

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ROGGER ALESSANDRO MATA DA COSTA

**Produção de biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* LB83 em
fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-
tratado por cavitação hidrodinâmica**

Lorena

2021

ROGGER ALESSANDRO MATA DA COSTA

Produção de biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* LB83 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica

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

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Versão Corrigida

Lorena

2021

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

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

Costa, Rogger Alessandro Mata
Produção de biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* LB83 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica / Rogger Alessandro Mata Costa; orientador Silvio Silvério Silva - Versão Corrigida. - Lorena, 2021.
96 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. 2021

1. Biossurfactante. 2. Fermentação em estado sólido. 3. Cavitação hidrodinâmica. 4. Enzimas celulolíticas. I. Título. II. Silva, Silvio Silvério, orient.

Agradecimentos

Aos meus pais, Euclides Ulysses e Sandra Suely, madrinha e avó, que não guardaram esforços a minha educação e fizeram o máximo possível para me dar a oportunidade dos estudos; sou eternamente grato e pra sempre amarei vocês.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, que me aceitou em sua tutela acadêmica e científica, pela confiança e apoio por todo trabalho que pude realizar nas dependências laboratoriais e pelo seu imenso esforço frente a pandemia para com os seus compromissos quanto orientador e diretor da faculdade. Agradeço muito pelo seu esforço, dedicação, paciência e compromisso.

A família Barbeta e Midões, que me acolheram em Lorena. Sem vocês, com toda certeza o período do mestrado seria muito mais difícil. Muito obrigado por todo carinho, amor incondicional e afeto que me foi dado nessa jornada. Eu sou muito grato por tudo. Em especial, a Cecília Barbeta e ao meu amigo e irmão Rodrigo Barbeta Midões, que foi o responsável por tudo isso. Sem dúvida, foi a pessoa mais importante pra mim em toda essa jornada.

A família Gonçalves e Torres, que me apoiaram desde Belém, acreditaram no meu potencial e depositaram uma enorme confiança em mim. Agradecimentos em especial à Tia Nei, Tia Ivone e ao Felipe Pacheco. Pra sempre serei muito grato.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Júlio César dos Santos e ao Dr. Paulo Franco Marcelino, que se disponibilizaram inúmeras vezes ao debate dos resultados, por toda a paciência ao me acompanhar, corrigir e guiar na produção científica. Também agradeço pelas conversas, dicas e cuidado que vocês tiveram comigo nessa jornada. A presença de vocês foi essencial na construção e término deste trabalho. Muito obrigado pelo suporte.

Agradecer a minha namorada, Heloísa Monteiro, pelo amor, suporte e todo carinho que me foi dado em momentos felizes e de crises, pelo apoio e a coragem de namorar alguém tão chato quanto eu.

Agradeço aos amigos de laboratório e da pós-graduação em geral. Principalmente por toda ajuda contribuída e a solução dos problemas que a surgiram ao longo do caminho. Cada contribuição foi essencial e aos que me ajudaram de forma direta e indiretamente, meus mais sinceros agradecimentos. Em especial a Dr. Daylin Rubio Ribeaux, que foi minha amiga, incentivadora e inspiração em todos os momentos possíveis; a qual também sou muito grato.

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

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

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

Resumo

COSTA, R.A.M. **Produção de biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* LB83 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica.** 2021. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2021.

Biossurfactantes são metabólitos microbianos que apresentam características físico-químicas e biológicas de grande interesse aos mais variados segmentos industriais como tensoatividade, emulsificação e potencial antimicrobiano e antitumoral. Além da versatilidade de aplicações, são compostos sustentáveis, podendo ser produzidos a partir de subprodutos agroindustriais. O bagaço de cana-de-açúcar, principal subproduto da indústria sucroalcooleira brasileira, é uma alternativa utilizada como substrato em bioprocessos. Contudo essa biomassa lignocelulósica possui em sua composição teores significativos de lignina quando se encontra *in natura*, dificultando assim a utilização dos açúcares fermentescíveis para os processos biotecnológicos. Várias metodologias para remoção de lignina foram relatadas e, entre esses métodos, a cavitação hidrodinâmica é uma técnica que vem despertando interesse. No presente estudo, o pré-tratamento por cavitação hidrodinâmica foi otimizado utilizando um planejamento fatorial do tipo 2^3 (Box-Behnken) elucidando os efeitos dos parâmetros utilizados concentração de NaOH (0,1 – 0,5 mol/L), tempo (5 – 25 minutos) e carregamento de sólidos (1 – 2 %) na deslignificação do bagaço. A condição otimizada foi de 0,5 mol/L, 25 minutos e 1% e obteve 44,7% de deslignificação da biomassa, que foi utilizada para produção de biossurfactante pela *Aureobasidium pullulans* LB83 em fermentação em estado sólido. Além disso, foram analisadas as propriedades emulsificantes e tensoativas do biossurfactante obtido. Nos testes físico-químicos, o biossurfactante apresentou um índice de emulsificação máximo 38,2 % para querosene e 46,2 % para óleo de soja, e nenhuma diminuição superficial foi observada. Também foram analisadas as atividades de enzimas celulolíticas durante a fermentação em estado sólido, observando-se índices máximos para endoglucanases, exoglucanases e FPases em torno de $2,43 \pm 0,1$, $1,45 \pm 0,5$ e $0,041 \pm 0,003$ IU g⁻¹ respectivamente. Desse modo, o presente trabalho mostrou que é possível associar a variação das atividades das enzimas celulolíticas, com o consumo de açúcares do bagaço de cana e a produção de biossurfactantes. Estes fatos são indicativos de que é possível utilizar o bagaço pré-tratado por cavitação hidrodinâmica como fonte de carbono a produção sustentável do biossurfactante pela *Aureobasidium pullulans* LB83.

Palavras-chave: Biossurfactante. Fermentação em estado sólido. Cavitação hidrodinâmica. Enzimas celulolítica

Abstract

COSTA, R.A.M. **Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* LB83 in solid state fermentation using sugarcane bagasse pretreated by hydrodynamic cavitation.** 2021. 96 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2021.

Biosurfactants are microbial metabolites that present physicochemical and biological characteristics of great interest to the most varied industrial segments, such as tensoactivity, emulsification and antimicrobial and antitumor potential. In addition to the versatility of applications, they are sustainable compounds, which can be produced from agro-industrial by-products. Sugarcane bagasse, the main by-product of the Brazilian sugar and alcohol industry, is an alternative used as a substrate in bioprocesses. However, this lignocellulosic biomass has significant amounts of lignin in its composition when it is in natura, thus making it difficult to use fermentable sugars for biotechnological processes. Several methodologies for lignin removal have been reported and, among these methods, hydrodynamic cavitation is a technique that has been attracting interest. In the present study, the pretreatment by hydrodynamic cavitation was optimized using a type 2^3 factorial design (Box-Behnken) elucidating the effects of the parameters used, NaOH concentration (0.1 - 0.5 mol/L), time (5 – 25 minutes) and loading of solids (1 – 2 %) in the bagasse delignification. The optimized condition was 0.5 mol/L, 25 minutes and 1% and obtained 44.7% delignification of the biomass, which was used for biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* LB83 in solid state fermentation. Furthermore, the emulsifying and surfactant properties of the obtained biosurfactant were analyzed. In the physicochemical tests, the biosurfactant showed a maximum emulsification index of 38.2% for kerosene and 46.2% for soybean oil, and no surface decrease was observed. The activities of cellulolytic enzymes during solid state fermentation were also analyzed, observing maximum indices for endoglucanases, exoglucanases and FPases around 2.43 ± 0.1 , 1.45 ± 0.5 and 0.041 ± 0.003 IU g⁻¹ - respectively. Thus, the present work showed that it is possible to associate the variation of cellulignolytic enzyme activities with the consumption of sugarcane bagasse and the production of biosurfactants. These facts indicate that it is possible to use bagasse pretreated by hydrodynamic cavitation as a carbon source for the sustainable production of the biosurfactant by *Aureobasidium pullulans* LB83.

Keywords: Biosurfactant. Solid state fermentation. Hydrodynamic cavitation. cellulolytic enzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do surfactante e suas regiões hidrofílicas e hidrofóbicas -----	20
Figura 2 – Representação dos efeitos do uso de surfactante em sistemas como água e óleo -----	21
Figura 3 – Ilustração da estabilização estérica de gotículas de água devido à adsorção de polímero-----	21
Figura 4 – Ilustração da formação de micelas em meio: A – Polar e B – Apolar -----	22
Figura 5 – Fluxograma esquemático do curso da poluição do surfactante -----	24
Figura 6 – Estruturas químicas de ramnolipídeos (mono e di), sofolopídeos e treololipídeos -----	26
Figura 7 – Estruturas químicas dos compostos: A– surfactina; B – polimixina E e C – líquenisisina -----	27
Figura 8 – Estrutura química predita do fosfolipídio gerado pela <i>Lactobacillus heveticu</i> -	28
Figura 9 – Estrutura química do emulsan produzido por <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ---	29
Figura 10 – (A) Variação da pressão e condições de fluxo no dispositivo de cavitação (venturi); (B) Processo de formação até explosão de bolhas na cavitação hidrodinâmica. -----	36
Figura 11 – Tipos de venturi: (A) retangular, (B) circular, (C) Elíptica e (D) Configuração de dispositivo de cavitação de orifício único e múltiplo-----	37
Figura 12 – Apresentação dos principais efeitos da cavitação hidrodinâmica -----	39
Figura 13 – Simulação dos efeitos da cavitação hidrodinâmica na biomassa-----	40
Figura 14 – (a) Intermediário de lignina formado após a reação da lignina com radical ·OH; após isso, interações com ·HOO podem gerar em em (b) condensação da lignina e em (c) degradação da lignina-----	42
Figura 15 – Fluxograma demonstrando uma nova rota para conversão de subprodutos agroindustriais na produção de bioprodutos em FES para uma biorrefinaria. -----	44
Figura 16 – Esquema demonstrando a utilização de bagaço de cana-de-açúcar na produção de biosurfactante em fermentação em estado sólido-----	49
Figura 17 – Fluxograma de atividades principais -----	52
Figura 18 – Gráfico de Pareto para remoção de lignina (%) com nível de confiança de 95 %.-----	62
Figura 19 – Gráfico de Pareto para remoção de lignina (%): (esquerda) Kim et al., (2015)	

e (direita) Terán Hilares et al., (2017)-----	63
Figura 20 – Superfície de resposta e gráfico de contorno do modelo para remoção de lignina em função da concentração (mol/L) de NaOH e o tempo (em min) de pré-tratamento: (a) e (d) – carregamento de sólidos a 1 %; (b) e (e) – carregamento de sólidos a 1,5 % e (c) e (f) carregamento de sólidos a 2 %. -----	66
Figura 21 – Índice de emulsificação em 24 h (IE ₂₄) do extrato bruto nos substratos hidrofóbicos listados em diferentes tempos de fermentação em estado sólido. -----	70
Figura 22 – Comparação entre os índices de emulsificação de 24 horas (IE ₂₄) entre os extratos brutos de fermentação do 3° e 14° dia nos diferentes tipos de reagentes. -----	71
Figura 23 – Estabilidade da emulsão observada entre o primeiro (IE ₂₄) e último (IE ₁₄₄) índices de emulsificação do extrato bruto da fermentação do 14° dia em querosene e óleo de soja. -----	72
Figura 24 – Atividades enzimáticas mensuradas durante 14 dias de FES: atividades de endoglucanase e exoglucanase e atividade de FPases. Todos feitos em triplicata. Os resultados estão em unidade internacional de enzima por grama (IU.g ⁻¹).-----	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de biossurfactantes produzidos por leveduras de acordo com a classificação	30
Tabela 2 – Utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para produção de biossurfactante por diferentes microrganismos.....	33
Tabela 3 – Sínteses das principais metodologias de pré-tratamento.....	34
Tabela 4 – Síntese da utilização de solução alcalina e cavitação hidrodinâmica no tratamento de biomassa descritas na literatura.....	41
Tabela 5 – Biossurfactantes: microrganismos produtores em fermentação em estado sólido.....	46
Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial 2 ³ feito pelo experimento Box-Behnken utilizado para a otimização do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizando cavitação hidrodinâmica	54
Tabela 7 – Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (média ± desvio padrão).....	59
Tabela 8 – Composição química percentual do bagaço <i>in natura</i> : dados da literatura	59
Tabela 9 – Composição do bagaço <i>in natura</i> e dos resíduos sólidos após cada condição de pré-tratamento da matriz do planejamento de experimentos com valores reais e codificados (entre parênteses) para o pré-tratamento da cavitação hidrodinâmica no bagaço utilizando como fatores a concentração de NaOH (mol/L), tempo de cavitação (min) e carregamento de sólidos (%).	61
Tabela 10 – Análise de variância para um modelo 2FI composto para o rendimento de remoção de lignina do planejamento com nível de confiança de 95 %.	64
Tabela 11 – Resultados da caracterização para validação do modelo de remoção de lignina	64
Tabela 12 – Comparação dos resultados previsto com os obtidos experimentalmente.....	65
Tabela 13 – Comparação de tratamentos de biomassa por cavitação hidrodinâmica utilizando Orifícios de buraco.....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Propriedades e aplicações dos surfactantes.....	20
2.2	Biossurfactantes.....	24
2.2.1	Classificação dos biossurfactantes.....	25
2.2.2	Produção de biossurfactantes.....	29
2.2.3	Subprodutos agroindustriais na produção de biossurfactantes	32
2.3	Cavitação Hidrodinâmica.....	35
2.3.1	Parâmetros relacionados a cavitação hidrodinâmica	35
2.3.2	Efeitos associados a cavitação hidrodinâmica.....	37
2.3.3	Cavitação hidrodinâmica para pré-tratamento de biomassa	39
2.4	Fermentação em estado sólido.....	43
2.4.1	Características Gerais	43
2.4.2	Fermentação em estado sólido para produção de biossurfactantes.....	46
3	OBJETIVOS.....	51
3.1	Geral:	51
3.2	Específicos:	51
4	METODOLOGIA.....	52
4.1	Matéria prima	53
4.2	Granulometria do bagaço de cana-de-açúcar.....	53
4.3	Preparo e caracterização físico-química do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica.....	53
4.4	Otimização do processo de cavitação hidrodinâmica em bagaço de cana-de-açúcar.....	54
4.5	Manutenção do microrganismo	55
4.6	Capacidade adsortiva do bagaço de cana-de-açúcar.....	55
4.7	Preparo do inóculo e fermentação	55
4.8	Determinação do índice de emulsificação	56
4.9	Determinação da estabilidade de emulsão.....	56
4.10	Determinação da tensão superficial.....	56
4.11	Extração e recuperação do biossurfactante.....	56
4.12	Preparo do reativo de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).....	57
4.13	Atividade de carboximetilcelulase (CMCase).....	57
4.14	Atividade exoglucanase.....	57
4.15	Determinação de atividade FPase.....	58

4.16	Análise estatística.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Composição do Bagaço de cana-de-açúcar	59
5.2	Caracterização química do bagaço pré-tratado por cavitação hidrodinâmica	60
5.3	Análise das propriedades tensoativas e emulsificantes dos extratos brutos contendo biossurfactante	69
5.3.1	Análise da tensão superficial	69
5.3.2	Análise do índice e estabilidade da emulsificação.....	69
5.4	Análises das atividades enzimáticas.....	73
6	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

Surfactantes são substâncias químicas com estruturas anfifílicas, capazes de reduzir a tensão superficial, interfacial e emulsificar fluidos imiscíveis de polaridades distintas (Rosen e Kunjappu, 2012; Santos et al., 2016). Devido às suas estruturas com característica dual e suas propriedades físico-químicas, estas moléculas diferem-se em suas mais diversas aplicabilidades na pesquisa e em diferentes setores industriais como nas indústrias petroquímica, cosmética, de construção civil, agricultura, farmacêutica, alimentícia, têxtil entre outras (Özcan et al., 2007; Kralova et al., 2009; Anghinetti et al., 2012; Neta et al., 2015; Mnif et al., 2016; Negin et al., 2017; Akram et al., 2018). A maioria dos surfactantes são oriundos de matérias-primas derivadas do petróleo, sendo de difícil biodegradação e durante a fabricação, assim como o descarte, geram compostos que causam danos ao meio ambiente (Olkowska e Namie, 2011; Felipe e Dias, 2017).

Os surfactantes produzidos por microrganismos, ou biossurfactantes, apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes sintéticos, que incluem elevada biodegradabilidade, menor toxicidade, níveis de tolerância similares ou superiores quanto à temperatura, pH e força iônica (Yang et al., 2015). Os biossurfactantes são produtos importantes e que apresentam várias propriedades físico-químicas e/ou biológicas, como tensoatividade, emulsificação, lubrificação e ações antimicrobianas e até mesmo antitumorais (Soberón-Chávez e Maier, 2011; Felipe e Dias, 2017). Estas propriedades tornam os biossurfactantes produtos versáteis pela sua diversidade de aplicações devido às variadas propriedades físico-químicas e biológicas que são consequências de suas estruturas químicas que provém da utilização de diferentes microrganismos, da composição dos meios de cultivo e dos parâmetros físico-químicos utilizados no processo fermentativo (Abouseoud et al., 2008; Lotfabad et al., 2009).

A maioria dos relatos na literatura corresponde aos biossurfactantes produzidos por bactérias, entretanto, esses microrganismos apresentam algumas restrições, pois algumas bactérias podem ser oportunistas e/ou patogênicas, não sendo adequadas para o uso em processos desenvolvidos nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (Campos et al., 2013). Dessa forma, a utilização de leveduras como produtoras de biossurfactantes tornou-se viável por muitas apresentarem o *status* GRAS (*Generally Regarded As Safe*), assim, apresentam risco menores de toxicidade e reações patogênicas e também devido à maior resistência aos biossurfactantes secretados no meio durante a fermentação (Chapirão et al., 2015; Marcelino et al., 2017).

Quando comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes possuem baixo rendimento de produção e custos elevados, necessitando buscar maneiras alternativas de

produção, aumentando os rendimentos e reduzindo os gastos (Brumano, 2017). Uma das possíveis formas para reduzir custos de produção de biossurfactantes é a utilização de subprodutos agroindustriais em bioprocessos, como por exemplo, biomassas lignocelulósicas, amiláceas e oleaginosas (Al-Bahry et al., 2013). A produção nacional de cana-de-açúcar na safra 2021/2022 foi de 628,1 milhões de toneladas, correspondendo à geração de 174 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar, que são destinados, em grande parte, à queima para geração de energia (Companhia Nacional de Abastecimento - (CONAB), 2021). O bagaço da cana-de-açúcar é composto majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo denominado como uma biomassa lignocelulósica (Visser et al., 2015; Silva et al., 2016; Carneiro et al., 2019). Por ser essencialmente uma fonte abundante de material lignocelulósico rico em açúcares fermentescíveis, o bagaço de cana-de-açúcar, como substrato, mostra-se promissor em processos biotecnológicos para geração de bioprodutos como os biossurfactantes (Brumano, 2017).

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* apresenta uma estrutura com considerável teor de lignina. No entanto, a lignina age como limitadora no processo de hidrólise enzimática das frações de carboidratos da parede celular, restringindo as hidrólises das frações de celulose e hemicelulose (Andrade, 2015). Desse modo, o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar torna-se essencial, pois, diminui a quantidade de lignina, tornando mais acessível a degradação de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis (Canilha et al., 2012). Por isso, buscam-se alternativas de tornar o material mais susceptível à ação das enzimas por tecnologias bem estabelecidas e em desenvolvimento de pré-tratamento da biomassa.

Existem diversas metodologias de pré-tratamento utilizadas na literatura que podem ser divididas, basicamente, em processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. A cavitação hidrodinâmica é uma técnica físico-química promissora que emprega um processo caracterizado pela formação, crescimento e colapso de bolhas, em meio líquido. Estes colapsos geram quantidades significativas de energia, acelerando reações químicas e físicas (Abdala Neto et al., 2014), sendo empregada no tratamento de biomassas (Terán Hilaes, 2017). Quando exposta ao processo de cavitação hidrodinâmica, a biomassa lignocelulósica é acometida por efeitos que ocasionam a degradação de moléculas orgânicas, como a lignina, permitindo uma maior acessibilidade às enzimas para o consumo das frações celulósica e hemicelulósica do material pré-tratado (Badve et al., 2014; Terán Hilaes et al., 2016).

A remoção da fração de lignina nos processos de pré-tratamento permite que o substrato consiga ser utilizado em fermentações em estado sólido (FES), em que se converte diretamente o substrato em um bioproduto, sem a necessidade de um processo de hidrólise. A FES é uma fermentação que ocorre em pouca disponibilidade de água, contendo apenas umidade suficiente

para o microrganismo proliferar (Buswell, 2005). Em comparação à fermentação submersa, a FES apresenta algumas vantagens como menor demanda energética, reduzidos volumes de água e maior concentração do produto obtido (Akpinar e Urek, 2012; Doriya et al., 2016). A FES também evita problemas que normalmente acontecem em fermentação submersa como produção de espuma e o aumento da viscosidade que afeta diretamente a transferência de oxigênio no meio (Krieger et al., 2010). Fungos e leveduras são geralmente adequados para a FES por necessitarem de uma menor quantidade de água disponível do que as bactérias (Costa et al., 2017).

Entre as leveduras produtoras de biossurfactantes, a *Aureobasidium pullulans* tem se destacado pela sua capacidade para produzir celulases e xilanases, o que possibilita a degradação da fração de carboidratos de materiais lignocelulósicos. De igual forma, o status GRAS (*generally regarded as safe*) dessa levedura, permite que ela possa ser utilizada em diversos processos industriais. Vários outros estudos corroboram que o uso da *A. pullulans* tornou-se possível e uma alternativa viável ao processo de produção de biossurfactantes (Kim et al., 2016; Brumano, 2017; Carneiro, 2019). Assim, este trabalho visa a contribuir com a produção de biossurfactantes por FES pela *A. pullulans* LB83 utilizando a cavitação hidrodinâmica como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar que foi utilizado como suporte e substrato ao bioprocessamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Propriedades e aplicações dos surfactantes

Surfactantes ou tensoativos são um grupo de substâncias químicas que possuem na sua estrutura molecular regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (Hassanshahian, 2014; Mao et al., 2015) como demonstrado na Figura 1. A parte hidrofóbica (cauda) do surfactante pode ser constituída por uma ou duas cadeias carbônicas, ou fluorocarbônicas, ou siloxânicas (Felipe e Dias, 2017); enquanto a parte hidrofílica (cabeça) do surfactante consiste em grupos iônicos ou não-iônicos polares, sendo geralmente denominados de catiônicos, aniônicos, não-iônicos polares e zwitteriônicos (Paria, 2008; Rosen e Kunjappu, 2012).

Essa estrutura química permite que essas moléculas reduzam as tensões superficiais e interfaciais de sistemas com diferentes polaridades e também emulsifiquem fluidos imiscíveis como água e óleo. Devido às suas características químicas estas substâncias vêm sendo amplamente aplicadas nos mais variados setores industriais e também investigadas por vários grupos de pesquisa do mundo (Saharan et al., 2012; Hassanshahian, 2014).

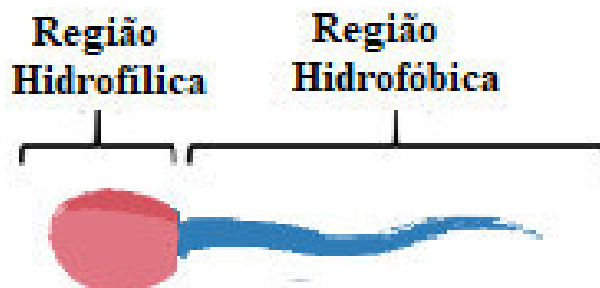


Figura 1 – Representação do surfactante e suas regiões hidrofílicas e hidrofóbicas

Uma das funções observadas dos surfactantes é promover a formação de emulsão, auxiliando a estabilidade da emulsão de líquidos essencialmente imiscíveis. Nesse sentido, a mistura de dois líquidos imiscíveis cria um sistema com alta energia livre em sua interface entre os líquidos. Por ser uma mistura termodinamicamente instável, o resultado é o restabelecimento de duas fases líquidas como em um sistema água e óleo, mostrados na Figura 2.

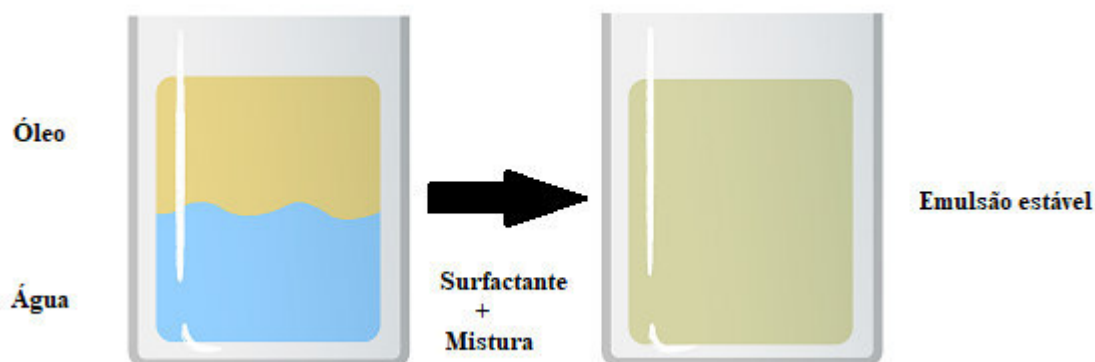


Figura 2 – Representação dos efeitos do uso de surfactante em sistemas como água e óleo

A formação de uma emulsão estável utilizando surfactantes é explicada por dois mecanismos principais: estabilização estérica e a eletrostática. A estabilização estérica age como uma barreira física para as partículas que foram englobadas pela micelização dos surfactantes (Urrutia, 2013), como demonstrado na Figura 3. A estabilização eletrostática explica-se nas forças repulsivas mútuas que são geradas quando superfícies carregadas elétricas se aproximam. A formação das partículas revertidas pelos surfactantes atuam como esferas carregadas e, se as forças repulsivas são fortes o suficiente, as gotículas revertidas são repelidas quando se aproximam, evitando coalescer e tornando a emulsão mais estável (Schramm, 2005; Urrutia, 2013). Quando as emulsões formadas são estáveis, os surfactantes são considerados emulsificantes e sua atividade emulsificante dependerá da sua concentração no meio, estrutura da molécula e o método de homogeneização (Koh et al., 2016).

