Células de *C. mucoides* no interior da esfera de alginato de cálcio



Fonte: Arquivo próprio.

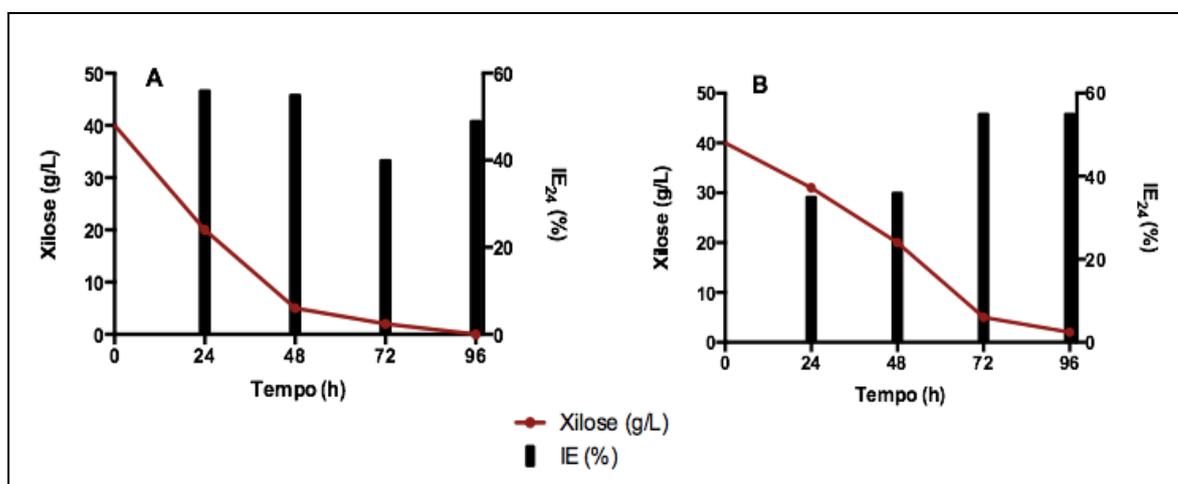
Conforme indicado pelas setas (Figura 28) em preto, pode ser claramente observado a presença de células da levedura immobilizada no interior da matriz de alginato de cálcio.

5.6 Produção de biossurfactante em frascos Erlenmeyer com células de *C. mucoides* immobilizadas

Os testes de produção de BS utilizando células immobilizadas de *C. mucoides* foram realizados no meio otimizado quanto a concentração de extrato de levedura realizado anteriormente. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer, pois, o objetivo principal foi observar o comportamento da levedura no processo fermentativo quando immobilizada em esferas de alginato de cálcio. (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011)

Na figura 29 observa-se os resultados do experimento com células immobilizadas, onde, 50 % da fonte de carbono já havia consumida e um IE₂₄ de 36 % foi observado após 48 h de fermentação. Porém, observou-se a depleção quase total da xilose e um aumento no IE₂₄ até 96 h alcançando um IE₂₄ de 55 % após 72 h de fermentação.

Figura 29- Produção de biossurfactante em HHBCA em sistema com células livres (A) e com células imobilizadas (B).



Fonte: Arquivo pessoal.

Quando compara-se ao experimento com células livres (figura 29-A), o consumo de xilose é mais eficiente, pois foi observado um consumo de xilose de 50 % e um o IE₂₄ de 56 % após 24 h de fermentação. Porém, verificou-se a exaustão da fonte de carbono no meio de cultivo, e o índice de emulsificação passou a sofrer variações, provavelmente devido a utilização do BS como nutriente pelo microrganismo ou devido a alguma reação de conjugação entre o BS e outros metabólitos secretados no meio. Ao final das 96 h de fermentação observou-se um IE₂₄ de 49 %.

Uma possível explicação da melhor produção de BS no experimento com células livres em 24 h de cultivo, quando comparado ao experimento com células imobilizadas em esferas de alginato pode ser devido a limitação do acesso dos nutrientes do meio de cultivo.

