

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

THIAGO MOURA ROCHA

Síntese microbiana de bioestimulantes de crescimento vegetal para aplicação na
agricultura

Lorena
2023

THIAGO MOURA ROCHA

Síntese microbiana de bioestimulantes de crescimento vegetal para aplicação na agricultura

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 Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Versão Corrigida

Lorena

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, 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)

Moura Rocha, Thiago
Síntese microbiana de bioestimulantes de
crescimento vegetal para aplicação na agricultura /
Thiago Moura Rocha; orientador Silvio Silvério da
Silva - Versão Corrigida. - Lorena, 2023.
177 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2023

1. Soforolipídeos. 2. Fungo entomopatogênico. 3.
Substratos renováveis. 4. Compostos bioativos. 5.
Bioinsumo. I. Título. II. da Silva, Silvio Silvério,
orient.

AGRADECIMENTOS

É com uma profusão de sentimentos atônitos diante da finalização deste processo gestativo, no qual depus meus esforços infundáveis, que venho a regozijar-me por todos os momentos ora portentosos, ora abortos e findados na clareza de que os que fizeram parte deste desenvolvimento, indubitavelmente, recebem grande parte deste mérito.

Digo isso não pelo demérito individual ou por uma robuscada modestia, se não pela mente sã com a qual me encontro hoje, e que me faz tanto transparecer a verdadeira realidade, livre de interpretações falaciosas, que são frequentemente conduzidas pelo ego.

O deleite da finalização de uma etapa, contrário do que muitos possam dizer, não advém de seu fechamento, tampouco de prodigiosos resultados. A conquista do absoluto, do palpável e intocável, do aprendizado e o irremediável e, propriamente dizendo, o deleite final advém da jornada percorrida, do desdobramento da alma, da liberação da sordidez interna para que no fim estejamos preparados para um novo ciclo.

É inconcebível, portanto, atingir este momento, sem primeiramente, salientar a imensa gratidão que sinto da liberdade e da coragem que a mim se manifestam em virtude do desapego e da desconstrução do ser. Com os pedaços que sobraram, embaralhei-os e tornei a vê-los por outra perspectiva. Sob uma ótica inovada, construí distintos paralelogramos que não se assemelham em forma aos de outrora, mas que se debruçam e sobrenadam no mesmo mar de minha essência.

Não gostaria de proferir palavras de agradecimento aos sujeitos diretos deste processo, pois acredito que estas pessoas ao longo da jornada reconheceram, internamente, suas inexoráveis influências no desenvolvimento deste trabalho interpessoal e científico. No entanto, reconheço o investimento depositado em mim pela CAPES.

Ademais, reconheço alguns protagonistas no que diz respeito à relação educador-educando. Sendo assim, ao meu orientador, Prof. Silvio Silverio da Silva, o qual me incentivou nas mais audaciosas ideias, arrebatou-me os pensamentos menos concretos e insalubres e, ensinou-me a arte da ciência, dedico o desenvolvimento de minha transparência e sua respectiva forma manifestante; ao Dr. Paulo Marcelino que me confiou a missão de iniciar minha jornada pedagógica, dedico minha gratidão por ter visto em mim, um mero e ordinário ser, o brilho nos olhos de quem já soube e sabe o que realmente é ser um aluno da vida e; ao meu amigo, Dr.

Felipe Antunes, dedico minhas sinceras condolências por sua dedicação e pensamento coletivo que influenciou a mim e continuará sempre a todos e todas que cruzarem seu caminho.

No âmbito pessoal, reconheço também meus companheiros mexicanos de trabalho e viagens, Salvador e Érick pelas saudosas manhãs e saudáveis aventuras ao longo dos anos. Afora, sem dúvidas, reconheço a minha família, com os quais compartilhei os mais aflorados sentimentos, sem sensuras e estribeiras, ao longo desses anos.

Desta forma, profiro as palavras mais intrínsecas e subjetivas aos sujeitos indiretos, seja ela, primeiramente, a nossa Mãe Terra (*Pacha Mama*) que nos concebeu e que nos presenteia por mais um ano a fonte nutritiva da vida através dos alimentos, a oportunidade de palpar o material e o espírito através dos ventos e dos trovões e, que nos faz expelir o anseio e o gozo através dos abalos cismico advindos de seu útero. Ao nosso Sol, do qual obtemos a luz da clarividência e da esperança. Ao Universo por nos proporcionar as experiências astronômicas que nos fazem nos perder dentro de nossa própria infinitude astral. E, por fim, aos movimentos populares sociais que tanto rejuvenescem nossas forças e nos impulsiona ao intangível e, que resgata de nosso âmago a prazerosa experiência humanitária.