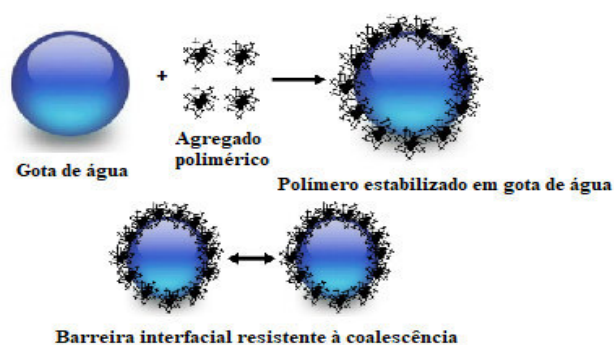


Figura 3 – Ilustração da estabilização estérica de gotículas de água devido à adsorção de polímero

Uma das características mais observadas dos surfactantes é a formação de aglomerados

moleculares chamados de micelas, que se formam após atingirem uma determinada concentração mínima no meio conhecida como concentração micelar crítica (CMC). A CMC é uma propriedade intrínseca de cada surfactante. A natureza química do grupo hidrofóbico, do grupo hidrofílico, temperatura, força iônica/presença de eletrólitos são fatores que afetam a CMC (Soberón-Chávez e Maier, 2011; Felipe e Dias, 2017). As micelas são formadas pela aglomeração dos surfactantes, buscando uma conformação onde há menor repulsão entre as moléculas aglomeradas e o meio. A micela normal, na Figura 4A, demonstra como seria a interação dos surfactantes na formação de micelas em meio apolar (água). Nesse caso, a parte hidrofóbica dos surfactantes interagem entre si e se associam, criando um ambiente com menor interação possível com a molécula de água, gerando assim a micelização, formando as chamadas micelas normais (Rosen e Kunjappu, 2012; Nakama, 2017). De forma similar, quando surfactantes são adicionados em meios apolares, há uma formação de micelas inversas, demonstradas na Figura 4B, pois as partes hidrofílicas tendem a se associar para uma menor interação com o meio.

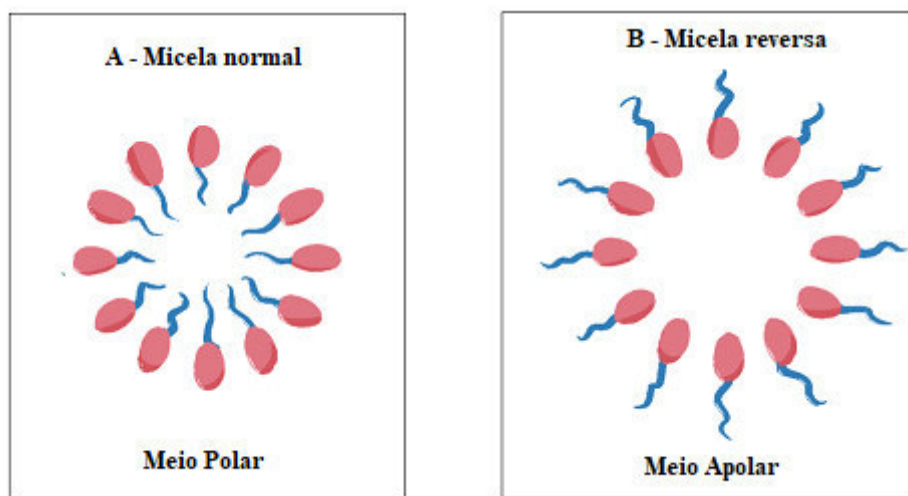


Figura 4 – Ilustração da formação de micelas em meio: A – Polar e B – Apolar

Os surfactantes possuem diversas aplicações nas pesquisas e em diferentes processos industriais. Nos cosméticos, os surfactantes participam mantendo líquidos imiscíveis uniformemente misturados. Ajudam a penetrar na pele e cabelo, e até manter a mistura estável por anos tornando-se essenciais para as formulações, pois, variando a concentração, os surfactantes podem ser utilizados para controlar o tempo de sensação do produto na pele e as funções de um produto durante o processo de desenvolvimento (Ruiz, 2008; Nakama, 2017). Na indústria do petróleo, os surfactantes são utilizados especialmente para o processo de recuperação aprimorada de petróleo devido à sua capacidade de reduzir a tensão interfacial, no aprisionamento das gotas de óleo pela formação das micelas e na diminuição da pressão capilar

permitindo que haja uma separação mais facilitada diminuindo a saturação residual e melhorando a recuperação de óleo (Bryan e Kantzas, 2007; Negin et al., 2017). As aplicações dos surfactantes envolvem também seu uso na construção civil (Izabel Cristina Barbosa Anghinetti, 2012), na agricultura (Sachdev e Cameotra, 2013; Mnif e Ghribi, 2016) na área farmacêutica (Akram et al., 2018; Edy Susanto, 2019) nas indústrias alimentícia (Kralova e Sjöblom, 2009; Neta et al., 2015), têxtil (Özcan et al., 2007) e na mineralização de compostos orgânicos (Noorimotlagh et al., 2019).

Por ser utilizado em diversas áreas industriais, o mercado global de surfactantes foi avaliado em cerca de 35,4 bilhões de dólares a partir de 2018, de acordo com as conclusões do analista de mercado da *IndustryARC*. Além disso, estima-se que o mercado de surfactantes cresça a uma taxa anual (CAGR) de 5,38 % durante o período de previsão de 2019 a 2025 (IndustryARC, 2019). Nos cosméticos, a demanda global por surfactantes incorporados em produtos de cuidados pessoais apresentará o CAGR 2019-2025 levemente mais acentuado, próximo de 5,8 %. Detergentes, sabonetes e produtos de limpeza são onde há maior aplicação de surfactantes, cujo mercado global está estimado em 10,3 bilhões de dólares em 2019 e deve chegar a 14,4 bilhões de dólares em 2025 (RESEARCH AND MARKETS, 2019).

A crescente demanda de surfactantes devido a intensas aplicações destes produtos na civilização moderna geraram vários problemas ambientais (Rebello et al., 2014). Muitos surfactantes sintéticos são produzidos por rotas químicas que utilizam compostos derivados do petróleo como matérias-primas e, tendem a ser tóxicos e de difícil decomposição microbiana, sendo considerados não-biodegradáveis. A baixa biodegradabilidade dos surfactantes sintéticos deve-se às longas cadeias carbônicas e/ou ramificadas e de compostos aromáticos em suas estruturas (Santos et al., 2016; Felipe e Dias, 2017). Um dos efeitos mais visíveis do descarte de surfactantes é no meio aquático, a formação de espuma excessiva, como ilustrados na Figura 5.

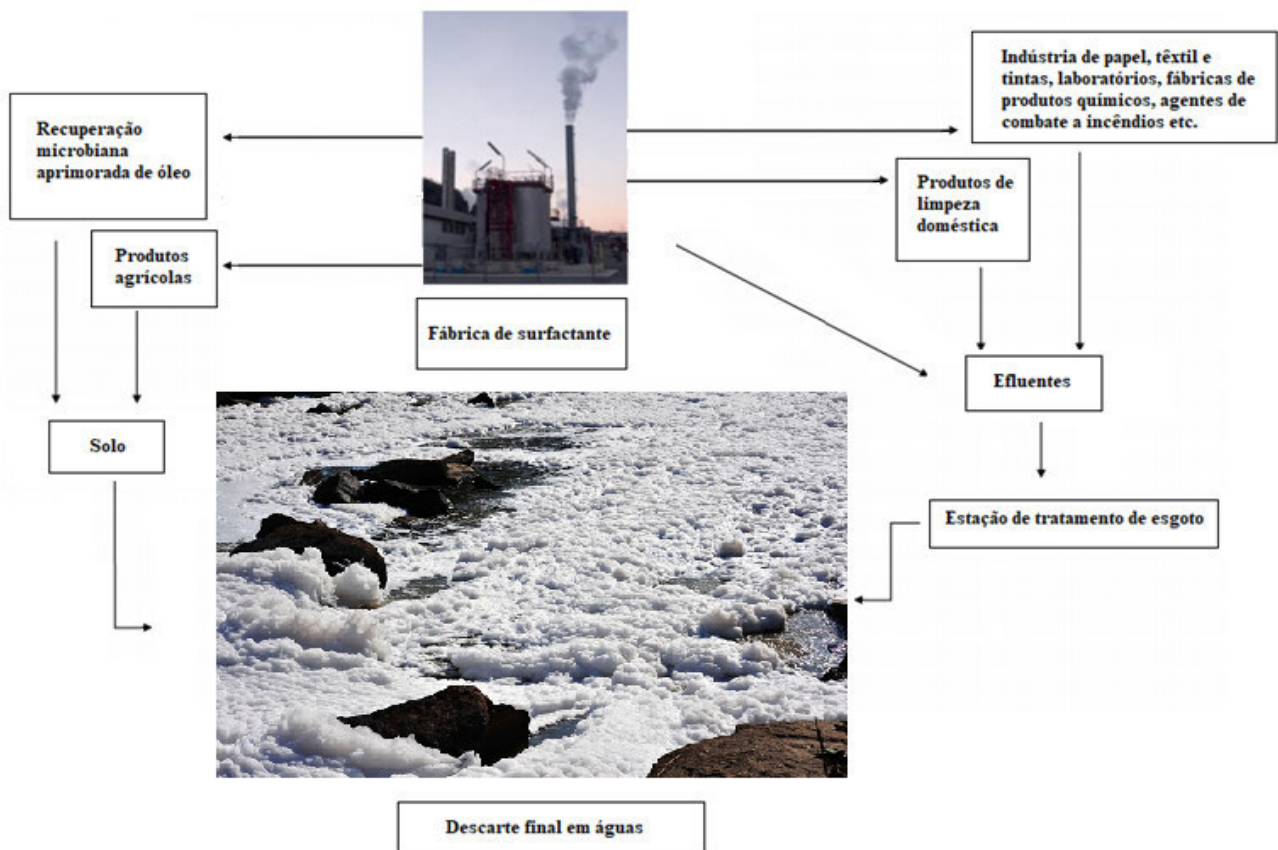


Figura 5 – Fluxograma esquemático do curso da poluição do surfactante

A presença de surfactantes em excesso em meios hídricos alteram a tensão superficial, taxa de evaporação, solubilidade, além de reduzir as taxas de oxigênio da água e raios solares incidentes, devido a formação de espumas, ocasionando morte de microrganismos, plantas aquáticas e até peixes (Ostroumov, 2005; Olkowska e Namie, 2011; Felipe e Dias, 2017). As mudanças geradas aos meio aquáticos, como aumento de nutrientes (principalmente o fósforo) seguido pelo crescimento descontrolado dos produtores primários aquáticos e a diminuição de oxigênio devido à decomposição da matéria orgânica ocasionam um problema conhecido como eutrofização (Khan e Mohammad, 2014).

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

2.2 Biossurfactantes

Os surfactantes produzidos por microrganismos são conhecidos como biossurfactantes ou surfactantes biológicos e apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes

sintéticos, que incluem melhor compatibilidade ambiental, alta seletividade, maior formação de espuma e atividade específica sob condições extremas, menor toxicidade, maiores níveis de tolerância à temperatura, pH, força iônica e biodegradabilidade (Yang et al., 2015; Arpita Roy, 2017). Os biossurfactantes são produtos importantes para as indústrias, uma vez que apresentam várias propriedades físico-químicas e/ou biológicas, como tensoatividade, emulsificação, lubrificação, ações antimicrobianas e antitumorais (Soberón-Chávez e Maier, 2011; Felipe e Dias, 2017). Estas propriedades tornam os biossurfactantes produtos versáteis o que também está associado a diversidade estrutural que estas moléculas apresentam. As várias classes de biossurfactantes microbianos encontrados atualmente está relacionada aos microrganismos utilizados, à composição dos meios de cultivo e aos parâmetros físico-químicos e operacionais utilizados no processo fermentativo (Abouseoud et al., 2008; Lotfabad et al., 2009).

As funções que um biossurfactante exerce é exclusivo da fisiologia e ecologia do microrganismo produtor apresentando uma ou mais funções em comum a todos os surfactantes microbianos (Cameotra et al., 2010). Estas funções naturais englobam: (1) Adesão - microrganismos podem usar seus biossurfactantes para regular suas propriedades de superfície celular, regulando a aderência (ou não) a superfícies de acordo com as suas necessidades. Sendo assim, um mecanismo fisiológico para crescimento e sobrevivência das células nos ambientes naturais, como exemplo comum temos o processo de adesão na formação dos biofilmes (Zhang e Maier, 1997; Rosenberg, 1999); (2) Emulsificação – a emulsificação desempenha um papel no crescimento do microrganismo em substratos imiscíveis em água. Foi observado que alguns microrganismos produtores de emulsificantes foram capazes de crescer em substratos insolúveis em água enquanto os que não produzem emulsificante, crescem discretamente em hidrocarbonetos (Cameotra et al., 2010); (3) Estratégia de Defesa - os biossurfactantes podem ser uma estratégia de defesa evolutiva do microrganismo. Em um estudo feito por pesquisadores, o biossurfactante demonstrou ter forte influência na sobrevivência de *B. subtilis* em seu habitat natural, por ter caráter antibacteriano, no solo e na rizosfera (Souza et al., 2003).

2.2.1 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em 5 grandes grupos: (1) glicolipídios, (2) lipopeptídeos ou lipoproteínas, (3) ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros, (4) surfactantes microbianos poliméricos e (5) biossurfactante

particulado (Chen et al., 2015; Sajna et al., 2015; Arpita Roy, 2017).

Os biossurfactantes do tipo glicolípídios são compostos por ácido graxo ligado por uma ligação glicosídica a uma fração de carboidrato. Diferentes associações de carboidratos e lipídios oferecem uma grande diversidade estrutural, levando à classificação de glicolípídios em diferentes subclasses (Figura 6) como: os ramnolípídeos, soforolípídeos e trealolípídeos (Kulakovskaya e Kulakovskaya, 2014; Arpita Roy, 2017); celobiolípídeos, lipossilitritrol, lipomanosil-manitóis, lipomananos e lipoarabinomananos, diglicosil diglicerídeos e monoacilglicerídeos (Mnif et al., 2017). Estes biossurfactantes se destacam pelo seu potencial para serem utilizados no campo ambiental como melhoradores da solubilidade, mobilidade e na biodegradação dos hidrocarbonetos (Mnif et al., 2017).

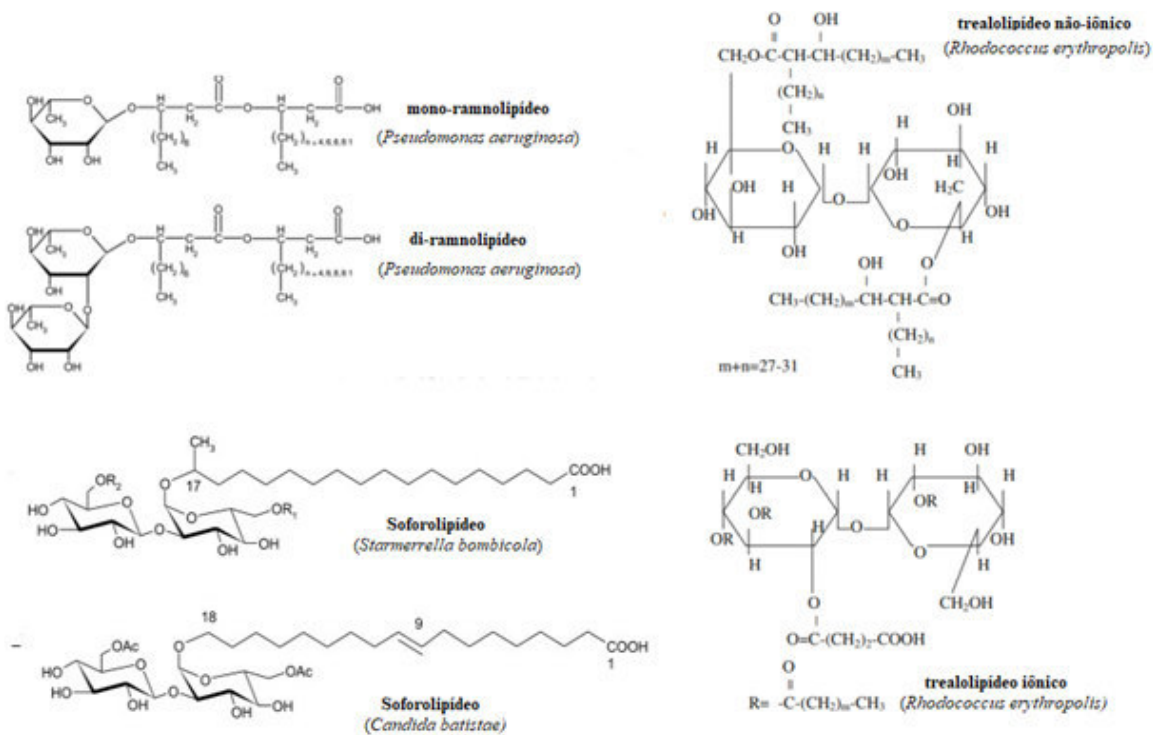


Figura 6 – Estruturas químicas de ramnolípídeos (mono e di), soforolípídeos e trealolípídeos

Os biossurfactantes do tipo lipopeptídeos ou lipoproteínas são, estruturalmente, constituídos por um ácido graxo ligados a uma porção proteica. As diferentes isoformas desses compostos diferem na composição da porção peptídica, no comprimento da cadeia de ácidos graxos e na ligação entre as duas partes (Inès e Dhouha, 2015). Uma das características mais notáveis dos lipopeptídeos é sua atividade antimicrobiana. Muitos lipopeptídeos são antibióticos bem conhecidos como a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, polimixina E produzida por

Paenibacillus amylolyticus e líquenissina por *Bacillus licheniformis* (Sajna et al., 2015), demonstradas na Figura 7.

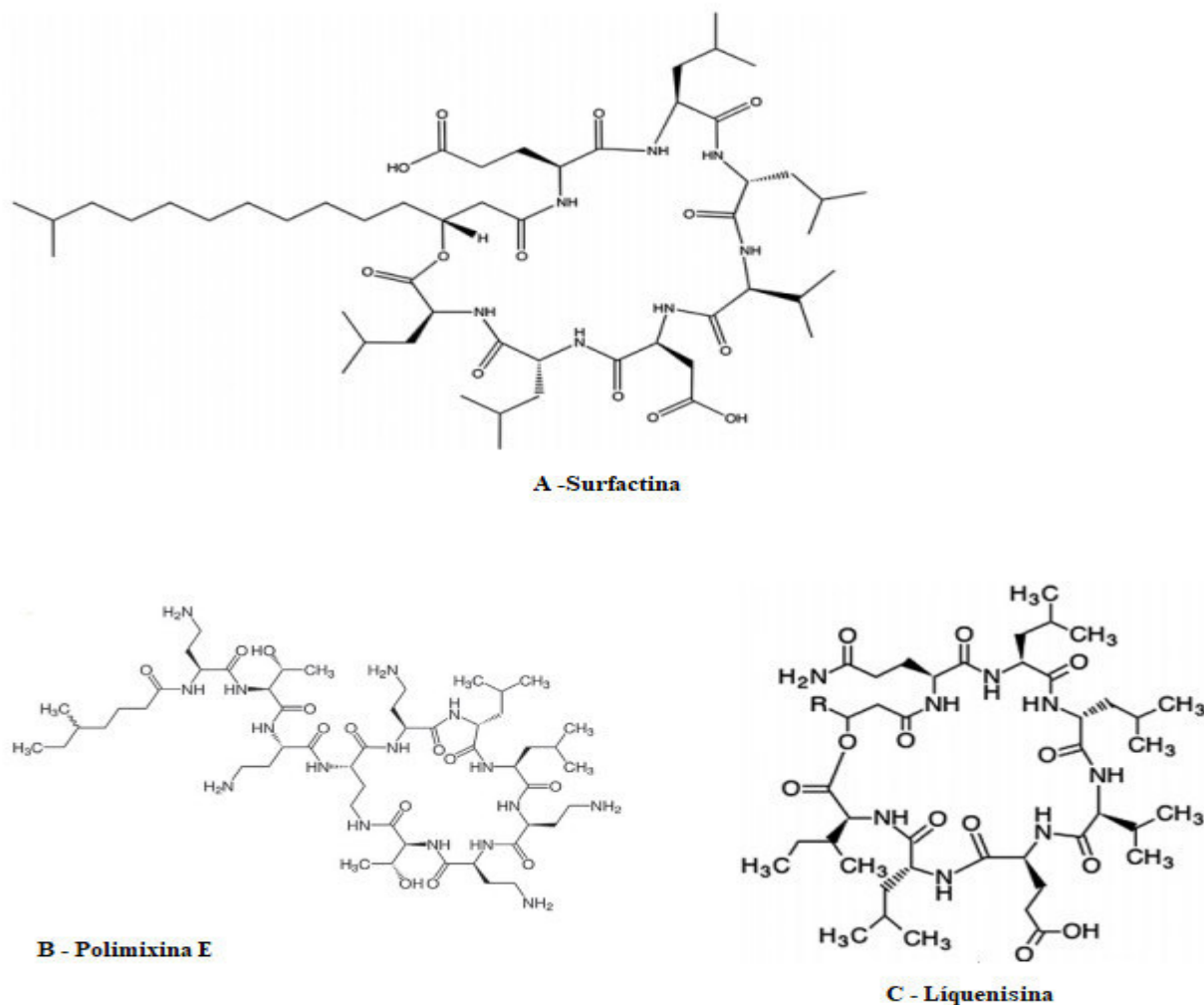


Figura 7 – Estruturas químicas dos compostos: A– surfactina; B – polimixina E e C – líquenissina

Os biossurfactantes do tipo ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros são produzidos por diferentes bactérias e leveduras como *Capnocytophaga sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Corynebacterium lepus* entre outros. Estes microrganismos produzem grandes quantidades de ácidos graxos e surfactantes fosfolipídicos durante o crescimento em n-alcenos (Santos et al., 2016). Esses biossurfactantes podem ser essenciais para aplicações médicas no tratamento de deficiência pulmonar que atinge bebês prematuros (Gautam e Tyagi, 2006) e no transporte como

carreadores de drogas para diversos tratamentos pulmonares (Hidalgo et al., 2015; Hidalgo e Cruz, 2017) e gastrointestinais (Sharma et al., 2014) e outros.

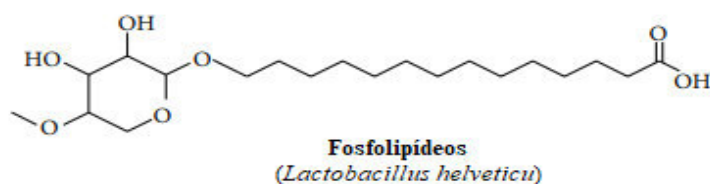


Figura 8 – Estrutura química predita do fosfolipídio gerado pela *Lactobacillus heveticu*

Surfactantes microbianos poliméricos são tensoativos de alto peso molecular que exibem cadeias de carboidratos e/ou proteínas podendo conter uma fração lipídica. Sua característica mais destacada é a alta viscosidade e atividade emulsificante (Sajna et al., 2015; Arpita Roy, 2017; Marcelino et al., 2019). Entre os compostos mais conhecidos dessa classe de biossurfactantes estão o emulsan (produzido principalmente por *Acinetobacter calcoaceticus*) (Figura 9) e o liposan (*Candida lipolytica* ou *Yarrowia lipolytica*) (Sajna et al., 2015); além de outros como biodispersan, alasan e lipomanan (Marcelino, 2016; Arpita Roy, 2017). Além disso, tem sido identificado um biossurfactante polimérico exopolissacarídeo (EPS) ácido denominado microsán (produzido por *Microbacterium sp.*) e um EPS neutro, denominado brevisan (produzido por *Brevibacillus cillus sp.*) que exibiram atividades antibacterianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Kumar e Pombala, 2018).

Os biossurfactantes particulados são formados por vesículas de membrana extracelular, formam microemulsão e desempenham um papel importante na captação de alcano pelas células microbianas (Arpita Roy, 2017; Bhattacharya et al., 2017). Os mais conhecidos destes compostos são vesículas e fímbria produzidos por *Acinetobacter calcoaceticus* (Taylor et al., 2009; Pirog et al., 2012).

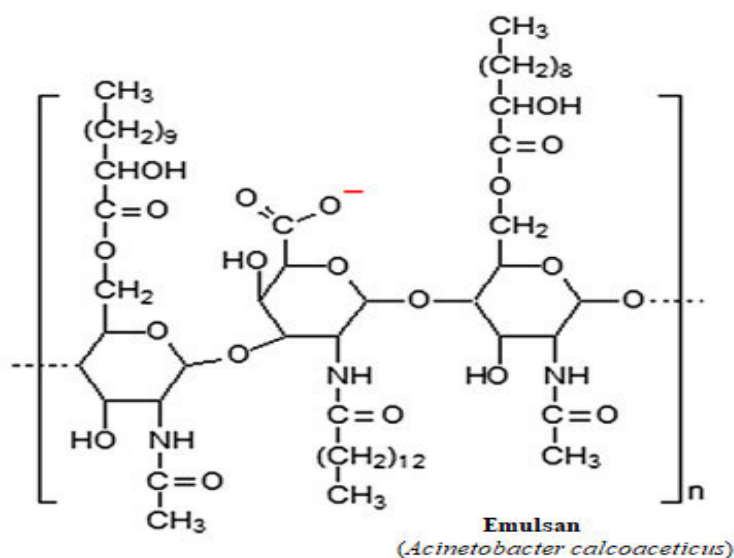


Figura 9 – Estrutura química do emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*

2.2.2 Produção de biossurfactantes

Grande parte dos trabalhos tem mostrado que a produção de biossurfactantes é realizada principalmente por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (Chebbi et al., 2017; Giri et al., 2019). Entretanto, por serem em sua grande maioria oportunistas e patogênicos, estes microrganismos têm sua utilização limitada, não sendo adequados em processos nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (Campos et al., 2013). Na busca de outros organismos que produzem biossurfactantes, algumas espécies de leveduras vêm sendo utilizadas cada vez mais para a produção desses metabólitos (Journal, 2012; Chaprão et al., 2015; Marcelino et al., 2017). A utilização de leveduras tem como vantagem o status GRAS (*Generally Regarded As Safe*) de várias espécies, ou seja, não apresentam risco de induzir toxicidade e reações patogênicas em sua grande maioria (Campos et al., 2013). A Tabela 1 mostra algumas leveduras utilizadas na produção de biossurfactantes.