Como descrito por de Carvalho (2004) a matriz de alginato de cálcio representa uma barreira que pode alterar o mecanismo de transporte de xilose e outros nutrientes para o interior da célula, e ao mesmo tempo, possíveis zonas anaeróbias podem existir dentro do suporte devido a uma menor taxa de transferência de oxigênio. Esses efeitos resultam em um decréscimo do aumento da biomassa, consumo de xilose e finalmente afetam a produção de BS.

No presente trabalho o máximo consumo de xilose e a máxima produção de BS não aconteceu após 48 h de fermentação. Outro fato importante de ser destacado, é que nas primeiras horas de fermentação, o meio de cultura encontrava-se transparente. Após 48 h

de fermentação foi observada uma turbidez do meio de cultura, que de acordo com Chen e Huang (1988) e Antunes (2015), pode-se dever à saída das células do interior do suporte para o meio de fermentação, o que, segundo Quirós et al (1995) e de Carvalho (2004), acontece naturalmente devido à presença de poros na superfície das esferas de alginato de cálcio e ao crescimento das células presentes no interior do suporte.

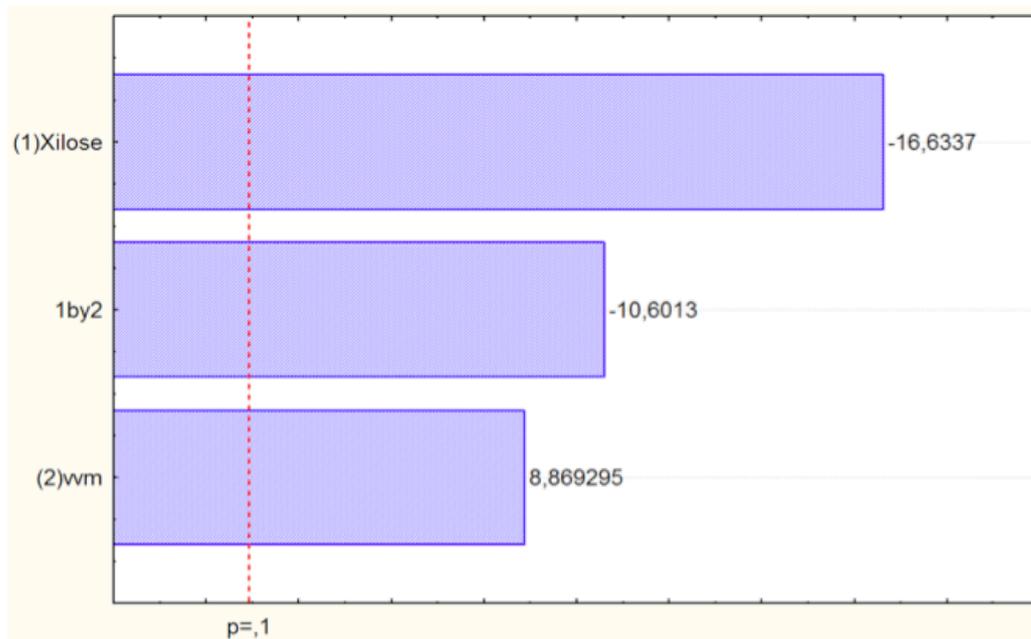
5.7 Produção de biossurfactantes em reator de leito fluidizado com células imobilizadas de *C. mucoïdes*

5.7.1 Efeito das concentrações de xilose e aeração no crescimento celular

No presente estudo, foi feito um planejamento estatístico 2^2 com três replicatas no ponto central (totalizando 7 ensaios), para avaliar o efeito das concentrações de xilose e aeração na produção de biossurfactante e no crescimento celular. Como pode-se observar no gráfico de pareto (figura 30), a xilose apresentou um efeito significativo negativo no crescimento celular, pois quanto mais concentração de fonte de carbono foi utilizada nestes experimentos, menor o crescimento celular. Como reportado amplamente na literatura, um efeito de inibição por substrato poderia estar sendo observado.