RESUMO

ROCHA, T.M. **Síntese microbiana de bioestimulantes de crescimento vegetal para aplicação na agricultura**. 2023. 177p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

A busca por um sistema de plantio menos invasivo e mais inclusivo com empoderamento territorial e social é imperativo, no âmbito nacional e mundial, para suscitar em igualdade socioeconômica e, em desenvolvimento ambiental e sustentável de acordo com a Agenda de 2030 estabelecida pela ONU. O uso de defensivos agrícolas e fertilizantes químicos estão adjuntos à emissão de gases do efeito estufa e corroboram por uma agricultura extrativa e prejudicial ao ecossistema como um todo. Visando a substituição destes produtos, destaca-se o uso de inoculantes, biofertilizantes e biomoléculas de origem microbiana, benéficas ao crescimento de plantas e proporcionam um controle biológico, atenuando a proliferação de patógenos. Neste sentido, os biossurfactantes, moléculas tenso-ativas de origem biológica, apresentam propriedades de grande interesse agrícola, atuando como promotor de germinação de sementes e mudas, inibidor do crescimento de pragas e indutor do sistema imune de plantas. Paralelamente, o fungo entomopatogênico *Trichoderma* spp. é amplamente conhecido e difundido no mercado de biofertilizantes devido à sua eficácia como agente de controle biológico e indutor da tolerância a estresses abióticos quando associado a rizosfera de plantas. Desta forma, com o objetivo de desenvolver um bioinsumo, cujas funções tangem à integração dos benefícios tanto do fungo *Trichoderma* quanto do biossurfactante proveniente da levedura *S. bombicola* conduziu-se diferentes estratégias de cultivo, dentre elas, cultivo aeróbico e em estado sólido para se obter os produtos desejados. Os biossurfactantes foram produzidos pela levedura por meio da utilização de subprodutos agroindustrial e domiciliar, obtendo uma concentração de 50 g/L após otimização por meio de um desenho experimental 2² fatorial. Após sua quantificação, os biossurfactantes foram caracterizados e identificados como uma mistura de soforolipídeos. Os esporos, metabólitos e enzimas provenientes do metabolismo do fungo foram produzidas por meio de subprodutos lignocelulósicos em cultivo sólido, obtendo ao final uma quantidade máxima de 1,3 x 10⁸ esporos/g biomassa e apresentando diversas bandas de proteínas, as quais foram preliminarmente identificadas por um gel de proteínas. Os metabólitos foram caracterizados quanto a sua espécie química (e.g. fenólicos, lipídeos, proteínas, carboidratos). A biocompatibilidade dos soforolipídeos com o fungo foi avaliada por meio de cultivos líquidos que resultou em uma inibição máxima de 30% do crescimento deste quando submetido a concentrações de 2,0 g/L dos biossurfactantes; no entanto, nos cultivos em estado sólido, a suplementação com soforolipídeos resultou em um aumento de esporos significativo, avaliado por teste Tukey (p<0,05). Os ensaios de germinação foram conduzidos em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) aplicando os bioativos em diferentes formulações e proporções, os melhores ensaios resultaram em até 35% de aumento de raízes em comparação ao controle (água destilada). Diante destes resultados, pode-se concluir que o uso de soforolipídeos em integração ao fungo *T. harzianum* é uma estratégia promissora e estudos futuros serão realizados para avaliar seu potencial de controle biológico.

Palavras-chave: soforolipídeos. fungo entomopatogênico. substratos renováveis. bioinsumo. compostos bioativos.

ABSTRACT

ROCHA, T.M. **Microbial synthesis of plant growth biostimulants for application in agriculture**. 2023. 177p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