Tabela 1 – Tipos de biossurfactantes produzidos por leveduras de acordo com a classificação

Biossurfactantes	Microrganismo	Referência
Glicolipídios	<i>Candida bombicola</i>	(Solaiman et al., 2004)
Glicolipídios	<i>Candida bombicola</i>	(Saerens et al., 2013)
Glicolipídios	<i>Candida bogoriensis</i>	(Kitamoto et al., 2001)
Glicolipídios	<i>Candida sphaerica UCP0995</i>	(Sobrinho et al., 2008)
Glicolipídios	<i>Candida glabrata</i>	(Andrade et al., 2015)
Glicolipídios	<i>Candida ishiwadae</i>	(Thanomsub et al., 2004)
Glicolipídios	<i>Candida batistae</i>	(Konishi et al., 2008)
Glicolipídios	<i>Pseudozyma fusiformata</i>	(Morita et al., 2007)
Glicolipídios	<i>kerhamomyces anomalus CCMA 0358</i>	(Souza et al., 2017)
Glicolipídios	<i>Aureobasidium pullulans</i>	(Kurosawa et al., 1994)
Soforolipídeo	<i>Pseudozyma aphidis</i>	(Rau et al., 2005)
Soforolipídeo	<i>Candida bombicola</i>	(Casas, 1999)
Soforolipídeo	<i>Candida bombicola</i>	(Cavalero e Cooper, 2003)
Soforolipídeo	<i>Torulopsis petrophilum</i>	(Cameron et al., 1988)
Soforolipídeo	<i>Candida (Torulopsis) apicola</i>	(Hommel et al., 1994)
Soforolipídeo	<i>Candida bogoriensis</i>	(Tulloch e Spencer, 1968)
Soforolipídeo	<i>Candida antarctica</i>	(Kim et al., 2002)
Soforolipídeo	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	(Imura e Kitamoto, 2007)
Soforolipídeo	<i>Candida sp. SY16</i>	(Kim et al., 2006)
Soforolipídeo	<i>Kurtzmanomyces sp.</i>	(Kakugawa, 2014)
(CCPL)	<i>Candida lipolytica UCP0988</i>	(Sarubbo et al., 2007)
(CCPL)	<i>Candida lipolytica IA1055</i>	(Sarubbo et al., 2001)
(CCPL)	<i>Yarrowia lipolytica NCIM 3589</i>	(Zinjarde et al., 1997)
(CCPL)	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	(Singh e Desai, 1989)
(CCPL)	<i>Candida tropicalis</i>	(Singh e Desai, 1989)
(CCPL)	<i>Candida ingens</i>	(Amézcua-Vega et al., 2007)
(CCPL)	<i>Candida utilis</i>	(Shepherd et al., 1995)
(CCPL)	<i>Candida valida</i>	(Shepherd et al., 1995)
(CCPL)	<i>Candida boleticota</i>	(Moussa et al., 2014)
(CP)	<i>Candida lipolytica ATCC8662</i>	(Cirigliano e Carman, 1985)
(CP)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Bahia et al., 2018)
(CP)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	(Lukondeh et al., 2003)
(CP)	<i>Candida utilis</i>	(Shepherd et al., 1995)
(CP)	<i>Candida ingens</i>	(Amézcua-Vega et al., 2007)
(CP)	<i>Rhodotorula glutinis</i>	(Yoon e Rhee, 1983)
Lipopeptídeos	<i>Candida glabrata</i>	(Imura e Kitamoto, 2007)

CCPL: Complexo Carboidrato-Proteína-Lipídio; CP*: Carboidrato-Proteína

Entre as leveduras produtoras de biossurfactantes está a *Aureobasidium pullulans*, que pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideamycetes, subclasse Dothideomycetidae (Hibbett et al., 2007). A produção de biossurfactante por *A. pullulans* foi primeiramente relatada Kurosawa et al. (1994) onde obtiveram compostos chamados de “heavy oils”, sugerindo que seriam compostos por: 3,5-dihydroxidecanoil e 5-hidroxi-2-decenoil ésteres de arabitol e manitol, e posteriormente estes biossurfactantes foram classificados como polióis lipídicos (Kurosawa et al., 1994).

Obtido o status GRAS em 2010 pela *U.S. Food and Drug Administration*, *A. pullulans* foi também considerada segura para aplicações biotecnológicas e ambientais (Chan et al., 2011). Suas cepas são organismos únicos que produzem uma ampla gama de produtos naturais extensivamente estudados com relação às várias aplicações versáteis em biotecnologia (Prasongsuk et al., 2018). Um estudo feito em 2011 analisou mais de 50 espécies diferentes de *Aureobasidium* que foram colocados em meio contendo sacarose como fonte de carbono para analisar os produtos por eles gerados. Neste estudo, vinte e uma destas cepas produziram “heavy oils” extracelulares que tinham como característica óleos de superfície ativa, indicando seu possível uso como biossurfactante (Manitchotpisit et al., 2011).

Posteriormente, outros estudos têm corroborado que a produção de biossurfactante pela levedura *Aureobasidium pullulans* representa uma alternativa viável (Manitchotpisit et al., 2011; Kim et al., 2016; Palareti et al., 2016; Brumano, 2017). No Brasil, os estudos feitos sobre produção de biossurfactante com a levedura *A. pullulans* LB83 foram realizados unicamente em nossos Laboratórios de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis, localizado na Escola de Engenharia de Lorena pela Universidade São Paulo (USP). Foram avaliadas a produção de biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* em biorreator de tanque agitado (Brumano, 2017) e por fermentação em estado sólido a partir do bagaço da cana-de-açúcar (Brumano, 2017; Carneiro, 2019).

Quando comparados aos surfactantes produzidos sinteticamente, os biossurfactantes possuem baixo rendimento de produção e custos elevados, necessitando reforçar os estudos que alicercem outras formas de produção para aumentar os rendimentos e reduzir os custos. Por isso, a pesquisa de novos microrganismos produtores, matérias-primas de baixo custo e novos processos de produção são alternativas que devem ser priorizadas à consolidação destes bioprodutos no mercado (Brumano, 2017).

2.2.3 Subprodutos agroindustriais na produção de biossurfactantes

Uma das possíveis formas para reduzir custos de produção de biossurfactantes é a utilização de subprodutos agroindustriais como matérias-primas para os bioprocessos (Al-Bahry et al., 2013). Subprodutos agroindustriais são materiais sólidos ou líquidos gerados a partir do consumo direto de produtos primários ou de sua industrialização, e que não são mais úteis ao processo onde foram gerados (Saval, 2012). Atualmente, é crescente o número de pesquisas que utilizam subprodutos agroindustriais na produção dos biossurfactantes. Estes subprodutos são visados como forma de reutilizar a biomassa descartada, evitando danos ao meio ambiente além de reduzir os custos do processo produtivo, já que a fonte de carbono pode ser responsável por até 30 % do valor do produto final (Silva et al., 2011)

A produção de biossurfactante utilizando substratos mais baratos apresenta algumas vantagens como: a redução dos custos comercial; o uso de substratos renováveis e baratos disponíveis em grandes quantidades; a melhora do rendimento de biossurfactante / bioemulsificante; não é prejudicial aos produtores; os componentes utilizados são ecologicamente corretos e seguros (Costa et al., 2018).

A utilização das biomassas provenientes dos subprodutos agrícolas ou agroindustriais como matéria-prima para a produção de combustíveis e produtos de base biológica vêm se destacando ao longo dos anos, reforçando o modelo de biorrefinarias (Brumano, 2017; Marcelino et al., 2019). A biomassa lignocelulósica é rica em carboidratos, como a celulose e a hemicelulose, e seus hidrolisados ácidos ou enzimáticos são ricos em açúcares fermentáveis (glicose, xilose e arabinose) que podem ser usados como substratos nos processos de fermentação, facilitando assim a metabolização pelos microrganismos para obtenção dos bioprodutos como biossurfactantes (Marcelino et al., 2019). A Tabela 2 mostra a produção de biossurfactantes a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais por diferentes microrganismos.

Tabela 2 – Utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para produção de biossurfactante por diferentes microrganismos.

Fonte de carbono (resíduos e subprodutos)	Microrganismos	Referência
Óleo de soja queimado	<i>Candida ishwadae</i>	(Thanomsub et al., 2004)
Água residual da mandioca	<i>Bacillus subtilis</i> LB85	(Nitschke e Pastore, 2006)
Óleo e <i>cake</i> de amendoim e óleo de motor residual	<i>Bacillus megaterium</i>	(Thavasi et al., 2008)
n-hexadecano, óleo de soja, resíduo do refino de óleo de amendoim e milhocina	<i>Candida sp.</i>	(Coimbra et al., 2009)
Casca e farelo de arroz, óleo de soja, óleo diesel	<i>Aspergillus fumigatus</i>	(Castiglioni et al., 2009)
Gordura vegetal residual	<i>Candida glabrata</i>	(Gusmão et al., 2010)
Glicerol residual da indústria de biodiesel	<i>Ustilago maydis</i>	(Liu et al., 2011)
Bagaço de cana-de-açúcar, Glicerol residual, farelo de milho e óleo de girassol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 64	(Camílios-Neto et al., 2011)
Hidrolisado hemicelulósico de resíduo de vinhedo	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(Vecino et al., 2015)
Óleo de soja residual	<i>Starmerella bombicota</i> (ATCC 22214)	(Maddikeri et al., 2015)
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Aureobasidium pullulans</i> LB83	(Brumano et al., 2017)
cascas de frutos de <i>Bactris</i> <i>gasipaes</i> (Kunth)	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Sanchez et al., 2018)
resíduos de cervejaria	<i>Bacillus subtilis</i> N3-1P	(Moshtagh et al., 2019)
Resíduo de soja (Okara)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	(Hu et al., 2019)
casca de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar	<i>Fusarium oxysporum</i> E	(Ezeonu e Siman, 2020)
pó de talos de banana	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i>	(Asgher et al., 2020)

O bagaço da cana-de-açúcar, principal subproduto da indústria sucroalcooleira brasileira, que com a ascensão do conceito de biorrefinarias lignocelulósicas, vem sendo utilizado como matéria-prima para a obtenção de diversos bioprodutos (Jain et al., 2013; Marcelino et al., 2017; Brumano, 2017; Terán Hilaes et al., 2017, 2018; Carneiro, 2019). Por se tratar de uma fonte de material lignocelulósico abundante no Brasil, o bagaço da cana-de-açúcar torna-se uma alternativa economicamente viável para ser utilizado como substrato em processos

biotecnológicos para geração de produtos como os biossurfactantes (Brumano, 2017).

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* apresenta uma estrutura com considerável teor de lignina. No entanto, a lignina age como limitadora no processo de hidrólise enzimática das frações de carboidratos da parede celular, particularmente da celulose, porque a sua associação na parede celular protege as cadeias de celulose e hemicelulose dos ataques das celulases, coibindo as hidrólises destes compostos (Andrade et al., 2015). Desse modo, o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar torna-se essencial pois diminui a quantidade de lignina, tornando mais acessível a degradação de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis (Canilha et al., 2012).

Existem diversas metodologias de pré-tratamento utilizadas na literatura que podem ser divididas, basicamente, em processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. A Tabela 3 apresenta uma síntese das principais metodologias utilizadas de pré-tratamento:

Tabela 3 – Sínteses das principais metodologias de pré-tratamento

Tipo de pré-tratamento	Técnica
Físico	Moagem e trituração; Ultrassonicação Moagem centrífuga Extrusão Cavitação Hidrodinâmica
Químico	Pré-tratamento com ácido diluído; Pré-tratamento com mistura ácido-acetona; Pré-tratamento com líquido iônico; Pré-tratamento alcalino com permanganato de potássio; Organossolve; Cloretos metálicos.
Físico-químico	Explosão a Vapor; Pré-tratamento <i>hot water</i> ; Oxidação úmida; Explosão com gás carbônico supercrítico; Radicais hidroxila integrados e pré-tratamento com água quente (IHRW); Plasma;
Biológico	Expansão de fibra de amônia (AFEX). Consórcio microbiano; Pré-tratamento com espécies fúngicas Pré-tratamento enzimático

Dentre as metodologias de pré-tratamento estudadas, a cavitação hidrodinâmica é uma técnica promissora que vem sendo empregada no tratamento do material lignocelulósico (Terán Hilares et al., 2017). Trabalhos realizados com serragem (Baxi e Pandit, 2012), caniço (Kim et al., 2015), palha de milho (Nakashima et al., 2016), bagaço de cana-de-açúcar (Terán Hilares et al., 2016) e outros demonstram que a cavitação hidrodinâmica emerge como uma opção considerável a pré-tratamentos de biomassa lignocelulósicas na literatura.

2.3 Cavitação Hidrodinâmica

A cavitação hidrodinâmica é um processo caracterizado pela formação, crescimento e colapso de bolhas ou cavidades, em meio líquido, devido a variações na pressão estática local, utilizando a geometria de um sistema como placas de orifício ou venturi (Figura 10.A). Quando a pressão do sistema retorna ao normal (pressão ambiente), essas bolhas colapsam, gerando pressão e temperatura intensas no ponto de colapso (Figura 10.B). A onda de choque resultante do colapso das bolhas pode liberar grandes quantidades de energia, acelerando reações químicas e físicas (Abdala Neto et al., 2014; Pandit, 2016).

A cavitação hidrodinâmica geralmente acontece de forma indesejável em sistemas de bombas, injetores e outras maquinarias hidráulicas, gerando ruídos e energia perdida ao longo do processo (Gugulothu et al., 2012). Contudo, essa energia vem sendo estudada e utilizada para vários tipos de aplicações, incluindo o uso em reatores (Badve et al., 2014).

2.3.1 Parâmetros relacionados a cavitação hidrodinâmica

A pressão é um parâmetro em estudos da cavitação hidrodinâmica pela facilidade de controle. A pressão mínima para geração de cavidades é importante no processo, atuando como força motriz durante a formação de bolhas, afetando tanto a quantidade quanto o tamanho máximo atingido pelas bolhas e pode ser mensurado, segundo Arrojo e Benito, (2008) como:

$$P_{\min} = P_{\text{in}} - \frac{1}{2} \rho (v_{\max}^2 - v_{\text{in}}^2) - k \quad (\text{Equação 1})$$

Onde a pressão mínima (P_{\min}) atingida pode ser calculada usando, ρ a densidade do líquido, P_{in} representa a pressão de entrada, V_{\max} a velocidade máxima do líquido atingida na câmara de cavitação, V_{in} a velocidade do líquido de entrada e k as perdas de pressão ao longo da câmara de cavitação.

Outro importante fator a ser considerado na formação de cavidades na cavitação

hidrodinâmica é conhecido por número de cavitação (C_v), sendo este um parâmetro adimensional. Este número de cavitação é definido por (Saharan et al., 2012), para caracterizar a condição de cavitação no interior de reatores hidráulicos, como:

$$C_v = \left(\frac{P_2 - P_v}{\frac{1}{2} \rho V_0^2} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde P_2 é a pressão de descarga, P_v a pressão de vapor do líquido, ρ é a densidade da solução e V_0 é a velocidade do fluido através do diâmetro do venturi ou orifício.

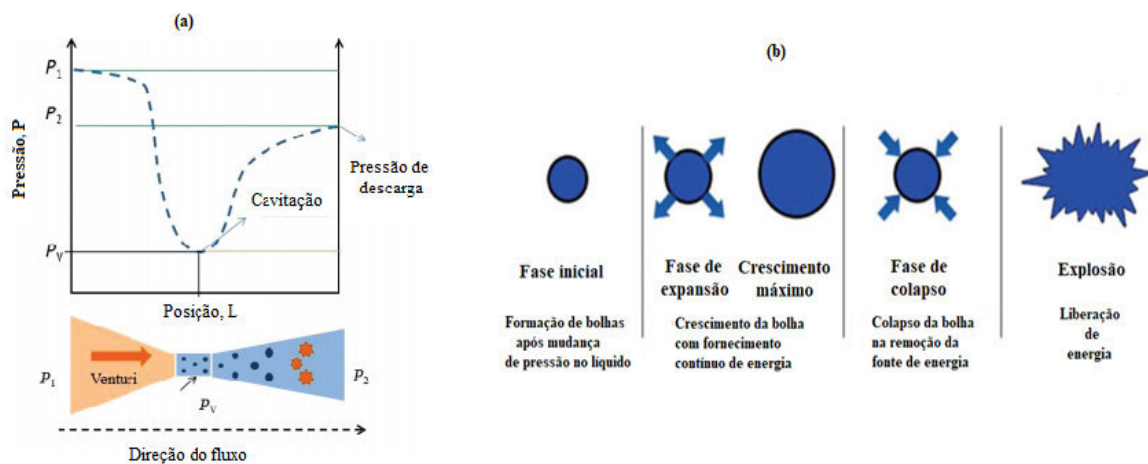


Figura 10 – (A) Variação da pressão e condições de fluxo no dispositivo de cavitação (venturi); (B) Processo de formação até explosão de bolhas na cavitação hidrodinâmica.

(Gogate, 2011) fez uma correlação empírica que pode ser usada para prever a pressão de implosão gerada pelo colapso da bolha descrito como:

$$P_{\text{colapso}} = 7527 (F)^{-2.55} \times \{(P_1)^{2.46} (R_0)^{-0.80} (D_0)^{2.37}\} \quad (\text{Equação 3})$$

onde R_0 é tamanho inicial da cavidade em unidades em (mm), P_1 é a pressão de entrada em unidades de atmosferas (bar), D_0 o diâmetro do orifício na placa de orifício em unidades (mm) e F a porcentagem da área transversal livre dos buracos no tubo. A pressão de colapso (P_{colapso}) correlaciona-se intimamente com o rendimento cavitacional, que pode ser relacionado como o número de moléculas degradadas por unidade de energia dissipada, segundo Bashir et al., (2011) como:

$$\text{Rendimento cavitacional} = 8.834 \times 10^{-11} (P_{\text{colapso}})^{-1.1633} \quad (\text{Equação 4})$$

O resultado do rendimento cavitacional é usado para otimizar o *design* dos cativadores hidrodinâmicos assim como planejamentos de aplicações personalizadas de transformações dos efeitos físico-químicos da cavitação (Bashir et al., 2011).

Nos reatores, a cavitação hidrodinâmica é gerada após a constrição em um fluxo do líquido, gerado por um rotor de alta velocidade, que pode ser regulada por venturi ou orifícios dispostos no reator (Figura 11). Os reatores de cavitação hidrodinâmica baseados em orifícios e venturi são os mais eficientes na criação de uma condição de cavitação intensa devido ao seu *design* e, por isso, a cavitação em um venturi é praticamente estável devido à sua configuração geométrica (Gogate, Kabadi, 2009). Os venturis e orifícios podem possuir diferentes parâmetros geométricos ocasionando uma influência direta nos rendimentos e efeitos cavitacionais.

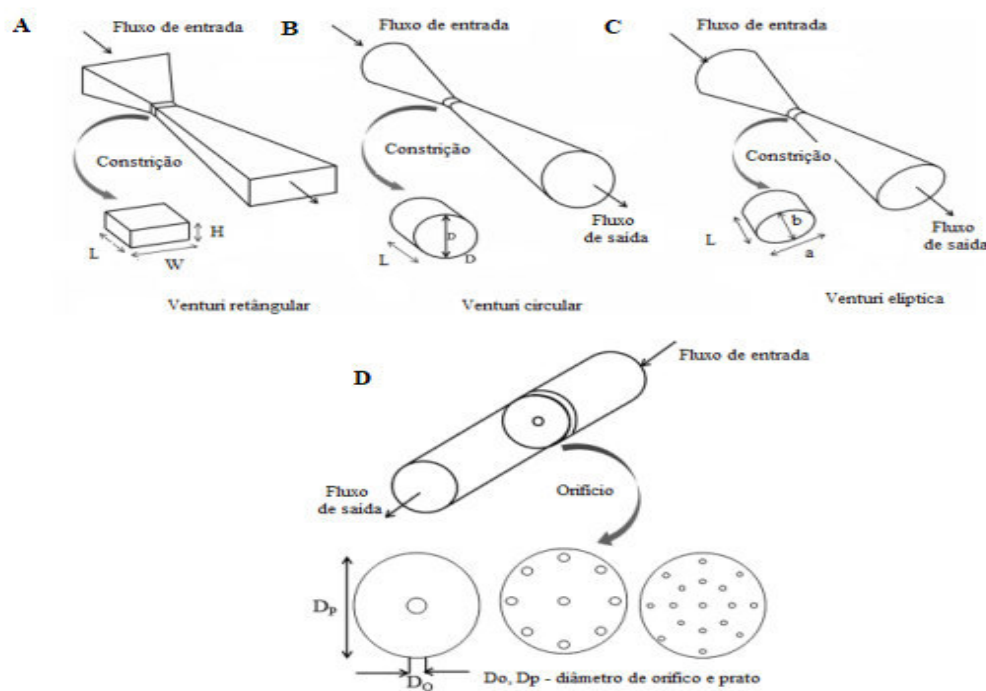


Figura 11 – Tipos de venturi: (A) retangular, (B) circular, (C) Elíptica e (D) Configuração de dispositivo de cavitação de orifício único e múltiplo

2.3.2 Efeitos associados a cavitação hidrodinâmica

Os efeitos da cavitação estão relacionados com as mudanças conformacionais da cavidade, desde o surgimento até sua explosão (Gomes, 2015) (Figura 12), e podem ser térmicos, químicos, mecânicos ou físicos. Quando a cavidade formada explode, regiões de “*hot spot*” são criadas possuindo temperaturas que podem variar entre 1000 - 10.000 K e

pressão em uma faixa entre 100-1000 bar (Gogate, 2011).

Existem duas condições de colapso de cavidades segundo Mahulkar, Pandit, (2010): a de cavidade não simétrica, que surge devido a alguma barreira na interface e/ou partícula bolha próximo a cavidade formante e a cavidade simétrica, que surge e permanece esférica até sua explosão. Ambos os colapsos (simétricos e assimétricos) são energias fornecidas de forma diferentes provenientes da energia das flutuações de pressão geradas dentro do cavitador. Essa energia se manifesta como forma de turbulência intensa e/ou na forma de condições extremas de temperatura e pressão.

O fluxo de microjatos e a alta intensidade de turbulência local são relacionados aos colapsos de cavidade não simétricas, que resultam principalmente em efeitos mecânico ou físico da cavitação hidrodinâmica. Em sistemas líquido-líquido, o colapso de cavidades não simétricas cria uma mistura em microníveis que eleva a taxa de transferência de massa e, por consequência, na redução da tensão interfacial entre fases imiscíveis, melhorando a mistura. Nos sistemas de líquido-sólido, o colapso assimétrico da cavidade na superfície do sólido pode quebrar e limpar a superfície do material devido à formação de jato líquido, aumenta a degradabilidade catalítica do material após o tratamento (Janusz Ozonok, 2012; Carpenter et al., 2017). Estes efeitos são responsáveis na intensidade do processo físico pelo número de cavitação (C_v) no tratamento de águas entre 0,1 – 0,3 (Doltade et al., 2019; Joshi e Gogate, 2019) de diferentes poluentes, na formação de nanopartículas (Liu et al., 2019), entre 0,16 – 0,23 na síntese de emulsão (Ramisetty et al., 2014), entre 0,04 – 1,57 para desinfecção e ruptura microbiana (Šarc et al., 2018; Salve et al., 2019).

Do mesmo modo, a geração de radicais livres altamente reativos intensifica as reações químicas na cavitação hidrodinâmica e estão associados ao colapso de cavidades simétricas. Alguns radicais como $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{HOO}$ e $\cdot\text{H}$ são gerados pela dissociação das moléculas de água dentro das bolhas através das drásticas condições do processo resultando na síntese de produtos químicos, degradação dos poluentes da água entre outros (Terán Hilares et al., 2017). Um simples e importante exemplo é a formação do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) pela dissociação da molécula de água nas condições de cavitação. Este radical é altamente reativo, pode oxidar grandes moléculas orgânicas e é um excelente iniciador de reações em cadeias (Ozonok, 2012; Saharan et al., 2013). O colapso das cavidades simétricas auxilia principalmente nas reações de oxidação pois envolvem alterações químicas no processo. Essas mudanças químicas, podem ser de duas maneiras, segundo (Saharan et al., 2013): (1) as moléculas dentro do interior da cavidade sofrem decomposição térmica durante a explosão, gerando assim os radicais e (2) as moléculas alvos sofrem modificações devido aos radicais livres gerados após explosão, oxidando

assim as moléculas alvos ao longo do processo.

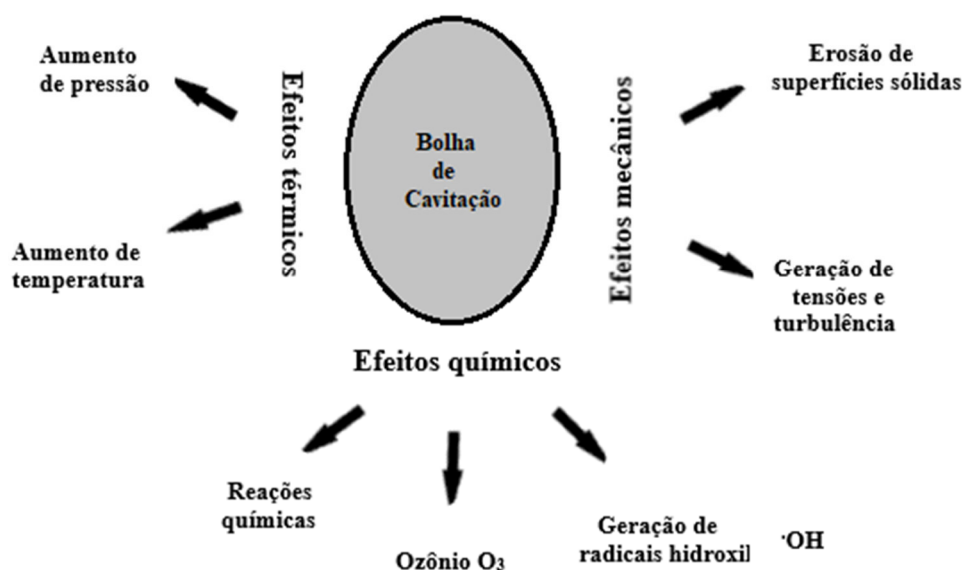


Figura 12 – Apresentação dos principais efeitos da cavitação hidrodinâmica

As propriedades físico-químicas dependem então, principalmente, do fluxo de entrada da pressão e da geometria do dispositivo de cavitação. Estes fatores estão intimamente associados ao número de cavitação mais baixo ($C_v < 1$) para grande maioria dos processos na transformação física e química utilizando a cavitação hidrodinâmica.

2.3.3 Cavitação hidrodinâmica para pré-tratamento de biomassa

Quando exposta ao processo de cavitação hidrodinâmica, a biomassa lignocelulósica sofre principalmente com efeitos mecânicos provenientes dos “*hot spot*”, microjatos de alta velocidade e das ondas de choque resultantes dos colapsos das bolhas produzidas durante o tratamento. Tais efeitos, com o tempo, ocasionam a degradação de moléculas orgânicas, como a lignina, resultando em microperfurações na superfície do material, gerando assim uma maior acessibilidade das enzimas para degradar as frações celulósica e hemicelulósica (Badve et al., 2014; Terán Hilares et al., 2016), como demonstrados na figura 13.

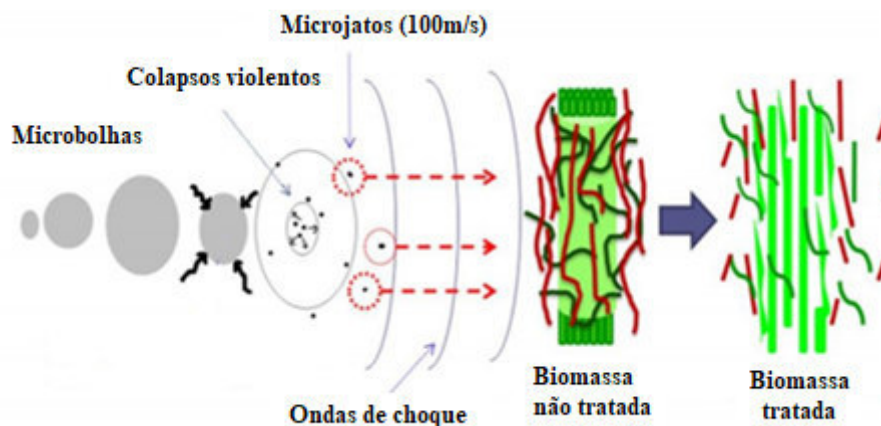


Figura 13 – Simulação dos efeitos da cavitação hidrodinâmica na biomassa

A utilização da cavitação hidrodinâmica para deslignificação é empregada em diversas biomassas lignocelulósicas devido às suas vantagens. Estas vantagens incluem a pouca/não formação de furanos, uma maior degradação de lignina utilizando cavitação hidrodinâmica do que em biomassas pré-tratadas com ácidos diluídos (Nakashima et al., 2016), menor necessidade de energia e operação em condições ambientais (Thangavelu et al., 2018). Comparando com as abordagens convencionais e baseadas em ultrassom, a cavitação hidrodinâmica destaca-se em termos de menor tempo de processamento, maior eficiência energética e viabilidade para operação em maior escala (Gole et al., 2013).