Ao mesmo tempo foi observado que quanto maior aeração foi utilizada mais biomassa foi produzida, comportamento típico em sistemas de alta aeração onde o metabolismo microbiano é desviado para a geração de Acetil-CoA e posteriormente ATP via cadeia de transporte de elétrons. Como reportado por Guiotti (2018), em ensaios realizados para produção de BS pela levedura *C. mucoïdes* em reator de tanque agitado, quanto menor aeração utilizada nos experimentos, observou-se o melhor IE₂₄ (70%), coincidindo com os resultados obtidos nos nossos experimentos, pois em sistemas com baixos teores de oxigênio, o metabolismo microbiano é desviado para produção de metabolitos primários e secundários para a recuperação dos cofatores NAD⁺ e NADH reduzindo-se a formação de células e aumentando a síntese de produtos por vias fermentativas.

Figura 30- Gráfico de pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes xilose (g/L) e vazão de ar no crescimento celular (g/L).

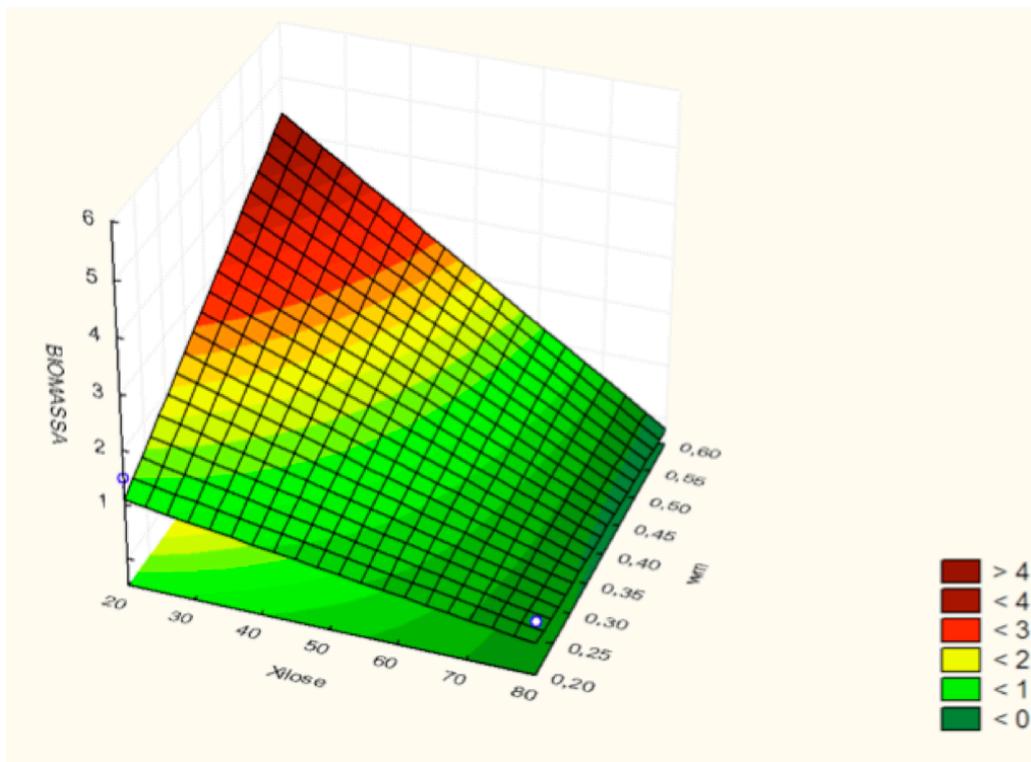


Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos em este estudo dos efeitos da concentração de fonte de carbono e vazão de ar, coincidem com o reportado em trabalhos anteriores constatado que nossa levedura efetivamente é um microrganismo produtor de BS, e que a síntese da biomolécula pode ser realizada mediante a utilização de duas rotas metabólicas certamente fermentativas, ao mesmo tempo foi reportado que baixas quantidades de oxigênio são necessárias para obter um melhor IE₂₄, e porém uma melhor produção de BS.

A figura 31 apresenta a superfície de resposta gerada da análise estatística, onde pode ser observado que baixas concentrações de fonte de carbono e altos teores de ar favorecem ao crescimento celular.

Figura 31 – Superfície de resposta do efeito das variáveis independentes na produção de biomassa celular.



Fonte: Arquivo pessoal

5.7.2 Efeito das concentrações de xilose e areação na produção de BS

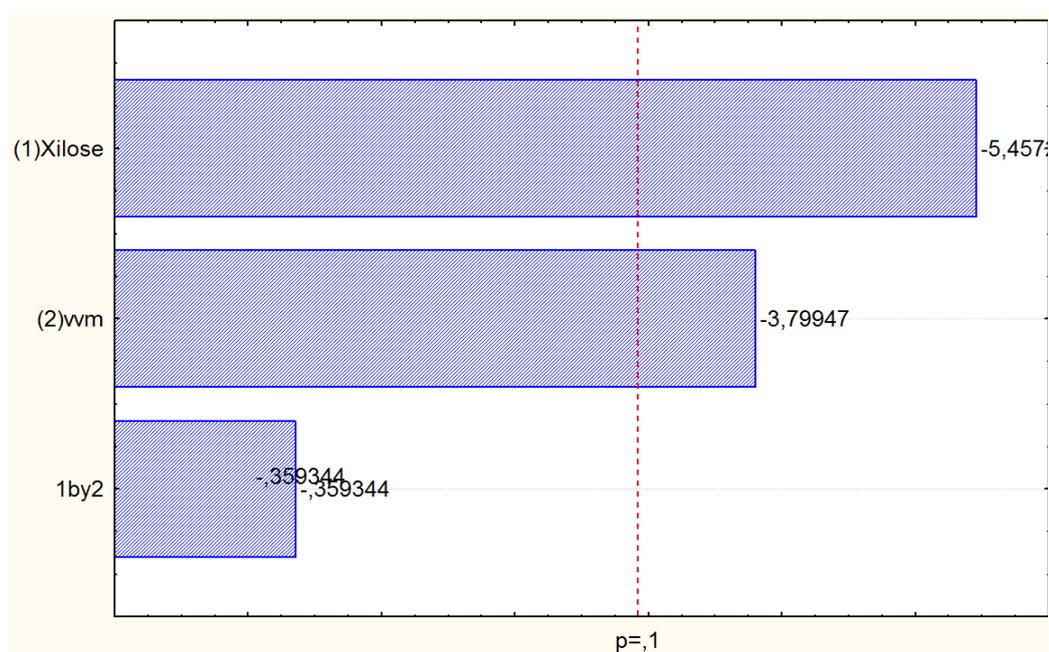
A produção de BS foi quantificada e os efeitos das concentrações de xilose e vazão de ar foram estudadas. O efeito destas variáveis na redução da tensão superficial foi estudada e os resultados foram analisados mediante um análise da viarianza. Os resultados são apresentados na figura 32.

Foi observado um efeito negativo significativo da xilose, pois quanto maior a quantidade utilizada nos experimentos, foi observada uma menor redução da tensão superficial. O maior IE₂₄ observado foi 60 % e corresponde aos ensaios realizados com a menor quantidade de xilose nas formulações dos meios de cultura, coincidindo com os resultados obtidos para produção de biomassa e com resultados obtidos por Marcelino et al (2018), confirmando que a produção de BS geralmente é um processo altamente acoplado ao crescimento celular.