No desenvolvimento de novos pré-tratamentos para deslignificação da biomassa, o uso da cavitação hidrodinâmica vem sendo utilizado de forma simultânea com solução alcalina (CH-SA) para melhorar a liberação de celulose e hemicelulose. Alguns pesquisadores demonstram resultados promissores no uso das técnicas da cavitação hidrodinâmica associado a soluções alcalinas combinadas no tratamento de biomassas como no bagaço de cana-de-açúcar (Terán Hilares et al., 2016, 2017), palha de trigo (Badve et al., 2014), caniço (Kim et al., 2015) e palha de milho (Nakashima et al., 2016). A Tabela 4 demonstra os resultados na literatura.

Tabela 4 – Síntese da utilização de solução alcalina e cavitação hidrodinâmica no tratamento de biomassa descritas na literatura

Biomassa	Caníço	Palha de trigo	Palha de milho	BCA	BCA	BCA
Concentração	3 % (m/V) NaOH	0,3 M de KOH	0,4 mol/L de Na ₂ CO ₃ e 0,6 mol/L de H ₂ O ₂	0,3 mol/L NaOH	0,48 mol/L NaOH	Ca(OH) ₂ (0,1g/g biomassa seca)
Taxa Sólido Líquido	10 %	5 – 7 %	4 %	-	4,24 %	1 %
Tempo	40 min	15 min	60 min	30 min	44,4min	120 min
Pressão	0,5mPa pressão de entrada	4,5 x 10 ⁵ Pa pressão de entrada	-	0,3 mPa de pressão de entrada	0,3 mPa de pressão de entrada	0,37mPa de pressão de entrada
Dispositivo	Orifício de buracos (27) 1 mm de diâmetro	Estator e rotor	Venturi (40 mm de largura, diâmetro interno de 3,6 mm e diâmetro de garganta de 1,8mm).	Orifício de buracos (16) 1 mm de diâmetro	Orifício de buracos (27) 1 mm de diâmetro	Venturi 0,572cm de diâmetro de garganta aberto 15 %
Resposta	Remoção de 35 – 42 % de lignina	Houve um aumento de 50 – 55 % das propriedades de tração da folha, o que sugere, segundo o autor, uma maior deslignificação.	Observou-se redução de lignina verificada pela análise FTIR pela redução da banda 1745cm ⁻¹ e 1606cm ⁻¹ , associado s a cadeia e anel aromático da lignina	51,52 % de remoção de lignina	60,4 % de remoção de lignina	Foram observadas mudanças na composição utilizando metodologia de índice de cristalinidade
Referência	(Kim et al., 2015)	(Badve et al., 2014)	(Nakashima et al., 2016)	(Terán Hilaes et al., 2017)	(Terán Hilaes et al., 2016)	(Madison et al., 2017)

BCA: Bagaço de cana-de-açúcar

Quando associados, a cavitação hidrodinâmica junto às soluções alcalinas no pré-tratamento de biomassa provoca mais reações resultantes pelo aumento na energia cinética das moléculas devido aos colapsos de cavidades, que naturalmente já formam radicais $\cdot\text{OH}$. Há, também, a formação de um ambiente de pH alcalino que favorece as formações de radicais como $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{HOO}$ e H_2O_2 pela dissociação das soluções no meio líquido (Badve et al., 2014). Estes radicais reagem prontamente com componentes fenólicos da lignina, resultando em degradação de compostos de baixa massa molecular e na despolimerização da lignina (Selig et al., 2009; Raut-Jadhav et al., 2015;), como demonstrados na figura 14 abaixo:

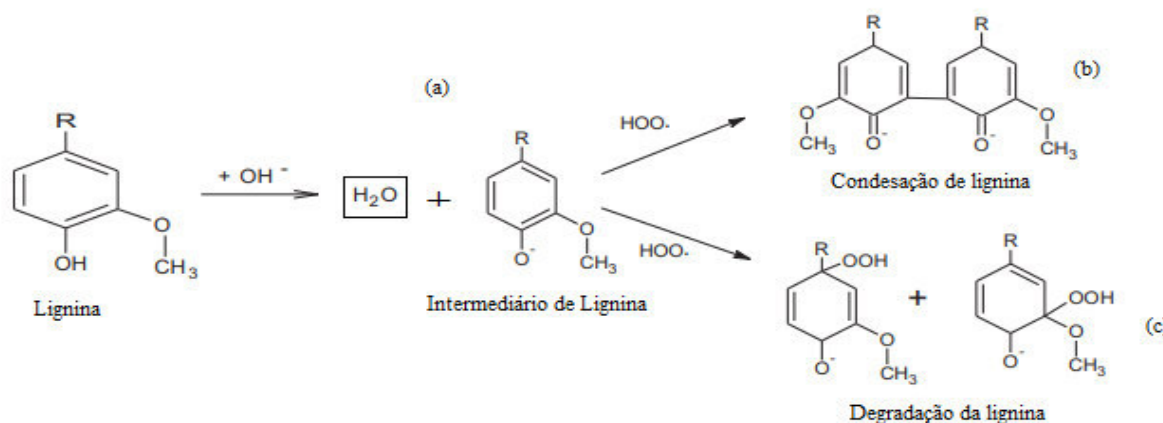


Figura 14 – (a) Intermediário de lignina formado após a reação da lignina com radical $\cdot\text{OH}$; após isso, interações com $\cdot\text{HOO}$ podem gerar em em (b) condensação da lignina e em (c) degradação da lignina

Para demonstrar que há vantagens em associar as técnicas de cavitação à solução alcalina, Terán Hilaes et al., (2016) compararam os resultados da caracterização do bagaço de cana-de-açúcar tratado com solução alcalina e com a solução alcalina associada a cavitação hidrodinâmica (CH-SA) e obtiveram como resultados remoção de lignina de $50,3 \pm 1,34$ e $60,4 \pm 2,43$, respectivamente. Também foram comparados a associação da solução alcalina com ultrassonicação e solução alcalina com a cavitação hidrodinâmica, demonstrando resultados melhores de deslignificação no tratamento CH-SA (Kim et al., 2015). Outra vantagem na associação das técnicas CH-SA é a melhora quanto à digestibilidade enzimática para formação de produtos por fermentação (Kim et al., 2015; Nakashima et al., 2016; Madison et al., 2017) .

Finalizado o pré-tratamento, a biomassa tratada pode ser usada como substrato na produção de biossurfactante. O tipo de microrganismo, assim como a técnica escolhida para a fermentação devem ser compatíveis para aquilo que se deseja; uma das técnicas de fermentação utilizadas na produção de biossurfactantes é a fermentação em estado sólido (FES).

2.4 Fermentação em estado sólido

2.4.1 Características Gerais

A fermentação em estado sólido (FES) tem sido descrita como um processo que ocorre em um substrato de matriz com baixo teor de água livre (Singhania et al., 2017) contendo no substrato umidade mínima necessária para crescimento e a atividade metabólica do microrganismo (Chen e Wang, 2017). A FES voltou a ser estudada devido às vantagens biotecnológicas apresentadas pela técnica como elevada capacidade de fermentação, menor repressão catabólica e tecnologia de baixo custo (Costa et al., 2017). Por ser uma técnica de difícil sucesso no passado, este tipo de fermentação foi menos explorado por muitos anos, principalmente após o desenvolvimento da penicilina, que alavancou a utilização da técnica de fermentação submersa (Costa et al., 2017; Soccol et al., 2017). Atualmente, a FES voltou a ser interesse de estudo por causa de sua ampla gama de aplicações na valorização de biomassa. Com problemas ambientais sendo gerados em todo o mundo e a busca de novos destinos a subprodutos agroindustriais, há o apelo e as buscas incessantes de pesquisas e aplicações no uso da técnica, promovendo benefícios ambientais e econômicos (Saval, 2012; Lizardi-Jiménez e Hernández-Martínez, 2017;).

O potencial da FES é fornecer ao microrganismo cultivado um ambiente o mais próximo possível do seu ambiente natural. Acredita-se que há um maior desempenho do microrganismos em FES quando comparados com a fermentação submersa realizada em um biorreator fechado, mesmo com condições ideais de atividade celular e crescimento (Chen e Wang, 2017). A FES, em comparação a fermentação submersa, apresenta algumas vantagens como menor demanda energética, reduzidos volumes de água e maior concentração do produto obtido e gera menos resíduos para serem tratados (Akpinar e Urek, 2012; Doriya et al., 2016). A FES também evita problemas que normalmente acontecem em fermentação submersa como produção de espuma e o aumento da viscosidade que afeta diretamente a transferência de oxigênio durante o cultivo (Krieger et al., 2010), além de requerer uma menor uso de energia do que a fermentação submersa (Soccol et al., 2017).

Como estratégia cada vez mais relevante no aproveitamento de biomassa/energia em processos, a FES mostra-se uma alternativa viável à expansão de rotas de conversão para produção de bioprodutos com valores agregados a partir de subprodutos industriais que poderiam ter, como destino a incineração, estoque/despejo ao ambiente ou adubo. Entre as opções, a aplicação da FES aos subprodutos agroindustriais como substrato possibilita a produção de

bioprodutos com alta especificidade e alto valor de mercado como enzimas (Rodrigues et al., 2020; Melnichuk et al., 2020) compostos fenólicos (Buenrostro-Figueroa et al., 2017; Camerini et al., 2019), biossurfactantes (Brumano, 2017; Carneiro, 2019), óleos derivados de fungos (Intasit et al., 2020) e outros, como demonstrados na Figura 15. Nesse contexto, as biorrefinarias têm sido cada vez mais almeçadas mundialmente por grandes empresas, principalmente as que produzem etanol, biodiesel, papel e celulose, processos bastante consolidados na indústria (Souza et al., 2015).

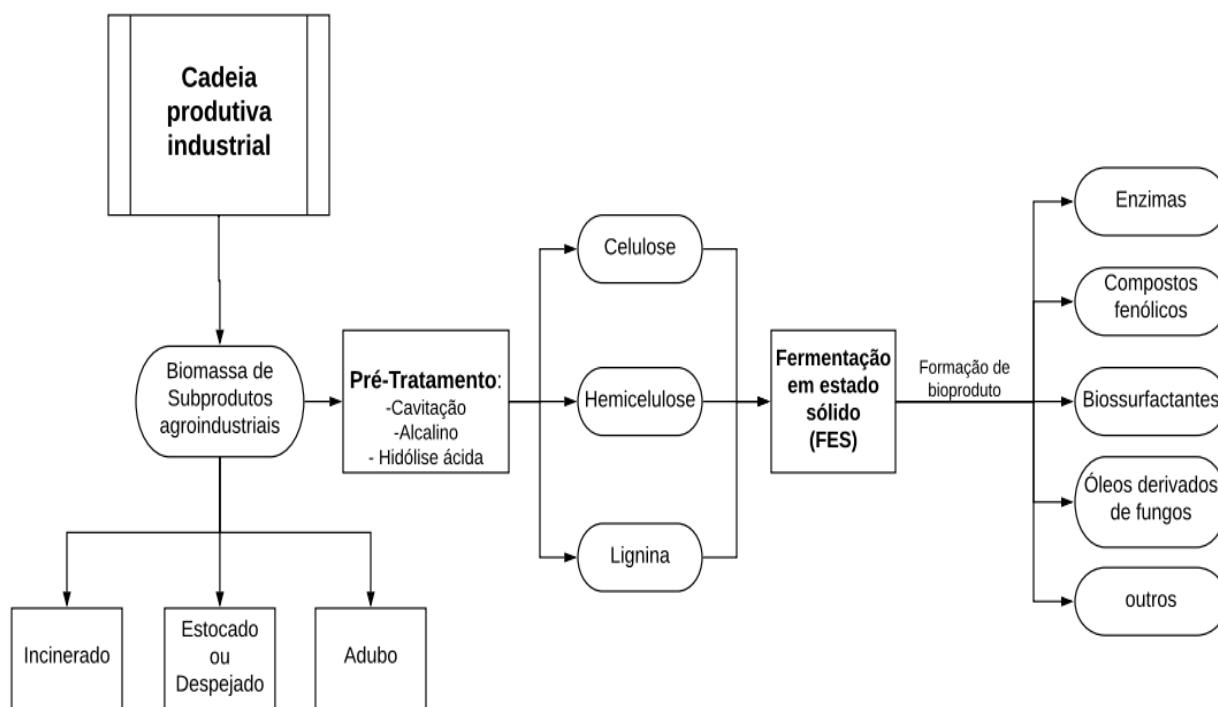


Figura 15 – Fluxograma demonstrando uma nova rota para conversão de subprodutos agroindustriais na produção de bioprodutos em FES para uma biorrefinaria.

A FES possui diversos parâmetros que influenciam o desenvolvimento do processo tais como escolha do substrato, parâmetros físico-químicos (como pH, granulometria, aeração entre outros), assim como a escolha do microrganismo. Fungos e leveduras são geralmente adequados para a FES por necessitarem de uma menor quantidade de água disponível (α_w entre 0,5 – 0,6) do que as bactérias (α_w aproximadamente entre 0,8 – 0,9) além do *status* GRAS, que conferem a estes microrganismos uma segura manipulação (Costa et al., 2017).

As relações hídricas em FES são um dos fatores importantes que necessitam ser bem avaliados. A atividade da água (α_w) do substrato tem influência determinante na atividade microbiana. A α_w do meio foi atribuída como um parâmetro fundamental para a transferência de massa da água e dos solutos, haja vista que o controle deste parâmetro pode ser usado para

modificar sua produção metabólica (Soccol et al., 2017). Outro fator pode ser umidade no fermentador: mantendo alta o que dificulta a aeração, já a falta de umidade dificulta o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, a formação de produtos.

A característica da matriz ou substrato sólido também está intimamente relacionada com os sistemas FES. Materiais naturais, como subprodutos agroindustriais, como por exemplo o bagaço de cana-de-açúcar, podem ser usados como matriz para processos em FES (Brumano, 2017; Carneiro, 2019). Outro fator importante é o tamanho das partículas, que têm influência no processo. Quando as partículas são muito pequenas há a possibilidade de compactação da matriz, acarretando em problemas de transferência de massa, calor, assim como a aeração; partículas de dimensões muito grandes dificultando a adesão e a disponibilidade do microrganismo aos nutrientes por ter uma superfície de contato do substrato reduzida (Brumano, 2017; Soccol et al., 2017).

A aeração também tem seu efeito determinado, visto que gás oxigênio (O_2) pode regular níveis de umidade e temperatura. Altas aerações podem reduzir umidade em FES assim como a falta de aeração pode acarretar na insuficiência de gás oxigênio ao microrganismo (Farinas, 2015). O efeito da temperatura durante o processo pode regular o crescimento do microrganismo. Na FES, o oxigênio é fornecido e trocado com dióxido de carbono e o calor é gerado por microrganismos, levando a um aumento de temperatura. Em alguns casos, altas temperaturas afetam negativamente o crescimento de microrganismos e a formação do produto (Costa et al., 2017); em outros, temperatura pode causar um efeito significativo na produção de biosurfactante (Nalini e Parthasarathi, 2014).

Apesar dessas vantagens, o FES também enfrenta algumas dificuldades para o aumento de escala como na utilização de substratos naturais ser limitada por sua baixa reprodutibilidade e heterogeneidade (Hongzhang et al., 2011; Singhania et al., 2017). A heterogeneidade do substrato relaciona-se à porosidade, que pode levar a problemas de transferência de massa e de calor em FES (Raghavarao et al., 2003; Brumano, 2017) assim como estimativa de biomassa a ser utilizada, recuperação do produto e controle operacional (Parthasarathi, 2014; Costa et al., 2017; Nalini e Soccol et al., 2017).

2.4.2 Fermentação em estado sólido para produção de biossurfactantes

Ao longo do tempo, a fermentação em estado sólido tornou-se uma das vias mais baratas e eficientes na produção de biossurfactantes, mesmo que ainda haja pouca exploração comercial (Costa et al., 2018). Segundo Manan e Webb., (2017), há 4 grandes vantagens na utilização de FES: 1 – econômicas, de uso de subproduto agroindustrial para fabricação de produtos com alto valor agregado; 2 – ambientais, minimiza problemáticas de descarte inadequado de resíduos associados à poluição; 3 – biológico, menor repressão catabólica e maior produtividade pelo menor uso de água e 4 – técnica, extração do produto menos dificultosa por menor uso de solventes complexos. Pensando nos benefícios e nas vastas possibilidades, muitos trabalhos demonstraram a utilização de diversas biomassas, assim como microrganismos na busca por diferentes produtos de biossurfactantes e/ou melhores rendimentos. A Tabela 5 mostra alguns microrganismos produtores de biossurfactantes na FES, o tipo de estrutura e o substrato usado.

Tabela 5 – Biossurfactantes: microrganismos produtores em fermentação em estado sólido

Microrganismo	Substratos	Biossurfactante	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Cascas de arroz e		(Martins et al., 2006)
<i>Phialemonium sp.</i>	farelo de arroz desengordurado	-	
<i>Bacillus subtilis</i> DM-03 e DM-04	Cascas de Batata	Lipopeptídeos	(Das e Mukherjee, 2007) (Singhania et al., 2010)
<i>Brevibacterium aureum</i> MSA13	Meio pré-tratado à base de melão	Lipopeptídeos	
<i>Nocardiopsis lucentensis</i> MSA04	Farelo de trigo	Glicolipídeos	(Kiran et al., 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	Bagaço de cana-de- açúcar e farelo de milho	Ramnolipídios	(Camílios-Neto et al., 2011)
<i>Starmerella bombicola</i> NRRL Y-17069	Farelo de trigo, casca de isabgol	Glicolipídeos	(Parekh e Pandit, 2011)
<i>Bacillus subtilis</i> SPB1	Milhete	-	(Ghribi et al., 2012)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Palha de arroz e farinha de soja	Surfactina	(Zhen Zhu et al., 2013)

Continua...

Conclusão...

Microrganismo	Substratos	Biosurfactante	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XZ-173	Palha de arroz e farinha de soja	Lipopeptídeos	(Zhen Zhu et al., 2013)
<i>Bacillus subtilis</i> SPB1	Farinha de atum e resíduos de batata	Lipopeptídeos	(Mnif et al., 2013)
<i>Bacillus subtilis</i> SPB1	Farinha de resíduos de folhas de oliveira e farinha de azeitonas	Lipopeptídeos	(Zouari et al., 2014)
<i>Nocardiopsis sp.</i> MSA13	lodo pré-tratado de curtume, melaço pré-tratado, lodo tratado de curtume e farelo de trigo	Glicolipídeos	(Kiran et al., 2014)
<i>Pleurotus djamor</i>		Complexo proteico-	
<i>Pleurotus eryngii</i>	Casca de semente de girassol	polissacarídeo-	(Velioglu et al., 2014)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>		lipídeo	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Casca de semente de girassol	Complexo peptídico-	
<i>Candida sp.</i>	Óleos residuais	lipídico de	(Velioglu et al., 2015)
e	e	carboidratos	
<i>Pleurotus sp.</i>	farelo de arroz	Glicolipídeos	(Ahuekwe et al., 2016)
<i>Starmerella bombicola</i>	Bolo de óleo (indústria de refino)	-	(Jiménez-Peñalver et al., 2016)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	-	(Brumano, 2017)
<i>Starmerella bombicola</i>	ácido esteárico com espuma de poliuretano de alta densidade	Glicolipídeos	(Jiménez-Peñalver et al., 2018)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 15GR	cana-de-açúcar e farelo de sementes de girassol	Ramnilipídeos	(El-Housseiny et al., 2019)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	espuma de poliuretano de alta densidade com óleo de palma e NaNO ₃ hidrolisados ricos em	Ramnilipídeos	(Gong et al., 2020)
<i>Serratia nematodiphila</i>	xilose, gerados a partir de palha de arroz	Glicolipídeos	(Panjiar et al., 2020)

Os trabalhos em FES também buscam otimizar seus processos almejando produção e/ou produtividade, elucidando importantes parâmetros necessários para o escalonamento do processo. Zhu et al., (2013) demonstrou que não seria possível utilizar somente casca de arroz como substrato em FES para produção de biossurfactante e que o substrato poderia indiretamente ser utilizado na biossíntese de surfactina, de modo que sua otimização nas condições ótimas de produção no meio foram 5 g de farinha de soja, 4 g de palha de arroz, 2 % (m/m) de maltose e 2,65 % (m/m) de glicerol. Posteriormente, Castiglioni et al., (2014) determinaram através de modelos matemáticos que as condições nutricionais e de aeração estão diretamente relacionadas à produção biossurfactantes e sua atividade emulsificante usando como substrato casca e farelo de arroz para posterior escalonamento em biorreator. Pensando numa problemática real, e no contexto da importância e relevância da biorrefinaria nos dias atuais, Panjjar et al., (2020) utilizaram hidrolisados de xilose gerados a partir de palha de arroz como substrato para produção de biossurfactantes. Alguns trabalhos produzidos em FES (Gong et al., 2020; Rodríguez et al., 2020) utilizaram a otimização baseados em parâmetros físico-químicos do processo como pH, tempo de fermentação, disponibilidade de água e outros; fatores importantes, mas intrinsecamente associados ao metabolismo do organismo produtor e que variam devido aos fatores propostos em cada trabalho na produção final do biossurfactante.

Inicialmente, a maioria dos estudos em FES ocorrem utilizando frascos *Erlenmeyer* devido a facilidade de manipulação e baixo uso de materiais para os testes. O escalonamento do processo na utilização de biorreatores é um passo que poucos trabalhos abrangem na literatura devido a suas dificuldades relacionados, principalmente, à remoção de calor e melhoria da transferência de massa no sistema, assim como a produtividade do bioproduto (Singhania et al., 2017; Lomthong et al., 2020). Ainda assim, pode-se mencionar os trabalhos de Castiglioni et al., (2014), Jiménez-Peñalver et al., (2018) Slivinski et al., (2012) que utilizaram biorreatores de leito fixo e os trabalhos de (Jiménez-Peñalver et al., 2016; Gong et al., 2020) que simulam e utilizam biorreatores de tambor rotativo em seus processos.

Alguns exemplos na produção de biossurfactantes utilizando biorreatores são mais frequentes na literatura com o passar dos anos, indicando que as pesquisas para estes bioprodutos são crescentes não apenas em escalas laboratoriais. Castiglioni et al., (2014) promoveu um estudo na produção de biossurfactantes em fermentação em estado sólido utilizando como substrato palha e farelo de arroz com o microrganismo *Aspergillus fumigatus*, objetivando modelar a produção de biossurfactante em um biorreator de coluna de leito fixo. Utilizando como parâmetros condições nutricionais, aeração e tempo, foi desenvolvido um modelo semiempírico que propôs que a atividade emulsificante máxima da fermentação em estado sólido foram $8,16 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ por 112 h sem fontes de hidrocarboneto e $8,10 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ por 108 h utilizando óleo diesel como

fonte de hidrocarboneto. Jiménez-Peñalver et al., (2018) usando espuma de poliuretano como suporte inerte para a levedura *Starmerella bombicola*, produziram sofrorolipídeos a partir do ácido esteárico (C18:0) e melão utilizando fermentação em estado sólido em biorreatores cilíndricos de polivinilcloreto de leito fixo, obtendo um rendimento de 0,21 g de biossurfactante por g de substratos em 384 h. Gong et al., (2020), utilizando o meio ideal proposto em seu trabalho e um biorreator por pulsação de pressão de ar rotativo de 30 L para fermentação em estado sólido, alcançou um rendimento de ramnolipídeos de 39,8 g/L em 168 h, utilizando espuma de poliuretano de alta densidade como suporte, óleo de palma e o NaNO_3 como substratos; obtendo assim um produto que diminuiu a tensão superficial da água para 28 mN/m e manteve a concentração micelar crítica em 50 mg/L.

Como subproduto da indústria sucroalcooleira, o bagaço de cana-de-açúcar é rico em material lignocelulósico e possui diversos açúcares fermentescíveis que podem ser empregados como substratos em bioprocessos. Como por exemplo a utilização desse substrato na fermentação em estado sólido em processos biotecnológicos para produção de biossurfactantes (Figura 16). Diversos pesquisadores obtiveram resultados promissores como o de Camilios-Neto et al., (2011), que avaliou a produção de biossurfactante em fermentação

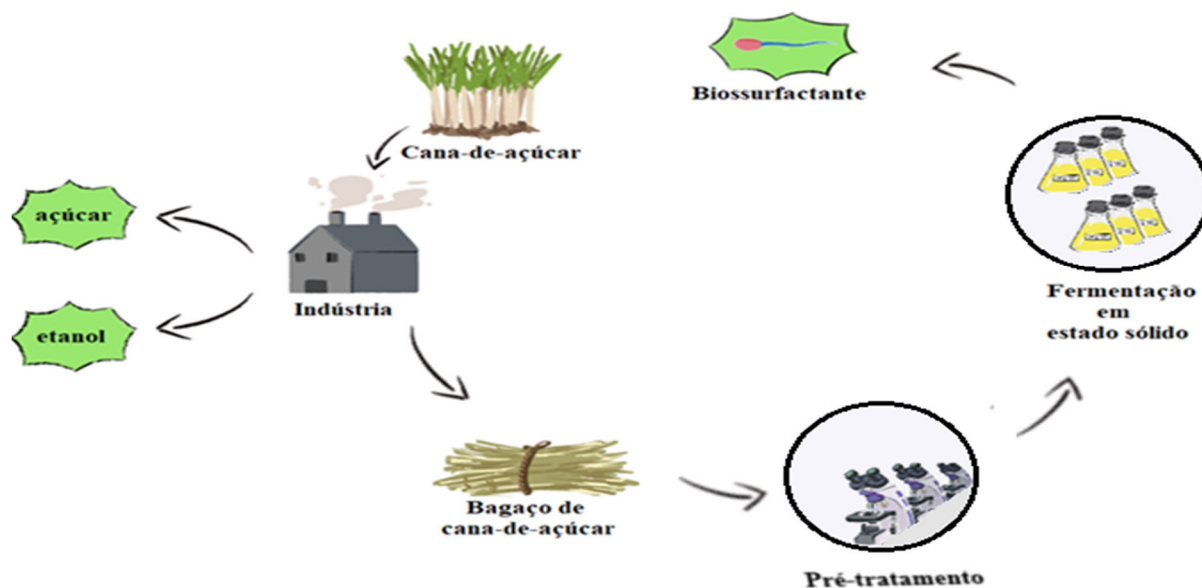


Figura 16 – Esquema demonstrando a utilização de bagaço de cana-de-açúcar na produção de biossurfactante em fermentação em estado sólido

em estado sólido misturando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de milho suplementado com óleo de soja e glicerol utilizando *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 e obteve 45 g/L do ramnolipídio. El-Housseiny et al., (2019) concluiu que a mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de sementes de girassol (50:50) formaram o substrato ideal para a produção de 46,85 g/L de ramnolipídeos em FES usando um mutante de *Pseudomonas aeruginosa* 15GR. No entanto, a produção de biossurfactante em estado sólido utilizando *Aureobasidium pullulans* ainda é pouco explorado, como mostrado trabalhos de Brumano (2017) e posteriormente Carneiro (2019).