Assim, poderia-se inferir, que para obter uma melhor quantidade de BS, deveria-se trabalhar também com as melhores condições para crescimento celular.

Não entanto, como apresentado na figura 32, ao serem realizadas as análises dos efeitos das variáveis independentes na redução da tensão superficial, os resultados apontam que, a xilose apresentou um efeito negativo na redução da tensão superficial.

Figura 32- Gráfico de pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes xilose (g/L) e vazão de ar na redução da tensão superficial



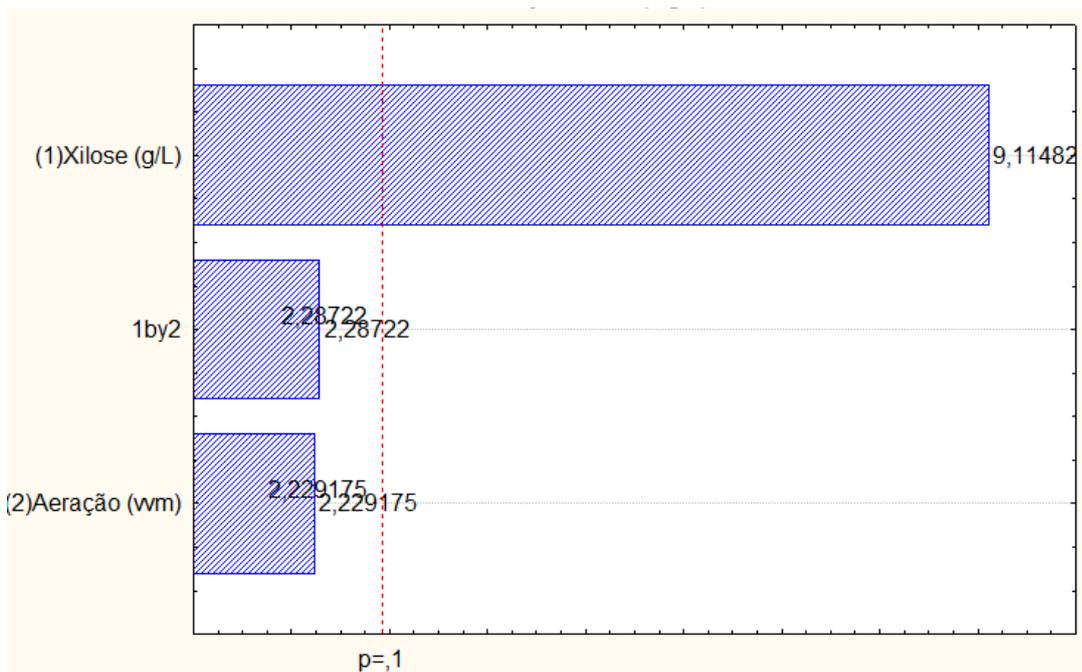
Fonte: Arquivo pessoal.

Na figura 33, são apresentados os efeitos das variáveis independentes na produção de BS. Conforme pode ser observado no gráfico de pareto, a xilose mostrou um efeito positivo na obtenção da molécula, indicando que quanto maior fosse a quantidade de xilose utilizada no meio de cultivo, maior produção de BS obtida.

Como mencionado previamente, segundo Cameotra e Makkar (1998), a biossíntese de BS é descrita como um processo derivado de duas rotas metabólicas, uma delas para a síntese da fração polar da molécula e outra para a fração apolar, de acordo com os resultados obtidos em este experimento após a quantificação de BS produzido, foi

observado que quando nossa levedura é utilizada para trabalhar com altas concentrações de fonte de carbono, é obtida uma maior produção de BS.

Figura 33- Gráfico de pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes xilose (g/L) e vazão de ar na concentração de biossurfactante.



Fonte: Arquivo pessoal.

Segundo Albrecht; Rau e Wagner (1996), em baixas concentrações de fontes de nitrogênio, ocorre um decréscimo da atividade da enzima isocitrato, levando a um acúmulo de isocitrato e citrato na mitocôndria sendo depois transportados ao citosol, onde o citrato é clivado pela citrato sintase, originando acetil-coA, metabólito precursor da síntese de ácidos graxos aumentando, dessa forma, a produção de BS.

Ao mesmo tempo, Ito e Inoue Campos et al. (2013), descrevem a produção dos BS como uma estratégia para facilitar o transporte e incorporação de substratos insolúveis para o interior da célula.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em este estudo, permitem concluir que:

- A metodologia empregada na hidrólise do bagaço de cana de açúcar ajudou na depolimerização da fração hemicelulósica, obtendo uma quantidade significativa de xilose (110 g/L) no HHBCA.
- Baseados nos índices de emulsificação obtidos (>50%), a levedura utilizada em este estudo apresentou uma boa produção de BS quando o HHBCA é utilizado no meio de cultura como fonte de carbono, o qual indica que a fração hemicelulósica do bagaço pode ser hidrolisada para obter açúcares de segunda geração e ser utilizados em bioprocessos para a obtenção de moléculas como os biosurfactantes.
- Quando altas concentrações de fonte de nitrogênio estão presentes no meio de cultura, a produção de biosurfactantes se ve influenciada de forma negativa.
- A imobilização celular em gel de alginato de cálcio, permite obter IE₂₄ similares a os obtidos quando o microrganismo é utilizado livre no meio de cultura, o qual garante a re-utilização do preinóculo em um sistema de batelada contínua.
- É possível produzir BS em reator de leito fluidizado com células imobilizadas em gel de alginato de cálcio em condições pre-determinadas, evitando a formação de espuma.
- Para uma melhor redução da tensão superficial do meio, são necessárias condições de pouca aeração e baixos teores de fonte de carbono.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. Initial steps of sophoroselipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 67-73, 1996.

ANTUNES, F. A. Imobilização celular de *Schefferomyces 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. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), Lorena, 2015.

ANWAR, Zahid; GULFRAZ, Muhammad; IRSHAD, Muhammad. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of radiation research and applied sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.

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

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant biology**. v. 54, n. 1, p. 519-546, 2003.

BOZELL, J.; PETERSEN, R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. **Green Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 539-554, 2010.

BROWN, M. J. Biosurfactants for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 13, n. 2, p. 61-64, 1991.

BRUMANO, Larissa Pereira; SOLER, Matheus Francisco; DA SILVA, Silvio Silvério. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2016.

CALDARELLI, C.; DE MORAES, M.; PASCHOALINO, Pietro André Telatin. Sugarcane ethanol industry effects on the GDP per capita in the Center-South region of Brazil. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 15, n. 2, p. 183-200, 2017.

CAMEOTRA, S. Singh; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 50, n. 5, p. 520-529, 1998.

CAMILIOS-NETO, D. et al. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1395-1403, 2011.

CAMPOS, Jenyffer Medeiros, et al. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**. v. 29, n. 5, p. 1097-1108, 2013.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **BioMed Research International**, v. 12, n. 2, 2012.

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

CASSIDY, Daniel P.; HUDAK, Andrew J. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. **Journal of hazardous materials**. v. 84, n. 2, p. 253-264. 2001

CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, 2007.

CHANDEL, Anuj K. et al. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid–base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 63, 2014.

CHANDEL, Anuj K.; DA SILVA, Silvio Silvério; SINGH, Om V. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. **BioEnergy Research**, , v. 6, n. 1, p. 388-401. 2013.

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

CHEN, S. Y. et al. Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Biotechnology Programme**, v. 23, p. 661-666, 2007.

CHEN, Kuo-Cheng; HUANG, Chang-Tze. Effects of the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel beads upon bead structure and oxygen transfer characteristics. **Enzyme and microbial technology**, v. 10, n. 5, p. 284-292, 1988.