Assim, em função da crescente importância do biossurfactante no mercado nacional e internacional e a necessidade de se utilizar processos sustentáveis, este estudo visa à produção de biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* LB83 utilizando FES. Enquanto outros trabalhos relatam a utilização de subprodutos agroindustriais como suporte, a novidade deste trabalho é a utilização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica como suporte e substrato, fazendo uma conversão direta do material lignocelulósico ao bioproduto, inserindo a utilização da *A. pullulans* LB83 no contexto de biorrefinaria.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Produção de biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* LB83 por FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica como fonte de nutriente.

3.2 Específicos:

- Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*;
- Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por cavitação hidrodinâmica utilizando o planejamento fatorial 2^3 por Box-Behnken;
- Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica;
- Fermentação da levedura *Aureobasidium pullulans* LB83 utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica;
- Determinação das atividades enzimáticas de celulases totais, endoglucanases e exoglucanases durante a FES;
- Determinação das propriedades emulsificantes e tensoativas dos compostos produzidos a partir da análise da tensão superficial, índice de emulsão e pela capacidade de estabilizar emulsão;

4 METODOLOGIA

Na Figura 17 observa-se um esquema das etapas executadas no decorrer do trabalho.

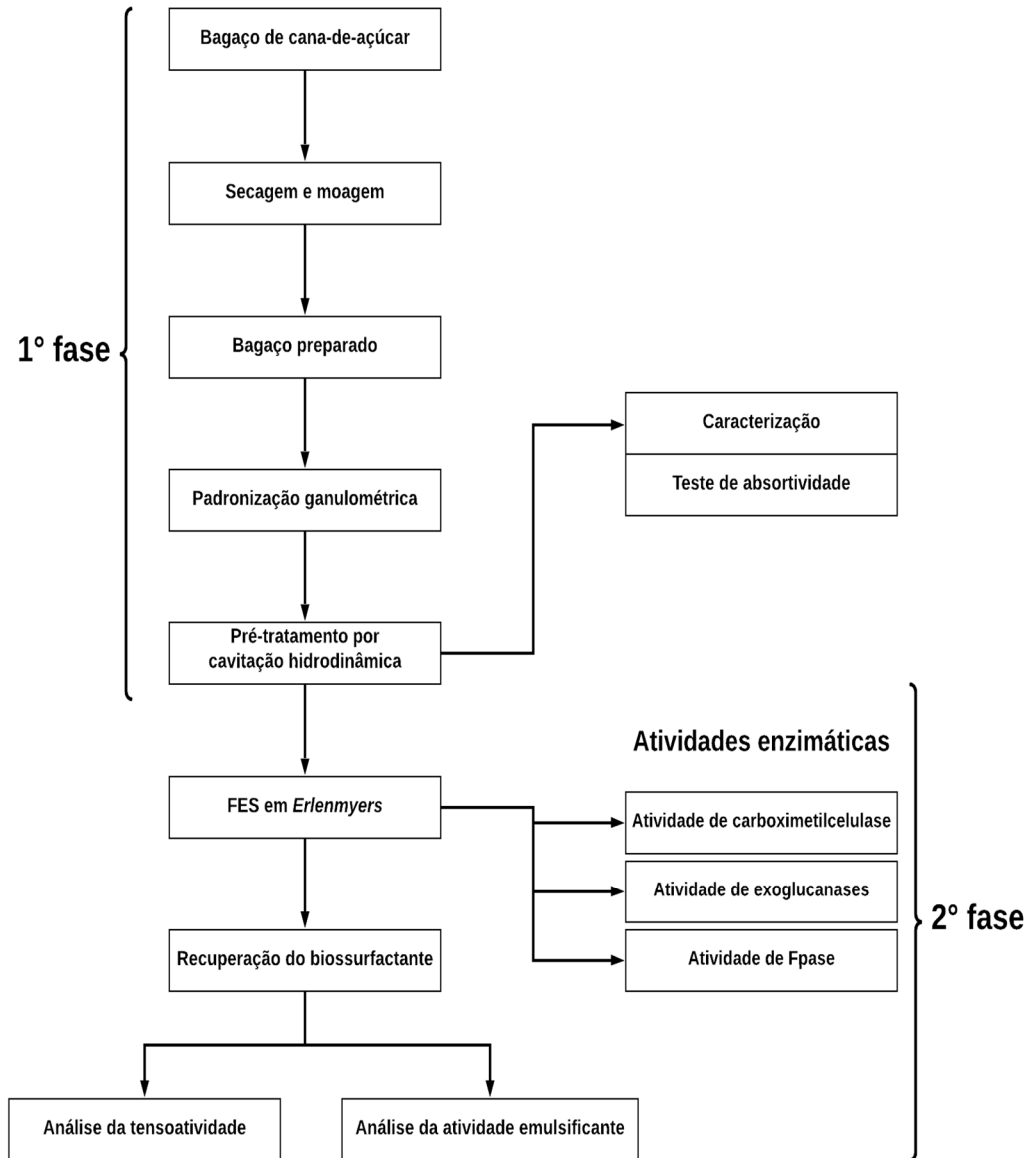


Figura 17 – Fluxograma de atividades principais

4.1 Matéria prima

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi fornecido pela empresa Ipiranga Agroindustrial S.A, (Descalvado – SP) e expostos ao sol para secagem até ter atingido um teor de umidade de 10 % (m/m) determinado em balança de umidade com infravermelho.

4.2 Granulometria do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi moído em um moinho elétrico e suas frações foram medidas em peneira padrão Tyler para padronizar sua granulometria. A fração utilizada neste trabalho foi a correspondente à 14 *mesh*.

4.3 Preparo e caracterização físico-química do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em um sistema de cavitação hidrodinâmica do laboratório de Biopolímeros, Biorreatores e Simulação de Processos (EEL/USP) de acordo com Terán Hilares et al., (2016). O sistema consistiu em um reservatório e um reator de cavitação cilíndrica de aço inoxidável que são interligados a duas bombas centrífugas. Uma forma radial de placa de orifício com 27 orifícios de 1 mm de diâmetro foi usada em todos os experimentos (Kim et al., 2015). O bagaço de cana-de-açúcar foi mantido em um pano cilíndrico (40 mesh) mantido dentro da chamada zona de cavitação no reator de cavitação. O carregamento de sólidos (%) foi calculado dividindo-se a massa do bagaço (em gramas) pelo volume do cilindro do reator de cavitação (1425 mL). Após o pré-tratamento, a fração sólida foi lavada até pH 7,0, seca e caracterizada para determinar seus principais componentes como celulose, hemiceluloses e lignina (Sluiter et al., 2011). A quantificação de açúcares (glicose, xilose, arabinose e celobiose) e grupos acetil (ácido acético) presentes na biomassa *in natura* e pré-tratadas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se um cromatógrafo Agilent 1200 series (EUA), com uma coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), 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 de 20 µl. Antes de se efetuar as análises em CLAE, as amostras foram filtradas em filtro Sep Pak C18 (WATERS).

4.4 Otimização do processo de cavitação hidrodinâmica em bagaço de cana-de-açúcar

Um planejamento fatorial do tipo 2^3 feito por Box-Behnken (BOX; BEHKEN, 1960) com 3 replicatas no ponto central totalizando 15 experimentos foi realizado visando otimizar a cavitação hidrodinâmica associada ao tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar. Foram estudadas três variáveis independentes: concentração de NaOH (X_1), tempo de cavitação (X_2) e carregamento de sólidos (X_3). Os níveis do pré-tratamento foram estabelecidos da seguinte forma: concentração de NaOH de 0,1 – 0,5 mol/L, tempo de cavitação entre 5 – 25 min e taxa de carregamento de sólidos de 1 – 2 %. Os resultados foram analisados pelo software *Design-Expert 6.0.8 Portable* e *Statistica 7.0*, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 feito pelo experimento Box-Behnken utilizado para a otimização do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizando cavitação hidrodinâmica

Experimentos	NaOH (mol/L)	Tempo (min)	Carregamento de sólido (%)
1	0,1 (-)	15 (0)	1 (-)
2	0,5 (+)	15 (0)	1 (-)
3	0,1 (-)	15 (0)	2 (+)
4	0,5 (+)	15 (0)	2 (+)
5	0,1 (-)	5 (-)	1,5 (0)
6	0,5 (+)	5 (-)	1,5 (0)
7	0,1 (-)	25 (+)	1,5 (0)
8	0,5 (+)	25 (+)	1,5 (0)
9	0,3 (0)	5 (-)	1 (-)
10	0,3 (0)	5 (-)	2 (+)
11	0,3 (0)	25 (+)	1 (-)
12	0,3 (0)	25 (+)	2 (+)
13	0,3 (0)	15 (0)	1,5 (0)
14	0,3 (0)	15 (0)	1,5 (0)
15	0,3 (0)	15 (0)	1,5 (0)

Níveis: (-): nível inferior; (0): ponto central; (+): nível superior

4.5 Manutenção do microrganismo

A linhagem leveduriforme *Aureobasidium pullulans* LB83 foi cedida pelo Prof. Fernando Carlos Pagnocca do Centro de Estudos de Insetos Sociais (UNESP/Rio Claro). A linhagem foi mantida a 4 °C em placas de Petri com meio Ágar-Extrato de Levedura e Malte (YMA) sólido (glicose 10 g/L, extrato de levedura 3 g/L, peptona 5 g/L, extrato de malte 3 g/L e ágar 20 g/L) (Brumano, 2017).

4.6 Capacidade adsortiva do bagaço de cana-de-açúcar

A determinação de adsorvidade foi realizada para testar a quantidade de volume máxima de meio líquido que o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado retém. O teste foi feito colocando 2 g de bagaço com tamanho de partículas maiores que 14 *mesh* em um béquer de 125 mL. Adicionou-se 1 mL do meio *Kitamoto* modificado (peptona 0,6 g/L, extrato de levedura 0,4 g/L, NaCl 1g/L, K₂HPO₄ 5g/L e MgSO₄ 0,4 g/L) e foram misturados. Assim, foi repetido a adição do meio e misturados novamente até a visualização de meio líquido no sistema (Brumano, 2017).

4.7 Preparo do inóculo e fermentação

As células de *Aureobasidium pullulans* LB83, cultivadas em placa de Petri com meio YMA, foram transferidas com uma alçada para frascos *Erlenmeyer* de 125 mL previamente preenchido com meio de cultivo proposto por *Kitamoto* (1990) e modificado por Manitchotpisit et al., (2011): peptona 0,6 g/L, extrato de levedura 0,4 g/L, NaCl 1 g/L, K₂HPO₄ 5 g/L e MgSO₄ 0,4 g/L suplementado com 50 g/L de sacarose. Após a inoculação, os frascos foram levados a agitador rotatórios (*New Brunswick Scientific – Excella E24*, Hamburgo, Alemanha) à 200 rpm, 28 °C por 48 horas. Posteriormente, as células foram separadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 min e ressuspensas em solução salina 0,9 % (m/V) e contadas em câmara Agasse-Lafont-R, que contém retículos de 0,0025 mm² e profundidade de 0,100 mm, buscando ajustar a concentração celular inicial para 10⁸ células/mL (Brumano, 2017). A solução umedecedora (mistura do meio *Kitamoto* sem sacarose a uma concentração celular 10⁸ células/mL) previamente ajustada foi inoculada em frascos *Erlenmeyers* com o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e umidificado de forma estéril e homogênea com 7 ml de solução umedecedora para FES.

As fermentações tiveram como objetivo determinar o melhor substrato e o tempo ideal à produção de biossurfactante. A FES foi feita em *Erlenmeyers* com volume de 125mL contendo 2 g de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas (em diferentes frascos) e inoculadas com

a solução umedecedora. Foram preparados uma triplicata para cada ponto a ser analisado, sendo cada frasco considerado uma amostra. Os frascos foram incubados em uma estufa a 28 ± 2 °C, sob umidade de 80 % por um período de 14 dias (336 horas). Os frascos foram retirados nos tempos de 0, 3, 7, 9, 11 e 14 dias. Foram analisados os índices de emulsificação e as atividades enzimáticas em testes de endoglucanase, exoglucanase e FPase.

4.8 Determinação do índice de emulsificação

O índice de emulsificação (I.E) foi determinado de acordo com metodologia adaptada descrita por Chen et al (2007), em que 1 mL do sobrenadante de cada cultivo foi misturado com 1 mL dos substratos hidrofóbicos utilizados (querosene, óleo de soja, fenol líquido, hexano e acetato de etila) e submetido a agitação (9000 rpm) em vórtex PHOENIX AP56 por 1 min. O I.E foi expresso em porcentagem (%) entre a razão da altura da camada emulsiva pela altura total da coluna do líquido de acordo com a Equação 5:

$$\text{I.E (\%)} = \frac{CE}{AT} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Em que CE corresponde a medida da camada de emulsão e AT a altura total do líquido (Chen et al., 2007).

4.9 Determinação da estabilidade de emulsão

A estabilidade das emulsões produzidos foi determinada pela repetição do cálculo do I.E, em diferentes tempos (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.10 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial do sobrenadante, rico em biossurfactante, foi determinada usando tensiômetro (SensaDyne modelo 6000). Água destilada foi usada como controle.

4.11 Extração e recuperação do biossurfactante

O extrato bruto da fermentação foi utilizado em dois testes distintos (testes enzimáticos e índice de emulsificação) e, para cada objetivo, a extração do extrato bruto da fermentação foi realizado de forma distinta: para testes enzimáticos, o extrato bruto da fermentação foi extraído com adição de 5mL de tampão acetato 0,05 M pH 4,8 por grama de bagaço; para testes de índice

de emulsificação, o extrato bruto da fermentação foi extraído com adição de 5 mL de água por grama de bagaço. Os frascos foram deixados sob incubação em agitador rotatório (New Brunswick Scientific – Excella E24, Hamburgo, Alemanha) a 200 rpm e 28 °C por 1 h. A fração líquida foi separada do frasco por prensagem e centrifugada (Novatécnica – NT 810, Piracicaba, Brasil) por 15 min a 3000 rpm, separando o líquido livre de células.

4.12 Preparo do reativo de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

Para o preparo do reagente DNS, foram pesados 10,6 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico e 19,8 g de NaOH e dissolvido em 1416 mL de água deionizada. Em seguida adicionou-se 7,6 mL de fenol fundido a 50 °C, 306 g de sal de tártaro e potássio e 8,3 g de metabisulfito de sódio e homogenizou-se a solução obtida manualmente.

4.13 Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade de carboximetilcelulase (endo-1,4- β -glucanase) foi determinada através da metodologia de Tanaka et al., (1981) modificada. Foram adicionados 0,9 mL de solução de carboximetilcelulose 0,44 % m/V (SIGMA®) e 0,1 mL de extrato enzimático aos tubos de ensaio onde a reação foi mantida durante 10 min a 50 °C. Após isso, foi adicionado 1,5 mL de reativo de DNS, onde foram fervidos a 100 °C por 5 min. A leitura de absorbância foi realizada a 540 nm. A absorbância foi convertida em concentração de glicose de acordo com uma curva padrão construída entre 0,5 - 2,7 μ mol/mL.

4.14 Atividade exoglucanase

A atividade de exoglucanase (exo-1,4- β -glucanase) foi determinada através do protocolo de Wood e Bhat, (1988). Foram adicionados 0,9 mL de Avicel 1 % m/V (SIGMA®) e 0,1 mL de extrato enzimático aos tubos de ensaio mantidos durante 60 min a 50 °C para a realização da reação. Após isso, foi adicionado 1,5 mL de reativo DNS, e aquecidos à 100 °C por 5 min. Os tubos de ensaios foram submetidos à centrifugação a 3500 rpm por 20 min, onde a fração insolúvel foi separada do sobrenadante. O sobrenadante foi lido a 540 nm. A absorbância foi convertida em concentração de glicose de acordo com uma curva padrão construída entre 0,5 - 2,7 μ mol/mL.

4.15 Determinação de atividade FPase

A atividade FPase é determinada a partir da degradação de uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm. No tubo contendo o ensaio reacional foi adicionado 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50mM, 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. Em outro tubo, o controle da reação foi efetuado adicionando 1 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático (extrato bruto da fermentação obtido no item 6.11) Em um terceiro tubo foi adicionado 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro, este foi comparado ao controle. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50 °C por uma hora e a reação foi interrompida com a adição de 3 mL DNS. Os tubos foram aquecidos em água fervente por 5 min e logo após foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição de absorvância em de 540 nm. Os valores de atividade foram estimados segundo recomendação de Ghose *et al* (1987). Considerou-se 1 unidade internacional (UI) equivalente a 1 μ mol de glicose liberada por minuto, que corresponde a 0,18 mg de glicose por minuto.

4.16 Análise estatística

A análise estatística dos resultados, obtidos nos experimentos foi realizada por testes de significância das médias, analisados nos softwares *Design-Expert 6.0.8 Portable* e *Statistica 7.0*

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição do Bagaço de cana-de-açúcar

Os resultados da caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* estão apresentados na Tabela 7. O bagaço de cana-de-açúcar é composto em sua totalidade por celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas.

Tabela 7 – Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (média \pm desvio padrão)

Componentes	(%)
Celulose	43,1 \pm 0,3
Hemicelulose	28,2 \pm 0,2
Lignina	21,1 \pm 0,3
Extrativos	4,6 \pm 0,3
Cinzas	0,7 \pm 0,1

Como mostrado na Tabela 7, no bagaço *in natura* a fração hemicelulósica correspondeu a 28,2 % (xilana + arabinosil + acetil), enquanto a celulose correspondeu à maior parte do material, representando 43,1 % do total (glucana). Outros valores de componentes importantes como a fração de celulose (glucana) e de lignina total são semelhantes aos encontrados na literatura, por diversos outros autores, como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição química percentual do bagaço *in natura*: dados da literatura

Referência	Componente principais bagaço de cana-de-açúcar (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Carneiro et al. (2017)	42	28,8	20,5
Zhu et al., (2020)	25,2	48,3	31
Gomes et al., (2020)	39,8	17,1	22,2
Zhang et al., (2021)	41,2	22,8	25,2

Diferentes trabalhos citados na Tabela 8 mostraram que os valores dos componentes principais do bagaço de cana-de-açúcar podem variar como a celulose entre 25,2 a 42 %, hemicelulose entre 17,1 e 48,3 % e de lignina entre 20,5 e 31 %. A diferença apresentada pode ser explicada por variantes utilizadas ao longo do processo como a variedade da cana-de-açúcar

de onde o bagaço é oriundo, idade de colheita, condições endofoclimáticas (solo, temperatura e umidade) das regiões onde foram cultivadas e também a utilização de fertilizantes, sistemas de irrigação. Além disso, diferentes métodos analíticos utilizados na caracterização química da biomassa tratada também podem interferir na variação dos resultados nas análises (Ascencio et al., 2019; Canilha et al., 2011, 2012). Outro problema que pode interferir nas características químicas da amostra do bagaço de cana-de-açúcar está relacionado ao tempo de estocagem e teores de umidade, sendo indicado trabalhar com a biomassa em valores próximos a 10 % de umidade (Santos et al., 2011). Assim, foi observado que os valores obtidos no presente trabalho, estão próximos aos encontrados na literatura.

5.2 Caracterização química do bagaço pré-tratado por cavitação hidrodinâmica

Os efeitos da cavitação hidrodinâmica como pré-tratamento objetivam a degradação de moléculas orgânicas, como a lignina, tornando mais acessível as frações celulósica e hemicelulósica do material pré-tratado (Badve et al., 2014; Kim et al., 2015; Terán Hilares et al., 2016). A Tabela 9 mostra todos os experimentos realizados propostos no planejamento e os resultados de remoção dos principais componentes químicos do bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento pela cavitação hidrodinâmica em diferentes condições. Como observado na Tabela 9, o valor que ocorreu maior remoção de lignina foi no experimento 8, em torno de 40,2 %, enquanto o menor foi de 2,6 %, no experimento 5, Como consequência do pré-tratamento, houve redução máxima de celulose de 16,2 % (experimento 6) e de hemicelulose de 22 % (experimento 4).

A lignina é considerada um fator limitante à taxa de hidrólise enzimática da biomassa, atuando como uma barreira física para restringir o acesso das celulasas à celulose (Laureano-Perez et al., 2005; Axelsson et al., 2012) . Vários estudos indicam que a digestibilidade da celulose é aumentada com a remoção da lignina (Zhao et al., 2009; Yu et al., 2016; Siqueira et al., 2017). Sendo assim, é válido atribuir que a formação de um bioproduto como o biossurfactante, oriundo de uma fermentação, pode ser facilitada e melhorada com a remoção de lignina prévia do material lignocelulósico pré-tratado.

Tabela 9 – Composição do bagaço *in natura* e dos resíduos sólidos após cada condição de pré-tratamento da matriz do planejamento de experimentos com valores reais e codificados (entre parênteses) para o pré-tratamento da cavitação hidrodinâmica no bagaço utilizando como fatores a concentração de NaOH (mol/L), tempo de cavitação (min) e carregamento de sólidos (%).

Experimento	Concentração NaOH (mol/L)	Tempo (min)	Carregamento de sólidos (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Recuperação de sólidos (%)	Remoção (%)	Cell ¹	Hem ²	Lig ³
<i>In natura</i>	-	-	-	43,1 ± 0,3	28,2 ± 0,2	21,1 ± 0,3	0,7 ± 0,1	-	-	-	-	-
1	0,1 (-1)	15 (0)	1 (-1)	43,3 ± 0,3	27,8 ± 0,1	21,5 ± 0,3	1,5 ± 0,1	88,8	12,5	10,9	12,5	10,0
2	0,5 (+1)	15 (0)	1 (-1)	49,1 ± 0,9	28,5 ± 0,5	19,0 ± 0,4	1,3 ± 0,1	83,1	16,1	5,3	16,1	27,3
3	0,1 (-1)	15 (0)	2 (+1)	44,3 ± 0,6	28,3 ± 0,4	19,8 ± 0,9	3,0 ± 0	90,2	9,4	7,4	9,4	15,7
4	0,5 (+1)	15 (0)	2 (+1)	46,9 ± 0,4	26,9 ± 0,3	18,1 ± 0,2	2,7 ± 0,3	81,8	22,0	11,0	22,0	30,1
5	0,1 (-1)	5 (-1)	1,5 (0)	43,2 ± 0,2	27,6 ± 0,3	22,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	91,9	9,7	8,0	9,7	2,6
6	0,5 (+1)	5 (-1)	1,5 (0)	41,1 ± 1,3	25,1 ± 0,7	20,5 ± 0,1	1,9 ± 0,1	87,8	21,9	16,2	21,9	15,1
7	0,1 (-1)	25 (+1)	1,5 (0)	45,6 ± 0,6	26,0 ± 0,6	20,8 ± 0,3	1,5 ± 0,1	86,4	20,2	8,5	20,2	15,5
8	0,5 (+1)	25 (+1)	1,5 (0)	52,2 ± 0,3	29,4 ± 0,9	16,1 ± 0,4	1,3 ± 0,1	78,7	18,0	4,7	18,0	40,2
9	0,3 (0)	5 (-1)	1 (-1)	48,8 ± 1,2	29,5 ± 0,7	20,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2	89,5	6,3	0	6,3	12,1
10	0,3 (0)	5 (-1)	2 (+1)	44,6 ± 0,3	28,3 ± 0,2	21,0 ± 0,1	1,9 ± 0,3	90,0	9,8	6,8	9,8	10,9
11	0,3 (0)	25 (+1)	1 (-1)	48,6 ± 0,9	29,4 ± 0,6	18,0 ± 0,5	2,0 ± 0,1	79,5	17,1	10,4	17,1	32,4
12	0,3 (0)	25 (+1)	2 (+1)	48,3 ± 0,6	28,6 ± 0,1	17,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1	82,3	16,4	7,7	16,4	31,2
13	0,3 (0)	15 (0)	1,5 (0)	48,4 ± 1,8	26,6 ± 1,1	19,4 ± 0,3	1,9 ± 0,1	84,5	19,8	5,2	19,8	22,7
14	0,3 (0)	15 (0)	1,5 (0)	45,0 ± 0,8	27,7 ± 0,4	19,4 ± 0,2	1,8 ± 0,1	86,8	14,7	9,3	14,7	20,7
15	0,3 (0)	15 (0)	1,5 (0)	46,6 ± 2,5	28,8 ± 0,1	19,5 ± 0,9	1,7 ± 0,4	85,7	12,4	7,4	12,4	21,1

Cell¹: celulose; Hem²: Hemicelulose; Lig³: lignina

Realizando uma análise estatística para remoção de lignina baseada nos experimentos feitos da Tabela 9, observou-se os efeitos das variáveis no pré-tratamento na Figura 18. Os efeitos dos fatores X_2 (tempo em min), X_1 (Concentração em mol/L de NaOH), e a interação entre X_1X_2 foram considerados estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95 %, demonstrados na linha vermelha que verticaliza a Figura 18.

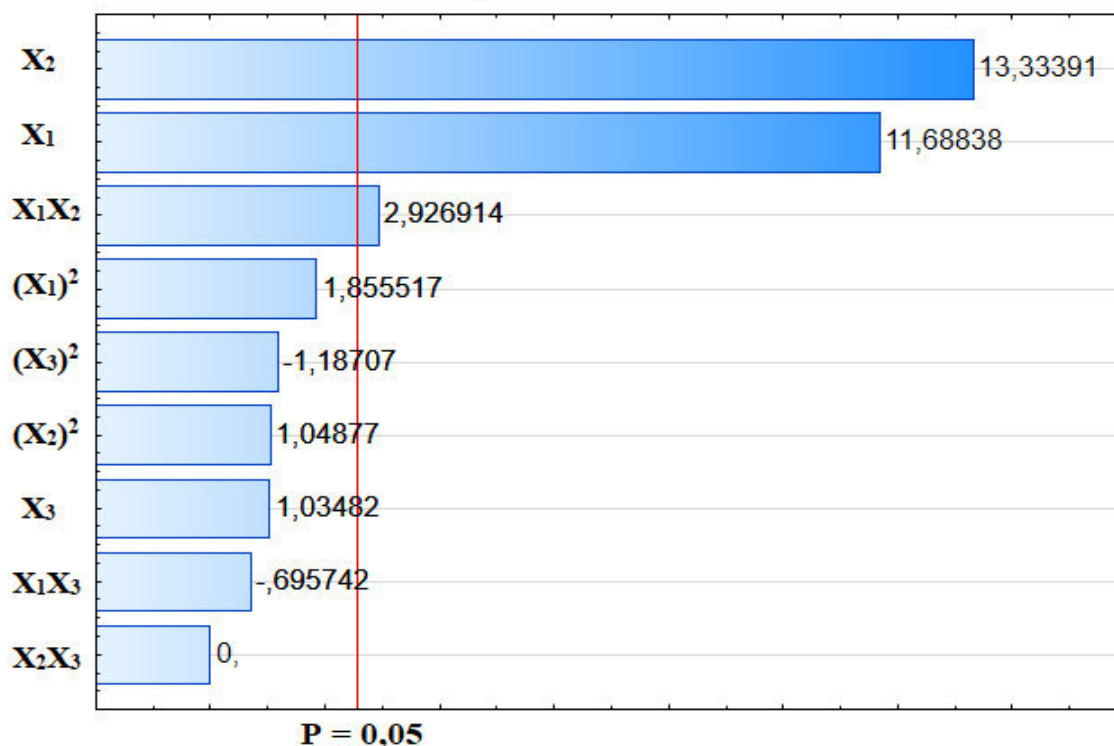


Figura 18 – Gráfico de Pareto para remoção de lignina (%) com nível de confiança de 95 %.

X_1 – concentração de NaOH; X_2 – tempo de cavitação; X_3 – carregamento de sólidos

Na Figura 18, o fator X_2 (tempo) é positivo e tem o maior efeito no pré-tratamento do que a de X_1 (mol de NaOH/L) e a interação entre X_1X_2 , todos também positivos. Desse modo, os valores X_1 , X_2 e X_1X_2 foram utilizados para geração de um modelo que expressa a remoção de lignina deste trabalho, demonstrado na Tabela 10. De fato, foi observado que o maior nível de remoção de lignina do bagaço pré-tratado foi de 40,2 % (experimento 8), onde se utilizou maior concentração de NaOH e maior tempo de cavitação. Conseqüentemente, o valor onde a menor remoção de lignina ocorreu foi de 2,6 % (experimento 5) onde utilizou-se os menores níveis de concentração de NaOH e tempo de cavitação no pré-tratamento.

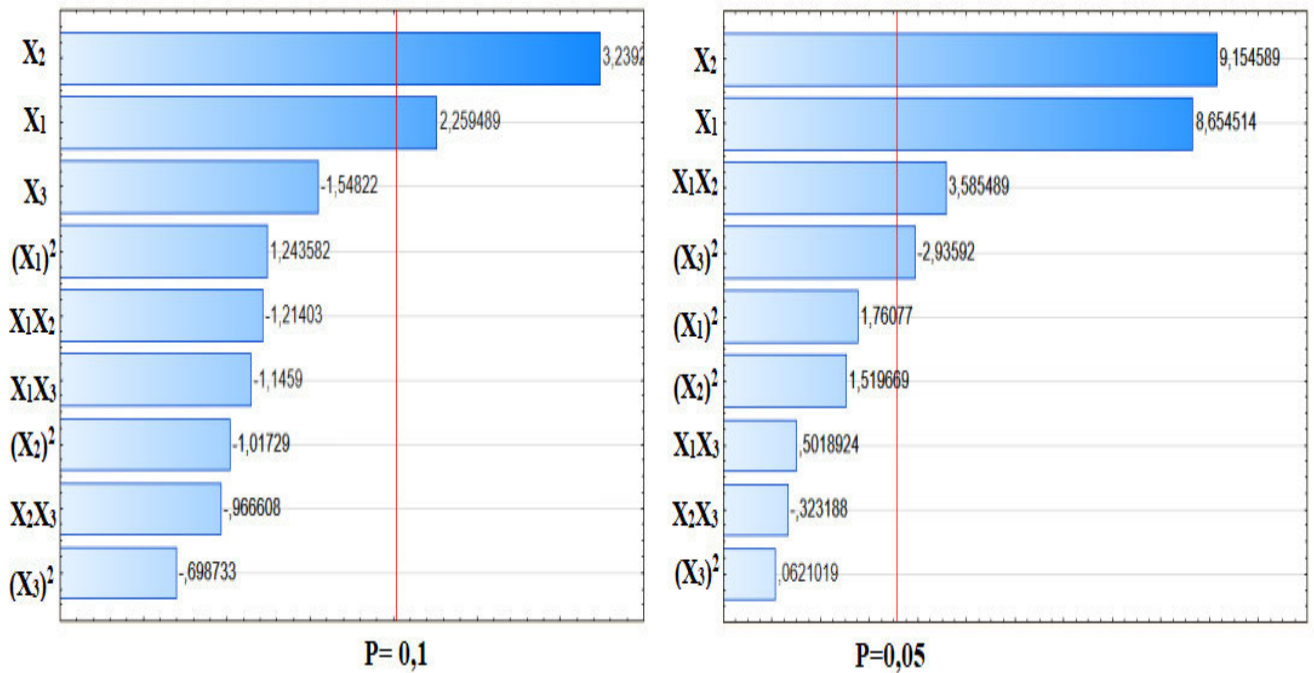


Figura 19 – Gráfico de Pareto para remoção de lignina (%): (esquerda) Kim et al., (2015) e (direita) Terán Hilares et al., (2017)

X_1 – contração de NaOH; X_2 – tempo de cavitação; X_3 – carregamento de sólidos

Os trabalhos realizados por Kim et al., (2015) e Terán Hilares et al., (2017), utilizando nível de confiança de 90 e 95 % (Figura 19), respectivamente, mostraram que os parâmetros tempo e concentração de NaOH, nesta ordem, são os mais importantes para a remoção de lignina, como mostrados com os experimentos realizados neste trabalho, na Figura 18.

O teor de remoção de lignina no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por cavitação hidrodinâmica foi ajustado para um modelo com $R^2 = 0,9619$ e um p -valor menor que 0,01, um valor F de 92,59 e com uma não significância na falta de ajuste, o que é considerado ideal para o modelo. Todos os valores estatísticos mostram que o modelo obtido é adequado para prever o rendimento de remoção de lignina dentro da faixa das variáveis estudadas.

Tabela 10 – Análise de variância para um modelo 2FI composto para o rendimento de remoção de lignina do planejamento com nível de confiança de 95 %.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	p-valor	
Modelo	1402,86	3	467,62	92,59	< 0,0001*	Significante
X ₁	593,40	1	593,40	117,50	< 0,0001*	
X ₂	772,25	1	772,25	152,91	< 0,0001*	
X ₁ X ₂	37,21	1	37,21	7,31	0,0201	
Resíduo	55,55	11	5,05			
Falta de ajuste	53,31	9	5,92	5,29	0,1691	Não significativa
Erro puro	2,24	2	1,12			
Total	1458,41	14				

R² = 0,9619

*Significativo ao nível de confiança de 95 %.

A otimização, então, gerou um modelo de remoção de lignina proposto na Equação 6:

$$Y_1 = -0,28708 + 20,18750X_1 + 0,52500X_2 + 1,52500X_1X_2 \quad (\text{Equação 6})$$

Em que:

Y₁ = Remoção de lignina (%), X₁ = concentração de NaOH (mol/L), X₂ = tempo (min)

Empregou-se a ferramenta de otimização numérica do programa *Design-Expert* para validar o modelo de remoção de lignina apresentado na Equação 6, adotando-se como critério: maior concentração de NaOH (0,5 mol/L), maior tempo de cavitação (25 min) e menor carregamento de sólidos (1 %), como teste. Foram feitos 3 experimentos utilizando estes parâmetros. Para cada experimento foi feito uma duplicata com os resultados mostrados na Tabela 11:

Tabela 11 – Resultados da caracterização para validação do modelo de remoção de lignina

Experimento	Concentração NaOH (mol/L)	Tempo (min)	Carregamento (%)	Lignina total	Remoção de lignina %
Experimento 1	0,5 (+)	25 (+)	1 (-)	15,6 ± 0,9	45,1
Experimento 2	0,5 (+)	25 (+)	1 (-)	15,9 ± 0,3	44,0
Experimento 3	0,5 (+)	25 (+)	1 (-)	15,6 ± 0,4	44,9
Média	-	-	-	15,7 ± 0,1	44,7 ± 0,6

Procedeu-se então os experimentos nestas condições, sendo o resultado experimental obtido de rendimento de remoção de lignina de $44,7 \pm 0,6$ % (média \pm desvio padrão). Com o procedimento, adotando os critérios descritos, o valor predito do rendimento de remoção de lignina é de $41,99 \pm 3,73$ % (média \pm intervalo de confiança de 95 %), confirmando-se assim a predição do modelo.

Outra forma de validação do modelo da Equação 6 pode ser feito na utilização da própria matriz de experimentos da Tabela 9, comparando os resultados previstos pela equação no Design-Expert 6.0.8 Portable e os já obtidos experimentalmente, demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Comparação dos resultados previsto com os obtidos experimentalmente

experimento	Variáveis experimentais utilizadas no pré-tratamento			Taxa de remoção de lignina	
	NaOH (mol/L)	Tempo (min)	Carregamento de sólidos (%)	Experimental (%)	Previsto (%)
1	0,1 (-1)	15 (0)	1 (-1)	10,0	11,8 \pm 2,1
2	0,5 (+1)	15 (0)	1 (-1)	27,3	29,1 \pm 2,1
3	0,1 (-1)	15 (0)	2 (+1)	18,3	11,9 \pm 2,1
4	0,5 (+1)	15 (0)	2 (+1)	30,1	29,1 \pm 2,1
5	0,1 (-1)	5 (-1)	1,5 (0)	2,6	5,1 \pm 3,7
6	0,5 (+1)	5 (-1)	1,5 (0)	15,1	16,2 \pm 3,7
7	0,1 (-1)	25 (+1)	1,5 (0)	15,5	18,6 \pm 3,7
8	0,5 (+1)	25 (+1)	1,5 (0)	40,2	42,0 \pm 3,7
9	0,3 (0)	5 (-1)	1 (-1)	12,1	10,7 \pm 2,1
10	0,3 (0)	5 (-1)	2 (+1)	10,9	10,7 \pm 2,1
11	0,3 (0)	25 (+1)	1 (-1)	32,4	30,3 \pm 2,1
12	0,3 (0)	25 (+1)	2 (+1)	31,2	30,3 \pm 2,1
13	0,3 (0)	15 (0)	1,5 (0)	22,7	20,5 \pm 1,3
14	0,3 (0)	15 (0)	1,5 (0)	20,7	20,5 \pm 1,3
15	0,3 (0)	15 (0)	1,5 (0)	21,1	20,5 \pm 1,3

Intervalo de confiabilidade nos resultados previstos do modelo em 95 % para mais ou menos.

A partir da Equação 6, foi gerada uma superfície de resposta (Figura 20), mostrando que maiores concentrações de NaOH e maior tempo proporcionam uma maior remoção de lignina, como já observado. Na figura mencionada, percebe-se que a remoção máxima de lignina, que independe do carregamento de sólidos, permanece entre 40 – 50 %

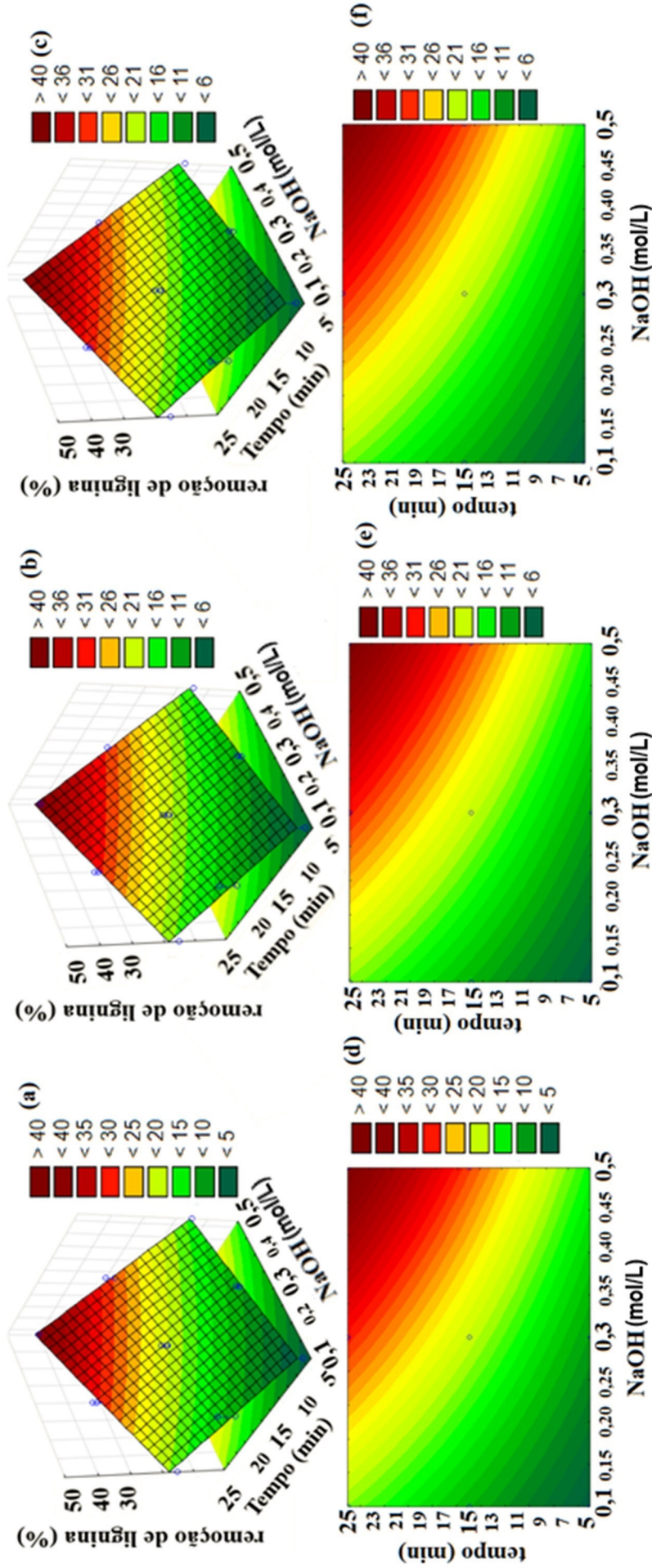


Figura 20 – Superfície de resposta e gráfico de contorno do modelo para remoção de lignina em função da concentração (mol/L) de NaOH e o tempo (em min) de pré-tratamento: (a) e (d) – carregamento de sólidos a 1,5 %; (b) e (e) – carregamento de sólidos a 1,5 % e (c) e (f) carregamento de sólidos a 2 %.

A Tabela 13 mostra os resultados obtidos em outros trabalhos que utilizaram cavitação hidrodinâmica associado ao tratamento alcalino e seus respectivos resultados de remoção de lignina predito e experimentais para tratamento de biomassa:

Tabela 13 – Comparação de tratamentos de biomassa por cavitação hidrodinâmica utilizando Orifícios de buraco

Dispositivo de cavitação hidrodinâmica	Substrato	Parâmetros	Remoção de lignina Predito*	Remoção de lignina experimental	Referência
Orifício de buracos (27) 1 mm de diâmetro	Bagaço de cana-de-açúcar	C: 0,5 mol/L NaOH S/L: 1 % T: 25 min P: 0,3mPa C: 3 % de NaOH	42 ± 3,73 %	44,7 ± 0,6 %	Este trabalho
Orifício de buracos (27) 1 mm de diâmetro	Caniço	S/L: 10 % T: 40 min P: 0,5mPa C:0,48 mol/L	N/A	42,3 %	(Kim et al., 2015)
Orifício de buracos (27) 1 mm de diâmetro	Bagaço de cana-de-açúcar	NaOH S/L: 4,27 % T: 44,48 min P: 0,3mPa C: 0,3 mol/L	59,5 ± 2,69 %	60,4 ± 2,43 %	(Terán Hilaes et al., 2016)
Orifício de buracos (16) 1 mm de diâmetro	Bagaço de cana-de-açúcar	NaOH S/L: - T: 30 min P: 0,3mPa	46,6 ± 5,26 %	51,5 ± 2,23 %	(Terán Hilaes et al., 2017)

*sob condições otimizadas do processo com valores de predição ± 95 %

C: concentração; S/L: taxa sólido/liquido; T: tempo; P: pressão; N/A: sem dados

No presente trabalho foi observado que a remoção de lignina no tempo em 25 min foi próxima ao resultado obtido por Kim et al., (2015) que utilizou 40 min de tratamento em seu processo. O resultado de remoção de lignina obtidos por Terán Hilaes et al., (2016) foram maiores quando comparado com os obtido por este estudo, embora os padrões estabelecidos fossem bem similares a este trabalho (orifício de buracos (27) 1 mm de diâmetro e próximo de 0,5 mol/L de NaOH e mesma pressão). Um dos fatores que contribui com uma maior remoção de lignina no trabalho de Terán Hilaes et al., (2016) está relacionado a um maior tempo de cavitação (19,48 min a mais do que realizado neste trabalho) e, como já demonstrado nas Figuras 18 e 19, o tempo de cavitação é determinante ao processo de deslignificação da biomassa, o que pode certamente explicar a diferença de remoção de lignina aos trabalhos comparados.

Em relação aos resultados obtidos por Terán Hilares et al., (2017), utilizando os níveis mais altos do seu estudo como concentração (0,3 mol/L NaOH), pressão (0,3mPa) e de temperatura do líquido (70 °C) houve uma diferença acentuada (9,5 % maior), quando comparados com os resultados deste trabalho, que utilizava a temperatura ambiente do líquido (25°C). De fato, como demonstrado por Terán Hilares et al., (2017), altas temperaturas tiveram um efeito significativo na cavitação hidrodinâmica para deslignificação e digestibilidade enzimática da biomassa pré-tratado. A temperatura no processo de cavitação hidrodinâmica também é mencionada como relevante, pois, favorece a formação dos radicais livres como $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{HOO}$, $\cdot\text{H}$ que degradam o material lignocelulósico e aumentam a degradabilidade catalítica do material após o tratamento (Ozonek, 2012; Carpenter et al., 2017).

Recentemente, Carneiro et al., (2019) produziu biossurfactantes a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em condições alcalinas (1 g de bagaço foram utilizados 15 mL de solução de NaOH 0,3 mol/L) utilizando autoclave a 121 °C por 60 min em uma proporção 0,18 g de NaOH/bagaço. Nestas condições, houve uma taxa de remoção de lignina de 74,7 % de lignina. Também foi observado que a proporção do hidróxido de sódio, se aumentada, tende a ter um efeito positivo na deslignificação da biomassa, assim como demonstrados neste trabalho nas Figuras 18 e 20. Apesar de uma alta taxa na deslignificação, seu processo requer condições drásticas de temperatura e tempo (121 °C e 60 min), levando à remoção de quantidades significativas de celulose e hemicelulose de 12,2 % e 34,2 %, respectivamente, diminuindo a totalidade de açúcares fermentescíveis a biomassa que seria recuperada e utilizada ao processo em FES. No experimento 8 da Tabela 9 do presente trabalho, onde encontram-se os maiores níveis de tempo de cavitação e teor de NaOH (fatores significativos de deslignificação), houve uma remoção de lignina de 40,7 % e de glucose e hemicelulose de 4,7 e 18 %, respectivamente. Apesar dos valores de remoção de lignina serem menores quando comparado aos de Carneiro et al., (2019), os valores de remoção de açúcares fermentescíveis também foram menores, podendo ser de interesse ao balanço de produtividade de biossurfactante ao processo FES que se dará posteriormente.

De modo geral, o tempo de tratamento, a concentração de NaOH e a associação entre os dois fatores citados influenciaram na deslignificação obtida a partir da cavitação hidrodinâmica associada ao NaOH. Todos eles, de forma positiva, indicando que ao se aumentar as condições do fator (na escala testada), a taxa de remoção de lignina também aumentará, tendo uma correlação direta entre a resposta (remoção de lignina) e os parâmetros citados (tempo de cavitação e concentração de NaOH). De forma igual, carregamento de sólidos (nem suas associações com outros parâmetros) tiveram influência acentuada na remoção de lignina.

5.3 Análise das propriedades tensoativas e emulsificantes dos extratos brutos contendo biossurfactante

5.3.1 Análise da tensão superficial

Para o processo de FES, foi utilizado o bagaço pré-tratado por cavitação hidrodinâmica onde houve maior remoção de lignina (0,5 mol/L, 25 min e 1 % de carregamento de sólido). A partir da FES de 14 dias (336 horas). Utilizando os extratos brutos das fermentações em estado sólido, não houve variação da tensão superficial, mantendo-se o valor de 71,3 mN/m da fermentação do dia 0 ao dia 14. Desse modo, extrato bruto contendo o biossurfactante produzido pela *Aureobasidium pullulans* LB83 não possui propriedades na diminuição da tensão superficial, embora possa emulsificar diferentes reagentes. Segundo Rahman et al., (2019), os termos “biossurfactantes” e “bioemulsificantes” são normalmente utilizados para descrever biomoléculas de superfície ativa, contudo, há diferenças entre eles. Os biossurfactantes alteram a tensão superficial e emulsionam; enquanto os bioemulsificantes não são conhecidos por terem impacto na tensão superficial. De modo geral, os bioemulsificantes possuem um peso molecular mais alto e uma mistura mais complexa que consiste em lipoproteínas e lipopolissacarídeos do que os biossurfactantes (Uzoigwe et al., 2015; Rahman et al., 2019). Embora o teste da tensão superficial utilizando o extrato bruto não tenha mostrado uma redução ao longo do tempo fermentativo, não é possível concluir com clareza de que se trata de um bioemulsificante devido à falta de testes mais conclusivos (porém que estão em andamento/planejamento) como a composição bioquímica da molécula (porcentagens de carboidratos/lipídios/proteínas), cromatografia de camada fina, espectroscopia infravermelha de transformada de Fourier, espectrometria de massa de cromatografia líquida de alto desempenho entre outros (Mujumdar et al., 2019; Twigg et al., 2021).

5.3.2 Análise do índice e estabilidade da emulsificação

Com extratos brutos da fermentação obtidos em diferentes intervalos (0, 3, 7, 9, 11 e 14 dias) foi determinado o índice de emulsificação em 24 horas (IE₂₄). Para isso, diferentes substratos hidrofóbicos foram testados para determinar o índice de emulsificação como demonstrado na Figura 21.

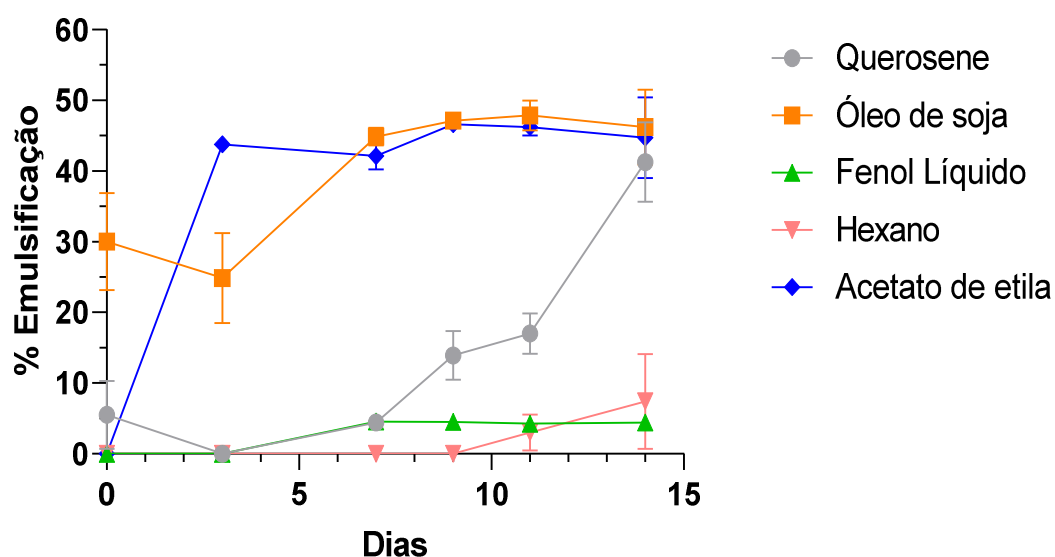


Figura 21 – Índice de emulsificação em 24 h (IE_{24}) do extrato bruto nos substratos hidrofóbicos listados em diferentes tempos de fermentação em estado sólido.

Entre os substratos hidrofóbicos, nota-se uma diminuição do IE_{24} entre o dia 0 e o dia 3 (com exceção o acetato de etila). Essa diminuição pode ser justificada pelo processo de adaptação do crescimento da levedura devido à redução da atividade da água e a regulação das enzimas para a hidrólise da nova fonte de carbono presente no meio (Hamill et al., 2020) devido a passagem do microrganismo do meio líquido para o meio sólido em FES. Também foi observado um aumento do IE_{24} do extrato bruto das fermentações do dia 3 até o dia 14 para querosene, óleo de soja, fenol líquido e hexano (Figura 22). Contudo, destacam-se o querosene e o óleo de soja, pois, a diferença dos índices de emulsificação entre o 3º dia e o 14º dia são maiores que 25 %. Os IE_{24} em acetato de etila se manteve constante (Figura 22).

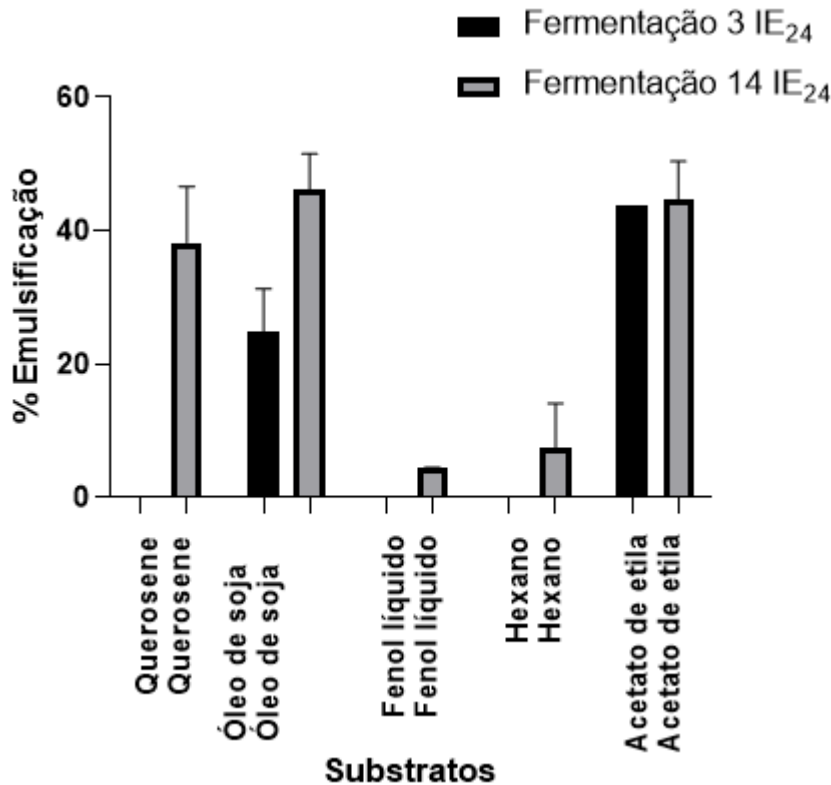


Figura 22 – Comparação entre os índices de emulsificação de 24 horas (IE₂₄) entre os extratos brutos de fermentação do 3º e 14º dia nos diferentes tipos de reagentes.