COLLOT, A.-G. et al. Co-pyrolysis and co-gasification of coal and biomass in bench-scale fixed-bed and fluidised bed reactors. **Fuel**, v. 78, n. 6, p. 667-679, 1999.

CRESTINI, C., et al. Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalisation of lignin and lignocellulosic fibers. **Catalysis today**. v. 156, n. 1-2, p. 8-22, 2010.

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

D'ALMEIDA, J. R. M.; AQUINO, R. C. M. P.; MONTEIRO, S. N. Tensile mechanical properties, morphological aspects and chemical characterization of piassava (*Attalea funifera*) fibers. **Applied Science and Manufacturing**, v. 37, n. 9, p. 1473-1479, 2006.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher. 2011.

DE CARVALHO, W. Estudo da obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana com células imobilizadas em gel de alginato de cálcio. 2005. Tese (Doutor em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), Lorena, 2005.

DE WOLF, Watze; FEIJTEL, Tom. Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils. **Chemosphere**, v. 36, n. 6, p. 1319-1343. 1998.

DING, Shi-You; HIMMEL, Michael E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 597-606, 2006.

ELDIN, Ahmed M.; KAMEL, Zeinat; HOSSAM, Nermeen. Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 309-314, 2019.

FAHIM, S. et al. Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 70-76, 2013.

FIDALGO, W. Produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado a partir da etanolise do óleo de babaçu: estabelecimento das condições reacionais e operacionais 2014. 158 p. Tese (Doutor em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2014.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biosurfactante por levedura. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. **American Journal of Drug Discovery and Development**. v. 1, n. 1, p. 58-69, 2011.

GUERRA-SANTOS, Luis; KÄPPELI, Othmar; FIECHTER, Armin. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 48, n. 2, p. 301-305, 1984.

GUDIÑA, Eduardo J., et al. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 34, n. 12, p. 667-675, 2013.

GUDIÑA, Eduardo J.; TEIXEIRA, José A.; RODRIGUES, Lígia R. Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, p. 38, 2016.

GRUBER, T., CHMIEL, H., KAPPELI, O. Integrated process for continuous rhamnolipid biosynthesis. In: KOSARIC, N. Biosurfactants. **Surfactants Science Series**. Cap. 5, p. 157-173, 1993.

HEALY, M. G. et al. Microbial production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 18, p. 41-57, 1996.

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

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. et al. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 489-496, 2016.

HEALY, M. G. et al. Microbial production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 18, p. 41-57, 1996.

HILARES-TERÁN, R. et al. 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.

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

ITO, S.; INOUE, S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 43, n. 6, p. 1278-1283. 1982.

KIM, HYUN-SOO, et al. Sophorolipid production by *Candida bombicola* ATCC 22214 from a corn-oil processing byproduct. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 15, n. 1, p. 55-58, 2005.

KIM, Seungdo; DALE, Bruce E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**. v. 26, n. 4, p. 361-375, 2004.

KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, I. E., et al. Rhamnolipid CMC prediction. **Journal of Colloid and Interface Science**. p. 10-19, 2017.

KITAMOTO, D., et al. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 31-36, 1990.

KOVALENKO, Valeri I. Crystalline cellulose: structure and hydrogen bonds. **Russian Chemical Reviews**, v. 79, n. 3, p. 231, 2010.

KUIPER, I., et al. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. **Molecular microbiology**, v. 51, n. 1, p. 97-113, 2004.

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

LEWIS, Michael A. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. **Water Research**. v. 25, n. 1, p. 101-113, 1991.

LEE, Ki-Yong; HEO, Tae-Ryeon. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 2, p. 869-873, 2000.

LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 75-81, 1998.

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

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

MAKKAR, Randhir S.; CAMEOTRA, Swaranjit S.; BANAT, Ibrahim M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB express**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MANN, Reinier M., et al. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2903-2927, 2009.