De forma similar, Kulkarni et al., (2020) produziram biossurfactante em FES pelo fungo *Pleurotus ostreatus* e obtiveram IE₂₄ de 80,9 %, 57,9 %, 43,5 % e 19,4 %, para óleo de girassol, óleo de oliva, óleo de castor e hexano, respectivamente. Também foi possível observar nos resultados de Sena et al., (2018) que o fungo de solo *Penicillium 8CC2* demonstrou um IE₂₄ de 55 % utilizando óleo de soja e 67,4 % utilizando extrato de levedura. A produção de biossurfactante por bactérias também apresentam índices de emulsificação nos diferentes substratos hidrofóbicos como demonstrados por Moraes et al., (2017), que observaram um índice de emulsificação próximo de 70 % para biossurfactante produzidos por *Lactobacillus jensenii* P6A utilizando óleo de algodão e também índices superiores de 60 % para óleos vegetais como óleo de oliva e girassol e outros reagentes de hidrocarbonetos como querosene, tolueno, hexano e xileno. Ibrahim et al., (2020), informaram que o biossurfactante produzido por *Rhodococcus erythropolis* AQ5-07 apresentou um índice emulsificação de 91,5 % com óleo de canola, assim para hidrocarbonetos como hexano, hexadecano, tetrahexadecano, tolueno e óleo diesel de 88,0, 80,7, 52,9 e 62 %, respectivamente.

Biossurfactantes e bioemulsificantes são moléculas que podem ser distinguidos com base em sua estrutura e propriedades físico-químicas. Tais estruturas e propriedades possuem um equilíbrio entre as regiões hidrofílica e hidrofóbica na molécula, conhecido como número de

equilíbrio hidrófilo-lipófilo (HLBA). A diferença de valores no índice de emulsificação obtido para os compostos hidrofóbicos testados pode ser explicada pela natureza do biossurfactante devido a que seu valor HLBA pode ser semelhante ao exigido para a emulsão em óleo soja e querosene (Figura 22). Além disso, os diferentes graus de hidrofobicidade dos reagentes pode ter influenciado no desempenho de emulsificação diferente pelo BS testado (Safek e Euston, 2019; Haidar et al., 2020). Desse modo, a Figura 22 ilustra a relação indireta entre o biossurfactante produzido ao longo do tempo por *Aureobasidium pullulans* LB83 e o índice de emulsificação (IE_{24}). Os reagentes com as propriedades emulsificantes mais notáveis foram querosene e óleo de soja.

Outra importante característica é a estabilidade da emulsão do biossurfactante. A Figura 23 indica os valores do IE_{24} do querosene e óleo de soja no 14º dia, onde as emulsificações foram maiores e do IE_{144} , que é o índice de emulsificação monitorado após o 6º dia.

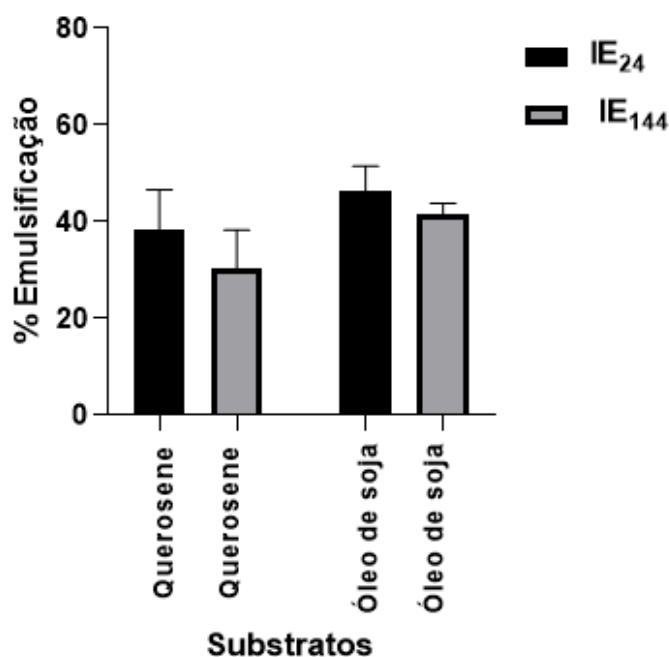


Figura 23 – Estabilidade da emulsão observada entre o primeiro (IE_{24}) e último (IE_{144}) índices de emulsificação do extrato bruto da fermentação do 14º dia em querosene e óleo de soja.

O valor do índice de emulsificação do querosene variou de 38,2 % (IE_{24}) a 30,5 % (IE_{144}), com uma estabilidade da camada de emulsificação de 80 %. No entanto, o óleo de soja variou de 46,2 % (IE_{24}) a 41,6 % (IE_{144}), mantendo uma estabilidade de 90 %. Estes resultados mostram que o biossurfactante formado mantém uma capacidade de estabilização da camada emulsificante ao longo do período observado (6 dias). Nesse sentido, Felix et al., (2019) informou que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI00 obteve uma pequena variação no índice de emulsificação após o 3º dia para gasolina, diesel, querosene n-hexadecano tolueno e heptano, indicando seu uso para lavagem de solos em produtos derivados de petróleo. Outro estudo realizado por Jarzębski et

al., (2020) demonstrou a estabilidade produzida pela saponina extraída da *Quillaja saponaria*. Utilizando 2 g/L do biossurfactante em extrato bruto, observando-se uma estabilidade de 100 % do índice de emulsificação após 24 horas para 90 % \pm 2 para o mesmo índice após 7 dias quando misturado em óleo de canola. Desse modo, os resultados deste trabalho demonstraram que o bioproducto sintetizado pela *Aureobasidium pullulans* LB83 é um biossurfactante com propriedades emulsificantes para querosene e óleo de soja, e que possui uma estabilidade de manter a emulsão por um período de até 6 dias sem muitas variações.

5.4 Análises das atividades enzimáticas

Assim, no presente estudo, as atividades das enzimas celulolíticas como endoglucanase, exoglucanase e FPase foram medidas durante 14 dias em FES para produção do biossurfactante por *A. pullulans* LB83. De forma geral, foi observado uma variação enzimática durante o período fermentativo onde houve a produção do biossurfactante como demonstrados na figura 24.

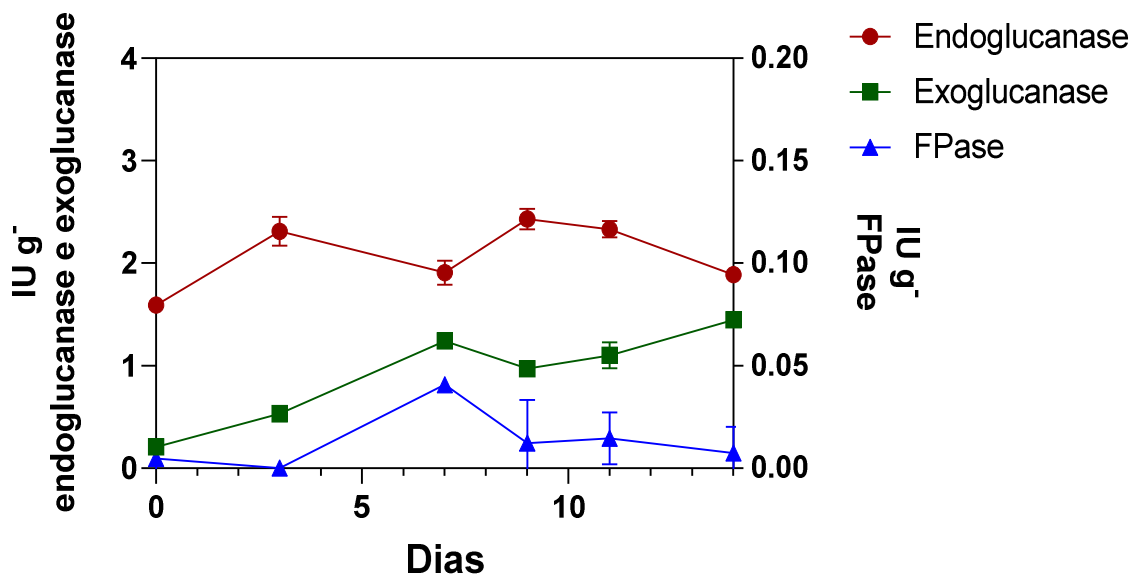


Figura 24 – Atividades enzimáticas mensuradas durante 14 dias de FES: atividades de endoglucanase e exoglucanase e atividade de FPases. Todos feitos em triplicata. Os resultados estão em unidade internacional de enzima por grama (IU.g⁻¹).

Entre as 3 enzimas ilustradas, o maior valor foi detectado para a endoglucanase, no 9º dia, com valores de $2,43 \pm 0,1$ IU.g⁻¹. Do mesmo modo, os valores máximos de exoglucanases mensurado foram $1,45 \pm 0,5$ IU.g⁻¹ ao 14º dia, ambas demonstradas na figura 24. Em relação aos resultados de FPase, os valores encontrados foram bem menores quando comparados com as outras duas enzimas. No entanto, a produção mais elevada foi observada no 7º dia com $0,041 \pm 0,003$ IU.g⁻¹

¹, como demonstrados na figura 24. A diferença entre as enzimas mensuradas endoglucanases e FPases neste trabalho também foi observada em proporções similares por Marques et al., (2018), que utilizaram fungos endofíticos para produção de enzimática utilizando FES durante 7 dias. Os autores testaram uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, e foi observado que *Colletotrichum crassipes* CSY 02 e *Paecilomyces sp.* SF 021 produziram 5,32 U.g⁻¹ e 0,08 U.g⁻¹ e 1,43 U.g⁻¹ e 0,02 U.g⁻¹ para endoglucanases e FPases, respectivamente.

Também foi possível observar um aumento das endoglucanases e exoglucanases no mesmo período onde houve diminuição do IE₂₄ (período entre o 0 e 3° dia). Esse aumento conjunto das enzimas provavelmente se deve ao período de adaptação das células ao meio sólido. O bagaço de cana-de-açúcar contém açúcares fermentescíveis que estimulam o crescimento celular. Além disso, a síntese de metabólitos e enzimas celulolíticas pode ocorrer devido à necessidade dos microrganismos metabolizarem compostos dificilmente degradáveis (Velioglu, Ozturk Urek, 2014) e da regulação de enzimas para consumo da nova fonte de carbono presente no meio (Hamill et al., 2020). Nesse sentido, os resultados enzimáticos encontrados indicaram que tendo apenas o bagaço de cana-de-açúcar como suporte e fonte de carbono no meio de cultura, a *Aureobasidium pullulans* LB83 produziu enzimas hidrolíticas, como as celulasas.

Baseando-se nas evidências expostas até o presente momento, é possível inferir que o aumento da atividade enzimática observada favoreceu o crescimento celular e a produção de biossurfactante, analisado indiretamente pelo aumento de IE₂₄ ao longo da FES (Figura 21). Ainda que produção enzimática tenha mostrado variações, diferentemente do IE₂₄, a proposta de mensurar estas enzimas foi elucidar o comportamento enzimático da *Aureobasidium pullulans* LB83 frente ao bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono disponível ao meio. Assim, foi demonstrado que o aumento da quantidade das enzimas hidrolíticas testadas no último dia de fermentação (14° dia) quando comparadas com o tempo 0, são provenientes da necessidade metabólica do microrganismo de utilizar o bagaço de cana-de-açúcar como suporte e substrato. Outra vantagem na utilização da *Aureobasidium pullulans* LB83 é a transformação direta do bagaço de cana-de-açúcar em biossurfactante sem a necessidade de processos de hidrólise, como feito por Marcelino et al., (2017) utilizando *Scheffersomyces stipitis*, diminuindo o número de operações unitárias que compõe o processo e reforçando a possibilidade de utilização da *A. pullulans* LB83 no contexto de biorrefinarias.

6 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos permitem concluir que a cavitação hidrodinâmica associada a solução alcalina reduz a quantidade de lignina presente na biomassa lignocelulósica, facilitando a hidrólise das outras frações de polissacarídeos disponíveis no bagaço de cana-de-açúcar pela *Aureobasidium pullulans* LB83;
- A *Aureobasidium pullulans* LB83 produziu biossurfactante em FES utilizando bagaço pré-tratado por cavitação hidrodinâmica como fonte de carbono;
- A *Aureobasidium pullulans* LB83 demonstrou ter uma atividade enzimática de endoglucanases, exoglucanases e FPases relevantes nas FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado;
- O biossurfactante produzido por *Aureobasidium pullulans* LB83 em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica exibiu uma destacada atividade emulsificante em substratos com diferentes polaridades e uma estabilidade da camada emulsificante nos dias observados.

REFERÊNCIAS

- Abdala Neto, E. F., Aquino, M. D., Ribeiro, J. P., Vidal, C. B., Nascimento, R. F. do, Sousa, F. W. de. (2014). O uso da cavitação hidrodinâmica aplicado ao tratamento de água. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 19(2), 105–112. <https://doi.org/10.1590/s1413-41522014000200001>
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1–3), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.198>
- Ahuekwe, E., Okoli, B., Stanley, O., Kinigoma, B. (2016). Experimental Investigation of Sophorolipid Biosurfactants Produced by *Candida* and *Pleurotus* Species Using Waste Oils and Rice Bran and Their Oilfield Benefits. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 7(4), 1–15. <https://doi.org/10.9734/jabb/2016/27467>
- Akpınar, M., Urek, R. O. (2012). Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation using *pleurotus eryngii*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(6), 582–597. <https://doi.org/10.1080/10826068.2012.673528>
- Akram, M., Anwar, S., Bhat, I. A., Kabir-ud-Din. (2018). Exploration of ibuprofen binding with micellar assemblies of the efficiently-engineered gemini surfactants: Insights from spectroscopic and voltammetric studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 555, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.06.057>
- Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., Joshi, S. J., Al-Makhmari, H. S., Al-Sulaimani, H. S. (2013). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 81, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.006>
- Amézcuca-Vega, C., Poggi-Varaldo, H. M., Esparza-García, F., Ríos-Leal, E., Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresource Technology*, 98(1), 237–240. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.025>
- Andrade, R. F., Antunes, A. A., Lima, R. A., Araújo, H., Resende-Stoianoff, M. A., Franco, L. O., Campos-Takaki, G. M. (2015). Enhanced production of an glycolipid biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP/WFCC1556 for application in dispersion and removal of petroderivatives. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 4(7), 563–576.
- Arpita Roy. (2017). *A Review on the Biosurfactants : Properties , Types and its Applications*. 8(1), 1–5. <https://doi.org/10.4172/20904541.1000248>
- Arrojo, S., Benito, Y. (2008). A theoretical study of hydrodynamic cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(3), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.03.007>
- Ascencio, J. J., Chandel, A. K., Philippini, R. R., da Silva, S. S. (2019). Comparative study of

cellulosic sugars production from sugarcane bagasse after dilute nitric acid, dilute sodium hydroxide and sequential nitric acid-sodium hydroxide pretreatment. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00547-6>

- Asgher, M., Arshad, S., Qamar, S. A., Khalid, N. (2020). Improved biosurfactant production from *Aspergillus niger* through chemical mutagenesis: characterization and RSM optimization. *SN Applied Sciences*, 2(5), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2783-3>
- Axelsson, L., Franzén, M., Ostwald, M., Berndes, G., Lakshmi, G., Ravindranath, N. H. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Badve, M. P., Gogate, P. R., Pandit, A. B., Csoka, L. (2014). Hydrodynamic cavitation as a novel approach for delignification of wheat straw for paper manufacturing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.07.006>
- Bahia, F. M., De Almeida, G. C., De Andrade, L. P., Campos, C. G., Queiroz, L. R., Da Silva, R. L. V., Abdelnur, P. V., Corrêa, J. R., Bettiga, M., Parachin, N. S. (2018). Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21230-2>
- Bashir, T. A., Soni, A. G., Mahulkar, A. V., Pandit, A. B. (2011). The CFD driven optimisation of a modified venturi for cavitation activity. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89(6), 1366–1375. <https://doi.org/10.1002/cjce.20500>
- Baxi, P. B., Pandit, A. B. (2012). Using cavitation for delignification of wood. *Bioresource Technology*, 110, 697–700. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.042>
- Bhattacharya, B., Ghosh, T. K., Das, N. (2017). *Application of Bio-Surfactants in Cosmetics and Pharmaceutical Industry*. 6(7), 320–329. <https://doi.org/10.21276/sajp>
- Bryan, J., Kantzas, A. (2007). *Enhanced Heavy - Oil Recovery by Alkali-Surfactant Flooding*.
- Buenrostro-Figueroa, J. J., Velázquez, M., Flores-Ortega, O., Ascacio-Valdés, J. A., Huerta-Ochoa, S., Aguilar, C. N., Prado-Barragán, L. A. (2017). Solid state fermentation of fig (*Ficus carica* L.) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. *Process Biochemistry*, 62, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.016>
- Cameotra, S. S., Makkar, R. S., Kaur, J., Mehta, S. K. (2010). *Synthesis of Biosurfactants and Their Advantages to Microorganisms and Mankind*.
- Camerini, F. V., Chanin, C. do A., Borba, C. M., Costa, J. A. V., Burkert, C. A. V., Burkert, J. F. de M. (2019). Biosurfactant production by *Phialemonium* sp. using agroindustrial wastes:

- Influence of culture conditions. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 41(1), 1–7. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v41i1.43484>
- Cameron, D. R., Cooper, D. G., Neufeld, R. O. N. J. (1988). *The Mannoprotein of Saccharomyces cerevisiae Is an Effective Bioemulsifier*. 54(6), 1420–1425.
- Camilios-Neto, D., Bugay, C., De Santana-Filho, A. P., Joslin, T., De Souza, L. M., Sasaki, G. L., Mitchell, D. A., Krieger, N. (2011). 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*, 89(5), 1395–1403. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2987-3>
- Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., Banat, I. M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*, 29(5), 1097–1108. <https://doi.org/10.1002/btpr.1796>
- Canilha, L., Chandel, A. K., Suzane Dos Santos Milessi, T., Antunes, F. A. F., Luiz Da Costa Freitas, W., Das Graças Almeida Felipe, M., Da Silva, S. S. (2012). Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/989572>
- Canilha, L., Santos, V. T. O., Rocha, G. J. M., Almeida E Silva, J. B., Giulietti, M., Silva, S. S., Felipe, M. G. A., Ferraz, A., Milagres, A. M. F., Carvalho, W. (2011). A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1467–1475. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0931-2>
- Carla, A., Nunes, P., Alves, T., Fontenele, R., Andrade, S., Maria, G., Takaki, C. (2018). Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Agricultural Microbiology*, 1–12. <https://doi.org/10.1590/1808>
- Carneiro, B. C. Conversão de bagaço de cana-de-açúcar em biossurfactante por *Aureobasidium pullulans LB83* utilizando fermentação em estado sólido Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2019.
- Carpenter, J., Badve, M., Rajoriya, S., George, S., Saharan, V. K., Pandit, A. B. (2017). Hydrodynamic cavitation: An emerging technology for the intensification of various chemical and physical processes in a chemical process industry. *Reviews in Chemical Engineering*, 33(5), 433–468. <https://doi.org/10.1515/revce-2016-0032>
- Casas, A. (1999). *Sophorolipid Production by Candida bombicola: Medium Composition and Culture Methods*. 88(5), 488–494.
- Castiglioni, G. L., Bertolin, T. E., Costa, J. A. V. (2009). Produção de biossurfactante por

aspergillus fumigatus utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Quimica Nova*, 32(2), 292–295. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200005>

- Castiglioni, G. L., Stanescu, G., Rocha, L. A. O., Costa, J. A. V. (2014). Modelagem analítica e otimização numérica da produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigatus* em fermentação sólida. *Acta Scientiarum - Technology*, 36(1), 61–67. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v36i1.17818>
- Cavalero, A., Cooper, G. (2003). *The effect of medium composition on the structure and physical state of sphorolipids produced by Candida bombicola ATCC 22214*. 103, 31–41. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00067-1)
- Chan, G. F., Puad, M. S. A., Chin, C. F., Rashid, N. A. A. (2011). Emergence of *Aureobasidium pullulans* as human fungal pathogen and molecular assay for future medical diagnosis. *Folia Microbiologica*, 56(5), 459–467. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0070-9>
- Chaprão, M. J., Ferreira, I. N. S., Correa, P. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Silva, E. J., Sarubbo, L. A. (2015). Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.005>
- Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., Sayadi, S., Chamkha, M., Banat, I. M. (2017). Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *Journal of Basic Microbiology*, 57(5), 364–375. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600658>
- Chegenizadeh Negin, Saeedi Ali, Q. X. (2017). *Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery* (p. 14).
- Chen, H., Wang, L. (2017). Microbial Fermentation Strategies for Biomass Conversion. In *Technologies for Biochemical Conversion of Biomass* (pp. 165–196). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802417-1.00007-7>
- Chen, W., Juang, R., Wei, Y. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>
- Cirigliano, M. C., Carman, G. M. (1985). Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 846–850. <https://doi.org/10.1128/aem.50.4.846-850.1985>
- Coimbra, C. D., Rufino, R. D., Luna, J. M., Sarubbo, L. A. (2009). Studies of the cell surface properties of candida species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. *Current Microbiology*, 58(3), 245–251. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9315->

- Companhia Nacional de Abastecimento - (CONAB). (2021). Acompanhamento da Safra Brasileira - CANA-DE-AÇUCAR. *Observatório Agrícola*, 2(4), 1–60.
- Costa, J. A. V., Treichel, H., Kumar, V., Pandey, A. (2017). Advances in Solid-State Fermentation. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00001-3>
- Costa, J. A. V., Treichel, H., Santos, L. O., Martins, V. G. (2018). Solid-State Fermentation for the Production of Biosurfactants and Their Applications. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 357–372). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00016-5>
- Das, K., Mukherjee, A. K. (2007). Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, 42(8), 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.05.011>
- de Oliveira Rodrigues, P., Gurgel, L. V. A., Pasquini, D., Badotti, F., Góes-Neto, A., Baffi, M. A. (2020). Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. *Renewable Energy*, 145, 2683–2693. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>
- Doltade, S. B., Dastane, G. G., Jadhav, N. L., Pandit, A. B., Pinjari, D. V., Somkuwar, N., Paswan, R. (2019). Hydrodynamic cavitation as an imperative technology for the treatment of petroleum refinery effluent. *Journal of Water Process Engineering*, 29(January), 100768. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.02.008>
- Doriya, K., Jose, N., Gowda, M., Kumar, D. S. (2016). Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 78). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.003>
- Dos Santos, M. L., De Lima, O. J., Nassar, E. J., Ciuffi, K. J., Calefi, P. S. (2011). Study of the storage conditions of the sugarcane bagasse through thermal analysis. *Quimica Nova*, 34(3), 507–511. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000300024>
- Edy Susanto, M. (2019). Applications of surfactants in pharmaceutical formulation development of conventional and advanced delivery systems. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- El-Housseiny, G. S., Aboshanab, K. M., Aboulwafa, M. M., Hassouna, N. A. (2019). Rhamnolipid production by a gamma ray-induced *Pseudomonas aeruginosa* mutant under solid state fermentation. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0732-y>
- Ezeonu, C. S., Siman, A. (2020). Biosurfactant quality generated from fungi using agro-wastes (

maize husk , rice husk , and sugarcane bagasse). *13*(2), 46–57.

- Farinas, C. S. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *52*, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>
- Felipe, L. D. O., Dias, S. D. C. (2017). Surfactantes sintéticos e biossurfactantes : vantagens e desvantagens. *Química Nova Na Escola*, *39*(3), 228–236. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160079>
- Gautam, K. ., Tyagi, V. K. (2006). *Microbial Surfactants : A Review*. *55*(4), 155–166.
- Ghribi, D., Abdelkefi-Mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Saadaoui, I., Maktouf, S., Chaabouni-Ellouze, S. (2012). Investigation of antimicrobial activity and statistical optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production in solid-state fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/373682>
- Giri, S. S., Ryu, E. C., Sukumaran, V., Park, S. C. (2019). Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. *Microbial Pathogenesis*, *132*, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.035>
- Gogate, P. R. (2011). Hydrodynamic Cavitation for Food and Water Processing. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(6), 996–1011. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0418-1>
- Gogate, P. R., Kabadi, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, *44*(1), 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.006>
- Gogate, P. R., Pandit, A. B. (2005). A review and assessment of hydrodynamic cavitation as a technology for the future. *Ultrasonics Sonochemistry*, *12*(1-2 SPEC. ISS.), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.03.007>
- Gole, V. L., Naveen, K. R., Gogate, P. R. (2013). Hydrodynamic cavitation as an efficient approach for intensification of synthesis of methyl esters from sustainable feedstock. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *71*, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.10.006>
- Gomes, M. G., Gurgel, L. V. A., Baffi, M. A., Pasquini, D. (2020). Pretreatment of sugarcane bagasse using citric acid and its use in enzymatic hydrolysis. *Renewable Energy*, *157*, 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.002>
- Gomes, S. (2015). *Cavitação hidrodinâmica para tratamento de águas*. 77.
- Gong, Z., He, Q., Che, C., Liu, J., Yang, G. (2020). Optimization and scale-up of the production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state fermentation using high-density polyurethane foam as an inert support. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *43*(3), 385–

392. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02234-2>

- Gugulothu, S. K., Kumar, P. R. V., Deekshith, P. (2012). Exploring cavitating phenomenon with and without ultrasonic transducer. *Procedia Engineering*, 38, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.06.022>
- Gusmão, C. A. B., Rufino, R. D., Sarubbo, L. A. (2010). Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(9), 1683–1692. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0346-2>
- Haidar, C. N., Pereira, M. M., Lima, Á. S., Nerli, B. B., Malpiedi, L. P. (2020). Biosurfactants produced by *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*: A versatile mixture with interesting emulsifying properties. *Process Biochemistry*, 97(May), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.010>
- Hamill, P. G., Stevenson, A., McMullan, P. E., Williams, J. P., Lewis, A. D. R., Sudharsan, S., Stevenson, K. E., Farnsworth, K. D., Khroustalyova, G., Takemoto, J. Y., Quinn, J. P., Rapoport, A., Hallsworth, J. E. (2020). Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Scientific Reports*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>
- Hassanshahian, M. (2014). Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Marine Pollution Bulletin*, 86(1–2), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.043>
- Heyd, M. (2009). *Continuous production of rhamnolipids by means of process integration*.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hidalgo, A., Cruz, A. (2017). Pulmonary Surfactant and Nanocarriers: Toxicity Versus Combined Nanomedical Applications. *BBA - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.019>
- Hidalgo, A., Cruz, A., Pérez-gil, J. (2015). Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 95, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.014>
- Hommel, R. K., Weber, L., Weiss, A., Himmelreich, U., O.Rilke, H.P.kleber. (1994). Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. *Journal of Biotechnology*, 33, 147–155.

- Hongzhang, C., Hongqiang, L., Liying, L. (2011). The inhomogeneity of corn stover and its effects on bioconversion. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1940–1945. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.037>
- Hu, Y., Piao, C., Chen, Y., Zhou, Y., Wang, D., Yu, H., Xu, B. (2019). Soybean residue (okara) fermentation with the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Food Bioscience*, 31, 100439. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100439>
- Ibrahim, S., Khalil, K. A., Nabilah, K., Zahri, M., Gomez-fuentes, C., Convey, P., Zulkharnain, A., Sabri, S., Alias, S. A., Gonz, G., Ahmad, S. A. (2020). *Biosurfactant Production and Growth Kinetics Studies of the Waste Canola Oil-Degrading Bacterium*.
- Imura, T., Kitamoto, A. D. (2007). Characterization of new glycolipid biosurfactants, tri-acylated mannosylerythritol lipids, produced by *Pseudozyma* yeasts. *Biotechnology Letters*, 1111–1118. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9363-0>
- IndustryARC. (2019). *Surfactants Market Overview: Furion Analytics Research Consulting LLP*.
- Inès, M., Dhouha, G. (2015). *Lipopeptides Biosurfactants, Main Classes and New Insights for Industrial; Biomedical and Environmental Applications*. 1–57. <https://doi.org/10.1002/bip>
- Intasit, R., Cheirsilp, B., Louhasakul, Y., Boonsawang, P., Chaiprapat, S., Yeesang, J. (2020). Valorization of palm biomass wastes for biodiesel feedstock and clean solid biofuel through non-sterile repeated solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 298, 122551. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122551>
- Izabel Cristina Barbosa Anghinetti. (2012). *Tintas, Suas Propriedades E Aplicações Imobiliárias*.
- Jain, R. M., Mody, K., Joshi, N., Mishra, A., Jha, B. (2013). Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.030>
- Janusz Ozonек. (2012). *Application of Hydrodynamic Cavitation in Environmental Engineering* (1st Editio). CRC Press.
- Jarzębski, M., Siejak, P., Smulek, W., Fathordoobady, F., Guo, Y., Pawlicz, J., Trzeciak, T., Kowalczewski, P. Ł., Kitts, D. D., Singh, A., Singh, A. P. (2020). Plant extracts containing saponins affects the stability and biological activity of hempseed oil emulsion system. *Molecules*, 25(11), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules25112696>
- Jiménez-Peñalver, P., Castillejos, M., Koh, A., Gross, R., Sánchez, A., Font, X., Gea, T. (2018). Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. *Journal of Cleaner Production*, 172, 2735–2747. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.138>

- Jiménez-Peñalver, P., Gea, T., Sánchez, A., Font, X. (2016). Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochemical Engineering Journal*, 115, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.08.006>
- Joshi, S. M., Gogate, P. R. (2019). Intensification of industrial wastewater treatment using hydrodynamic cavitation combined with advanced oxidation at operating capacity of 70 L. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52(December 2018), 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.016>
- Journal, B. (2012). *Biosurfactants Production By Yeasts Using Soybean Oil and Glycerol As Low Cost*. 55, 116–125.
- Kakugawa, K. (2014). Isolation of Yeast *Kurtzmanomyces* sp . I-11 , Novel Producer of Mannosylerythritol Lipid Isolation of Yeast *Kurtzmanomyces* sp . I-11 , Novel Producer of Mannosylerythritol Lipid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, November 2014, 37–41. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.188>
- Khan, M. N., Mohammad, F. (2014). *Eutrophication: Challenges and Solutions*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7814-6>
- Kim, H., Jeon, J., Kim, B., Ahn, C., Oh, H., Yoon, B. (2006). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant , mannosylerythritol lipid , by *Candida* sp . SY16 using fed-batch fermentation. *Biotechnological products and process engineering*, 391–396. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0092-9>
- Kim, H., Jeon, J., Kim, S., Oh, H., Kwon, T., Yoon, B. (2002). Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant , mannosylerythritol lipid , from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, 3, 1637–1641.
- Kim, I., Lee, I., Jeon, S. H., Hwang, T., Han, J. I. (2015). Hydrodynamic cavitation as a novel pretreatment approach for bioethanol production from reed. *Bioresource Technology*, 192, 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.038>
- Kim, J. S., Lee, I. K., Kim, D. W., Yun, B. S. (2016). Aureosurfactin and 3-deoxyaureosurfactin, novel biosurfactants produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY. *Journal of Antibiotics*, 69(10), 759–761. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.141>
- Kiran, G. Seghal, Thomas, T. A., Selvin, J. (2010). Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78(1), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.01.028>
- Kiran, George S., Nishanth, L. A., Priyadharshini, S., Anitha, K., Selvin, J. (2014). Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardiopsis* sp. MSA13A. *BMC Biotechnology*, 14(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-48>

- Kitamoto, D., Ikegami, T., Suzuki, G. T., Sasaki, A., Takeyama, Y., Idemoto, Y., Koura, N., Yanagishita, H. (2001). *Microbial conversion of n -alkanes into glycolipid biosurfactants , mannosylerythritol lipids , by Pseudozyma (Candida antarctica)*. 1709–1714.
- Koh, A., Linhardt, R. J., Gross, R. (2016). Effect of Sophorolipid n-Alkyl Ester Chain Length on Its Interfacial Properties at the Almond Oil-Water Interface. *Langmuir*, 32(22), 5562–5572. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01008>
- Konishi, M., Fukuoka, T., Morita, T., Imura, T. (2008). Production of New Types of Sophorolipids by *Candida batistae*. *Journal of Oleo Science*, 369(6), 359–369.
- Kralova, I., Sjöblom, J. (2009). Surfactants used in food industry: A review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363–1383. <https://doi.org/10.1080/01932690902735561>
- Krieger, N., Neto, D. C., Mitchell, D. A. (2010). Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672, 203–210. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_15
- Kulakovskaya, E., Kulakovskaya, T. (2014). Extracellular Glycolipids of Yeasts Biodiversity, Biochemistry, and Prospects. In *Structure and Occurrence of Yeast Extracellular Glycolipids* (pp. 1–13). Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420069-2.00001-7>
- kulkarni, S. S., Nene, S. N., Joshi, K. S. (2020). A comparative study of production of hydrophobin like proteins (HYD-LPs) in submerged liquid and solid state fermentation from white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101440>
- Kumar, C. G., Pombala, S. (2018). Process for the preparation of polymeric biosurfactants (Patent No. US 10,106,627 B2). <https://patentimages.storage.googleapis.com/4e/a7/dc/e12b928efa116e/US10106627.pdf>
- Kurosawa, T., Sakaia, K., Nakaharaa, T., Oshimaab, Y., Tabuchab, T. (1994). Extracellular Accumulation of the Polyol Lipids, 3,5- Dihydroxydecanoyl and 5-Hydroxy-2-decenoyl Esters of Arabitol and Mannitol, by *Aureobasidium* sp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, November 2014, 37–41. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.2057>
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B. (2010). *Rhodococcus Biosurfactants : Biosynthesis , Properties , and Potential Applications*. 291–313. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12937-7>
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: Characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 124(1–3), 1081–1099. <https://doi.org/10.1385/ABAB:124:1-3:1081>

- Laurier L. Schramm. (2005). *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*.
- Liu, H., Sun, Y., Zhang, H., Wang, J., Wei, J. (2019). Hydrodynamic cavitation enhanced biosynthesis of silver nanoparticles at room temperature and its mechanism. *Materials Letters*, 236, 387–389. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.10.103>
- Liu, Y., Koh, C. M. J., Ji, L. (2011). Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresource Technology*, 102(4), 3927–3933. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.115>
- Lizardi-Jiménez, M. A., Hernández-Martínez, R. (2017). Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, 7(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y>
- Lomthong, T., Yoksan, R., Lumyong, S., Kitpreechavanich, V. (2020). Poly(l-lactide)-Degrading Enzyme Production by *Laceyella sacchari* LP175 Under Solid State Fermentation Using Low Cost Agricultural Crops and Its Hydrolysis of Poly(l-lactide) Film. *Waste and Biomass Valorization*, 11(5), 1961–1970. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0519-z>
- Lotfabad, T. B., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R., Adelzadeh, M. R., Noghabi, K. A. (2009). An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.11.018>
- Lukondeh, T., Ashbolt, N. J., Rogers, P. L. (2003). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as a source of yeast autolysates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 52–56. <https://doi.org/10.1007/s10295-002-0008-y>
- Maddikeri, G. L., Gogate, P. R., Pandit, A. B. (2015). Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 263, 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.11.010>
- Madison, M. J., Coward-Kelly, G., Liang, C., Karim, M. N., Falls, M., Holtzapple, M. T. (2017). Mechanical pretreatment of biomass – Part I: Acoustic and hydrodynamic cavitation. *Biomass and Bioenergy*, 98, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.007>
- Mahulkar, A., Pandit, A. (2010). *Analysis of Hydrodynamic and Acoustic Cavitation reactors: Numerical and experimental analysis, applications, operations and scale-up*. VDM Verlag Dr. Müller.
- Manan, M. A., Webb, C. (2017). Modern microbial solid state fermentation technology for future biorefineries for the production of added-value products. *Biofuel Research Journal*, 4(4), 730–740. <https://doi.org/10.18331/BRJ2017.4.4.5>
- Manitchotpisit, P., Price, N. P. J., Leathers, T. D., Punnapayak, H. (2011). Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 33(6), 1151–1157.

<https://doi.org/10.1007/s10529-011-0548-1>

- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 285, 419–435. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.009>
- Marcelino, P. R. F. Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.2016. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena , Lorena, 2016.
- Marcelino, P. R.F., Peres, G. F. D., Terán-Hilares, R., Pagnocca, F. C., Rosa, C. A., Lacerda, T. M., dos Santos, J. C., da Silva, S. S. (2019). Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. *Industrial Crops and Products*, 129(December 2018), 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.001>
- Marcelino, P. R. F., Silva, V. L. da, Philippini, R. R., Zuben, C. J. Von, Contiero, J., Santos, J. C. dos, da Silva, S. S. (2017). Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases. *PLoS ONE*, 1–16.
- Marques, N. P., de Cassia Pereira, J., Gomes, E., da Silva, R., Araújo, A. R., Ferreira, H., Rodrigues, A., Dussán, K. J., Bocchini, D. A. (2018). Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 122(March 2017), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>
- Martins, V. G., Kalil, S. J., Bertolin, T. E., Costa, J. A. V. (2006). Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 61(9–10), 721–726.
- Melnichuk, N., Braia, M. J., Anselmi, P. A., Meini, M. R., Romanini, D. (2020). Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, 106, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>
- Mnif, I., Chaabouni, S. E., Ghribi, D. (2017). Glycolipid Biosurfactants , Main Classes , Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. *Journal of Polymers and the Environment*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1076-4>
- Mnif, I., Elleuch, M., Chaabouni, S. E., Ghribi, D. (2013). *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant: Production optimization and insecticidal activity against the carob moth *Ectomyelois ceratoniae*. *Crop Protection*, 50, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.03.005>

- Mnif, I., Ghribi, D. (2016). Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4310–4320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>
- Monteiro, A. S., Coutinho, J. O. P. A., Júnior, A. C., Rosa, C. A., Siqueira, E. P., Santos, V. L. (2009). Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. *Journal of Basic Microbiology*, 49(6), 553–563. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900089>
- Morais, I. M. C., Cordeiro, A. L., Teixeira, G. S., Domingues, V. S., Nardi, R. M. D., Monteiro, A. S., Alves, R. J., Siqueira, E. P., Santos, V. L. (2017). Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P6A and *Lactobacillus gasseri* P65. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0769-7>
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, H. K. (2007). Characterization of the genus *Pseudozyma* by the formation of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. 34, 286–292. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00154.x>
- Moshtagh, B., Hawboldt, K., Zhang, B. (2019). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus Subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 40(25), 3371–3380. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1473502>
- Moussa, T. A. A., Ahmed, G. M., Abdel-hamid, S. M.-S. (2014). Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.004>
- Mujumdar, S., Joshi, P., Karve, N. (2019). Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: A review. *Journal of Basic Microbiology*, 59(3), 277–287. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800364>
- Nakama, Y. (2017). Surfactants. In *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X>
- Nakashima, K., Ebi, Y., Shibasaki-Kitakawa, N., Soyama, H., Yonemoto, T. (2016). Hydrodynamic Cavitation Reactor for Efficient Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 55(7), 1866–1871. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b04375>
- Nalini, S., Parthasarathi, R. (2014). Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. *Bioresource Technology*, 173, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.051>
- Neta, N. S., Teixeira, J. A., Rodrigues, L. R. (2015). Sugar Ester Surfactants: Enzymatic Synthesis and Applications in Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(5), 595–610. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.667461>

- Nitschke, M., Pastore, G. M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97(2), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.044>
- Felix, A. K. N., Martins, J. J. L., Lima Almeida, J. G., Giro, M. E. A., Cavalcante, K. F., Maciel Melo, V. M., Loiola Pessoa, O. D., Ponte Rocha, M. V., Rocha Barros Gonçalves, L., Saraiva de Santiago Aguiar, R. (2019). Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175(July 2018), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>
- Noorimotlagh, Z., Kazeminezhad, I., Jaafarzadeh, N., Ahmadi, M., Ramezani, Z. (2019). Improved performance of immobilized TiO₂ under visible light for the commercial surfactant degradation: Role of carbon doped TiO₂ and anatase/rutile ratio. *Catalysis Today*, August, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.08.051>
- Olkowska, E., Namie, J. (2011). *Analytics of Surfactants in the Environment: Problems and Challenges*. 5667–5700.
- Özcan, A., Ömeroğlu, Ç., Erdoğan, Y., Özcan, A. S. (2007). Modification of bentonite with a cationic surfactant: An adsorption study of textile dye Reactive Blue 19. *Journal of Hazardous Materials*, 140(1–2), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.138>
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., Tosetto, A. (2016). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Pandit, A. B. (2016). *Hydrodynamic Cavitation Technology: Industrial Applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0119-2>
- Panjiar, N., Mattam, A. J., Jose, S., Gandham, S., Velankar, H. R. (2020). Valorization of xylose-rich hydrolysate from rice straw, an agroresidue, through biosurfactant production by the soil bacterium *Serratia nematodiphila*. *Science of the Total Environment*, 729, 138933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138933>
- Parekh, V. J., Pandit, A. B. (2011). Optimization of fermentative production of sophorolipid biosurfactant by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 using response surface methodology. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(3), 1–14. http://ijpbs.com/ijpbsadmin/upload/ijpbs_50c8274e7e41a.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/641F92B7-EB60-48F6-B675-4FF796615345
- Paria, S. (2008). Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances*

- in *Colloid and Interface Science*, 138(1), 24–58. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.11.001>
- Brumano, L.P (2017). *Produção de biosurfactante por levedura utilizando fermentação em estado sólido em bagaço de cana-de-açúcar*. 162.
- Pirog, T. P., Konon, A. D., Shevchuk, T. A., Bilets, I. V. (2012). *Intensification of Biosurfactant Synthesis by Acinetobacter calcoaceticus IMV B 7241 on a Hexadecane – Glycerol Mixture*. 81(5), 565–572. <https://doi.org/10.1134/S0026261712050128>
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., Punnapayak, H. (2018). The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiologica*, 63(2), 129–140. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0561-4>
- Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V., Karanth, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 127–135. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00125-0)
- Rahman, P. K. S. M., Mayat, A., Harvey, J. G. H., Randhawa, K. S., Relph, L. E., Armstrong, M. C. (2019). Biosurfactants and Bioemulsifiers from Marine Algae. *The Role of Microalgae in Wastewater Treatment*, 169–188. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2_13
- Ramisetty, K. A., Pandit, A. B., Gogate, P. R. (2014). Novel approach of producing oil in water emulsion using hydrodynamic cavitation reactor. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(42), 16508–16515. <https://doi.org/10.1021/ie502753d>
- Rau, U., Nguyen, L. A., Roeper, H., Koch, H., Lang, S. (2005). *Downstream processing of mannosylerythritol lipids produced by Pseudozyma aphidis*. 107, 373–380. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200401122>
- Raut-Jadhav, S., Saini, D., Sonawane, S., Pandit, A. (2015). Effect of process intensifying parameters on the hydrodynamic cavitation based degradation of commercial pesticide (methomyl) in the aqueous solution. *Ultrasonics Sonochemistry*, 28, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.08.004>
- Ravindran, R., Jaiswal, A. K. (2016). A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 199, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>
- Rebello, S., Asok, A. K., Mundayoor, S., Jisha, M. S. (2014). Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. 275–287. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0466-2>
- Research and Markets. (2019). *Surfactants - A Global Market Overview*.
- Rodríguez, A., Gea, T., Sánchez, A., Font, X. (2020). Agro-wastes and Inert Materials as Supports for the Production of Biosurfactants by Solid-state Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01148-5>
- Rosen, M. J., Kunjappu, J. T. (2012). Characteristic Features of Surfactants. *Surfactants and*

- Interfacial Phenomena*, 1–38. <https://doi.org/10.1002/9781118228920.ch1>
- Rosenberg, M. E. (1999). *High- and low-molecular-mass microbial surfactants*. 154–162.
- Ruiz, C. C. (2008). *Sugar-Based Surfactants*. Boca Raton. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781420051674>
- Ostroumov, S. A. *Biological Effects of Surfactants*; CRC Press/ Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, 2005.
- Sachdev, D. P., Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1005–1016. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>
- Saerens, K. M. J., Derycke, T., Li, B., Lin, Y., Peer, Y. Van De, Maeseire, S. L. De, Bogaert, I. N. A. Van, Soetaert, W. (2013). *Candida bombicota as a platform organism for the production of tailor-made biomolecules*. <https://doi.org/10.1002/bit.24895>
- Saharan, B. S., Sahu, R. K., Sharma, D. (2012). A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011, 1–14.
- Saharan, V. K., Rizwani, M. A., Malani, A. A., Pandit, A. B. (2013). Effect of geometry of hydrodynamically cavitating device on degradation of orange-G. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.08.011>
- Sajna, K. V., Höfer, R., Sukumaran, R. K., Devi, L. (2015). White Biotechnology in Biosurfactants. In *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00016-1>
- Sašek, K., Euston, S. R. (2019). Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochemistry*, 85(July), 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.027>
- Salve, A. R., Pegu, K., Arya, S. S. (2019). Comparative assessment of high-intensity ultrasound and hydrodynamic cavitation processing on physico-chemical properties and microbial inactivation of peanut milk. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59(June), 104728. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104728>
- Sanches, M., Santos, R., Cortez, A., Mariner, R., Souza, J. (2018). Biosurfactant Production by *Fusarium oxysporum* LM 5634 Using Peels from the fruit of *Bactris gasipaes* (Kunth) as Substrate. *Biotechnology Journal International*, 21(1), 1–9. <https://doi.org/10.9734/bji/2018/39405>
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Sarubbo, L. A. (2016). *Biosurfactants : Multifunctional Biomolecules of the 21st Century*. 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Šarc, A., Kosel, J., Stopar, D., Oder, M., Dular, M. (2018). Removal of bacteria *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis* by (super)cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 42(April 2017), 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.004>

- Sarubbo, L. A., Farias, C. B. B., Campos-Takaki, G. M. (2007). Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology*, *54*(1), 68–73. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0412-z>
- Sarubbo, L. A., Marçal, M. D. C., Neves, M. L. C., Silva, M. D. P. C., Porto, L. F., Campos-Takaki, G. M. (2001). Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, *95*(1), 59–67. <https://doi.org/10.1385/ABAB:95:1:59>
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales : Pasado , Presente y Futuro. *BioTecnologia*, *16*(2), 14–46.
- Selig, M. J., Vinzant, T. B., Himmel, M. E., Decker, S. R. (2009). The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *155*(1–3), 397–406. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8511-x>
- Sena, H. H., Sanches, M. A., Rocha, D. F. S., Segundo, W. O. P. F., De Souza, É. S., De Souza, J. V. B. (2018). Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. *International Journal of Microbiology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5684261>
- Sharma, D., Saharan, B. S., Chauhan, N., Bansal, A., Procha, S. (2014). *Production and Structural Characterization of Lactobacillus helveticus Derived Biosurfactant*. 2014, 25–31.
- Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I. W., Roller, S. (1995). Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology*, *40*(3), 207–217. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00053-S](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00053-S)
- Singh, M., Desai, J. . (1989). Hydrocarbon emulsification by *Candida tropicalis* and *Debaryomyces polymorphus*. *Indian Journal of Experimental Biology*, *2*.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Thomas, L., Pandey, A. (2017). Solid-State Fermentation. In *Industrial Biotechnology: Products and Processes* (pp. 187–204).
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, *46*(7), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Siqueira, G., Arantes, V., Saddler, J. N., Ferraz, A., Milagres, A. M. F. (2017). Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0860-7>
- Slivinski, C. T., Mallmann, E., De Araújo, J. M., Mitchell, D. A., Krieger, N. (2012). Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*, *47*(12), 1848–1855.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.014>

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R. O., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Energy, D. of. (2011). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure, April 2008*, 1–14.
- Soberón-Chávez, G., Maier, R. M. (2011). *Biosurfactants* (G. Soberón-Chávez (ed.); Vol. 20, Issue October 2014). Springer Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5>
- Sobrinho, H. B. S., Rufino, R. D., Luna, J. M., Salgueiro, A. A., Leite, F. C., Sarubbo, L. A., Campos-takaki, G. M. (2008). Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *43*, 912–917. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.013>
- Soccol, C. R., Costa, E. S. F. da, Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., Vandenberghe, L. P. de S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, *1*(1), 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Nuñez, A., Foglia, T. A. (2004). Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses. *1993*, 1241–1245.
- Souza, D. T., Schultz, L. E., Damaso, M. C. T. (2015). Potencial da indústria de papel e celulose no contexto de biorrefinaria. *Agroenergia Em Revista*.
- Souza, J. T. De, Boer, M. De, Waard, P. De, Beek, A. Van, Raaijmakers, J. M., Souza, J. T. De, Boer, M. De, Waard, P. De, Beek, T. A. Van. (2003). Properties of Cyclic Lipopeptide Surfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens* Biochemical , Genetic , and Zoosporicidal Properties of Cyclic Lipopeptide Surfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens*. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7161>
- Souza, Teixeira, S, K., Gudiña, J, E., Azevedo, Z., Freitas, V. De, Schwan, R. F., Rodrigues, L. R., Dias, D. R., Teixeira, J. A. (2017). New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.041>
- Tanaka, M., Taniguchi, M., Matsuno, R., Kamikubo, T. (1981). Purification and Properties of Cellulases from *Eupenicillium javanicum*. *Journal of Fermentation Technology*, *59*(2), 177–183.
- Taylor, P., Zhao, Z., Wong, J. W. C. (2009). Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene. December 2014, 37–41. <https://doi.org/10.1080/09593330802630801>
- Terán Hilares, R., de Almeida, G. F., Ahmed, M. A., Antunes, F. A. F., da Silva, S. S., Han, J. I.,

- Santos, J. C. dos. (2017). Hydrodynamic cavitation as an efficient pretreatment method for lignocellulosic biomassA parametric study. *Bioresource Technology*, 235, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.125>
- Terán Hilares, R., de Souza, R. A., Marcelino, P. F., da Silva, S. S., Dragone, G., Mussatto, S. I., Santos, J. C. (2018). Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. *Food Chemistry*, 245, 786–791. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.111>
- Terán Hilares, R., dos Santos, J. C., Ahmed, M. A., Jeon, S. H., da Silva, S. S., Han, J. I. (2016). Hydrodynamic cavitation-assisted alkaline pretreatment as a new approach for sugarcane bagasse biorefineries. *Bioresource Technology*, 214, 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.004>
- Thangavelu, K., Desikan, R., Taran, O. P., Uthandi, S. (2018). Delignification of corncob via combined hydrodynamic cavitation and enzymatic pretreatment: Process optimization by response surface methodology. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1204-y>
- Thanomsub, B., Watcharachaipong, T., Chotelersak, K., Arunrattiyakorn, P., Nitoda, T. (2004). *Monoacylglycerols : glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast , Candida ishiwadae*. 588–592. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02202.x>
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, I. M. (2008). Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 917–925. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9609-y>
- Tulloch, A. ., Spencer, J. F. . (1968). A new hydroxy fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. *Canadian Journal of Chemistry*, 9862.
- Twigg, M. S., Baccile, N., Banat, I. M., Déziel, E., Marchant, R., Roelants, S., Van Bogaert, I. N. A. (2021). Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 147–170. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13704>
- Urrutia, P. I. (2013). Predicting Water-In-Oil Emulsion Coalescence From Surface Pressure Isotherms. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Uzoigwe, C., Burgess, J. G., Ennis, C. J., Rahman, P. K. S. M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245>
- Vecino, X., Barbosa-Pereira, L., Devesa-Rey, R., Cruz, J. M., Moldes, A. B. (2015). Optimization

- of extraction conditions and fatty acid characterization of *Lactobacillus pentosus* cell-bound biosurfactant/bioemulsifier. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(2), 313–320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6720>
- Velioglu, Z., Ozturk Urek, R. (2014). Concurrent Biosurfactant and Ligninolytic Enzyme Production by *Pleurotus* spp. in Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(4), 1354–1364. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1136-3>
- Velioglu, Z., Öztürk Ürek, R. (2015). Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 160–166. <https://doi.org/10.3906/biy-1406-44>
- Wood, T. M., Bhat, K. M. (1988). Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*, 160(C), 87–112. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60109-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60109-1)
- Yang, H., Yu, H., Shen, Z. (2015). A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(8), 1139–1147. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1635-4>
- Yoon, S. H., Rhee, J. S. (1983). Lipid from yeast fermentation: Effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(7), 1281–1286. <https://doi.org/10.1007/BF02702101>
- Yu, Q., Zhuang, X., Wang, W., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., Kong, X., Yuan, Z. (2016). Hemicellulose and lignin removal to improve the enzymatic digestibility and ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 94, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.08.005>
- Zhang, J., Xie, J., Zhang, H. (2021). Sodium hydroxide catalytic ethanol pretreatment and surfactant on the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 319, 124171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124171>
- Zhang, Y., Maier, W. J. (1997). *Effect of Rhamnolipids on the Dissolution, Bioavailability, and Biodegradation of Phenanthrene*. 31(8), 2211–2217.
- Zhao, X., Peng, F., Cheng, K., Liu, D. (2009). Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.07.011>
- Zhu, Zhen, Zhang, F., Wei, Z., Ran, W., Shen, Q. (2013). The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, 127, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.017>

- Zhu, Zongyuan, Liu, Y., Yang, X., McQueen-Mason, S. J., Gomez, L. D., Macquarrie, D. J. (2020). Comparative evaluation of microwave-assisted acid, alkaline, and inorganic salt pretreatments of sugarcane bagasse for sugar recovery. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00680-7>
- Zinjarde, S., Chinnathambi, S., Lachke, A. H., Pant, A. (1997). Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. *Letters in Applied Microbiology*, 24(2), 117–121. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00355.x>
- Zouari, R., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi-Aydi, D. (2014). Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant Production Under Solid-state Fermentation Using By-products of a Traditional Olive Mill Factory. *Achievements in the Life Sciences*, 8(2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.als.2015.04.007>