MARCELINO, P. R. F. Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 2016. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP). Lorena, 2016.

MARCELINO, P. R. F., et al. Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitidis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases. **PLoS one**, v. 12, n. 11, p. e0187125, 2017.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MARCHANT, Roger; BANAT, Ibrahim M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants?. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 9, p. 1597-1605, 2012.

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

MAKKAR, Randhir S.; CAMEOTRA, Swaranjit S.; BANAT, Ibrahim M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB express**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 1, p. 61-64. 1994.

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

MONTEIRO, Andrea S., et al. Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevideense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. **Journal of Basic Microbiology**. v. 49, n. 6, p. 553-563, 2009.

MORÁN, Juan I., et al. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose**. v. 15, n. 1, p. 149-159. 2008.

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

MULLIGAN, Catherine N.; GIBBS, BERNARD F. Types, production and applications of biosurfactants. **Proceedings-Indian National Science Academy Part**. v. 70, n. 1, p. 31-56, 2004.

NGUYEN, Thu TL, et al. Biocompatible lecithin-based microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: formulation and potential applications. **Journal of colloid and interface science**, v. 348, n. 2, p. 498-504, 2010.

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

O'SULLIVAN, Antoinette C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173-207, 1997.

PACWA-PŁOCINICZAK, M., et al. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-654. 2011.

PANSIRIPAT, S., et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: effect of oil-to-glucose ratio. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 185-191, 2010.

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

PHINICHKA, Natthapong; KAENTHONG, Sirinun. Regenerated cellulose from high alpha cellulose pulp of steam-exploded sugarcane bagasse. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 7, n. 1, p. 55-65, 2018.

PORNSUNTHORNTAWEE, O. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 2, p. 172-179, 2008.

PORNSUNTHORNTAWEE, O. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effects of oil loading rate and cycle time. **Bioresource technology**, v. 100, n. 2, p. 812-818, 2009.

RAHMAN, Pattanathu KSM; RANDHAWA, Kamaljeet K. Sekhon. Microbiotechnology based surfactants and their applications. **Frontiers in microbiology**. v. 6, p. 1344, 2015.

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

RODRIGUES, Rita CLB et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1231-1237, 2003.

RON, Eliora Z.; ROSENBERG, Eugene. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current opinion in biotechnology**. v. 13, n. 3, p. 249-252, 2002.

SACHDEV, Dhara P.; CAMEOTRA, Swaranjit S. Biosurfactants in agriculture. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 97, n. 3, p. 1005-1016, 2013.

SANTOS, A. S. **Produção de rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa***. 2003, Tese (Doutorado), Instituto de Química/Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2003.

SARACHAT, T. et al. Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 1, p. 324-330, 2010.

SCHELLER, Henrik V.; ULVSKOV, Peter. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, 2010.

SILVA, M. T. S. **Produção e concentração integrada de surfactina a partir de bacillus sp ITP-001 em fracionamento com espuma em semi-batelada**. 2003, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo) Programa De Pós-Graduação Em Engenharia De Processos, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2013.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-149, 1965.

SIRÓ, István; PLACKETT, David. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, v. 17, n. 3, p. 459-494, 2010.

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

THYGESEN, Anders, et al. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. **Cellulose**. v. 12, n. 6, p. 563, 2005.

UZOIGWE., et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in microbiology**. v. 6, p. 245, 2015.

VAN BOGAERT, Inge NA, et al. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 76, n. 1, p. 23-34, 2007.

VERBELEN, Pieter J., et al. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology letters**. v. 28, n. 19, p. 1515-1525, 2006.

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

YANG, H., et al. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, , v. 86, n. 12-13, p. 1781-1788, 2007.

ZHANG, S.; CHAI, X.; BARNES, G. Determination of Critical Micelle Concentration of Surfactants by Headspace Gas Chromatography. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 20, n. 6, p. 1395-1400, 2017.