The search for a less invasive and more inclusive planting system with territorial and social empowerment is imperative, at the national and global level to bring socioeconomic equality, environmental and sustainable development, which are in accordance with the 2030 Agenda established by the UN. The use of agricultural pesticides and chemical fertilizers are associated with the emission of greenhouse gases and corroborate for an extractive agriculture that is harmful to the ecosystem as a whole. With the aim to replace these products, the use of inoculants, biofertilizers and biomolecules of microbial origin stands out and benefits the plant growth and provide biological control, hampering the proliferation of pathogens. In this sense, biosurfactants, surface-active molecules of biological origin, have properties of great agricultural interest, acting as a seed and seedling germination promoter, pest growth inhibitor and plant immune system inducer. Simultaneously, the entomopathogenic fungus *Trichoderma* spp. is widely known and disseminated in the biofertilizer market due to its effectiveness as a biological control agent and inducer of tolerance to abiotic stresses when associated with the rhizosphere of plants. Thus, with the aim of developing a bioinput, whose functions relate to the integration of the benefits of both the fungus *Trichoderma harzianum* CCT 2160 and the biosurfactant from the yeast *Starmerella Bombicola* Y-6419, different cultivation strategies were conducted. Amongst, aerobic and solid-state cultivation were employed. The biosurfactants were produced by the yeast with the use of agroindustrial and household by-products, obtaining a concentration of 50 g/L after optimization *via* a 2² factorial experimental design. After quantification, the biosurfactants were characterized and identified as a mixture of sophorolipids. The spores, metabolites and enzymes from the fungus metabolism were produced by means of lignocellulosic by-products in solid culture, finally obtaining a maximum amount of 1.3 x 10⁸ spores/g biomass and presenting several protein bands, which were preliminarily identified by a protein gel. Metabolites were characterized according to their chemical species (e.g. phenolics, lipids, proteins, carbohydrates). The biocompatibility of sophorolipids with the fungus was evaluated by means of liquid cultures, which resulted in a maximum inhibition of 30% of its growth when subjected to concentrations of 2.0 g/L of biosurfactants; however, in solid-state cultures, supplementation with sophorolipids resulted in a significant increase in spores, as assessed by the Tukey test (p<0.05). The germination tests were conducted in rice seeds (*Oryza sativa* L.) applying the bioactive compounds in different formulations and proportions. The optimal tests resulted in up to 35% of root increase compared to the control (distilled water). Given these results, it can be concluded that the use of sophorolipids in integration with the *T. harzianum*-based biofertilizer is a promising strategy and future studies will be carried out to evaluate its potential for biological control

Keywords: sophorolipids. entomopathogenic fungus. renewable substrates. bioinput. bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo plausível de recrutamento e adaptação da microbiota pela planta. (A) Planta no primeiro estágio de diferenciação da microbiota; (B) Diversificação da microbiota com a transferência horizontal de genes deletérios para o crescimento da planta; (C) Diversificação da microbiota com a transferência horizontal de genes promotores de crescimento. Adaptado de Lemanceau et al. (2017).....	22
Figura 2. Tipos de biossurfactantes microbianos. Adaptado de Barbosa et al. (2022)	25
Figura 3. Efeito de moléculas surfactantes quando aplicadas em fluidos com polaridades distintas.....	27
Figura 4. Representação da interface entre dois fluidos imiscíveis. Adaptado de Tadros (2005)	28
Figura 5. Estrutura esférica de uma micela.	31
Figura 6. Variação de propriedades físico-química de fluídos pela variação da concentração de surfactantes. Adaptado de Tadros (2005)	32
Figura 7. Principais Estruturas Químicas dos Soforolipídios. (a) Soforolipídio Lactônico; (b) Soforolipídio Acídico. O círculo vermelho representa a ligação lactônica entre o grupo carboxila e o segunda molécula de glicose. O círculo azul representa o grupo funcional carboxila. Adaptado de Kosaric e Vardar-Sukan (2015).....	35
Figura 8. Via metabólica da produção de Soforolipídios pela Levedura <i>S. bombicola</i> . (1) ω -hidroxilação catalisado pelo Citocromo P450; (2) glicosilação catalisada pela enzima UGTA1; (3) glicosilação de glicolipídios catalisada pela enzima UGTB1; (4) acetilação de SL catalisada pela enzima at; (5) transportador de SLs; (6) lactonização de SLAs catalisada pela enzima SBLE. Adaptado de Kosaric e Vardar-Sukan (2015).....	43
Figura 9. Esquema da distribuição de fases da fermentação de SLs após centrifugação à 4000 rpm. Fases – (1) Óleo residual + SL baixa densidade; (2) Caldo fermentado; (3) SL alta densidade; (4) Biomassa <i>S. bombicola</i>	48
Figura 10. Esquema Representativo de Economia Circular.....	55
Figura 11. Esquema representativo do mecanismo dos BSs envolvendo a mobilização de nutrientes às raízes de vegetais durante o crescimento no solo. Adaptado de Kumar et al. (2021)	56
Figura 12. Atividade biológica e possíveis efeitos derivados dos biossurfactantes quando associados às membranas celulares. Adaptado de Shao et al. (2017)	60
Figura 13. Representação do processo de pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica. Adaptado de Ji et al. (2011).....	69
Figura 14. Reator Para FES.....	84

Figura 15. Composição mássica (% m/m) das biomassas BCA e CA antes (in natura) e após pré-tratamento alcalino (PTA).	92
Figura 16. Seleção da cepa de <i>S. bombicola</i> por meio de análise da redução da tensão superficial (A) e ensaios fermentativos utilizando OCR como fonte hidrofóbica de carbono (B). Análise Tukey de significância ($p < 0,05$) está representada pelas letras indicadas acima das barras. ..	96
Figura 17. Cromatografia de camada delgada dos diferentes SLs obtidos em ensaio fermentativo pelas linhagens de <i>S. bombicola</i> . Padrão utilizado de SL-Lactônico di-acetilado.	98
Figura 18. Superfície de resposta parametrizada de acordo com os dados empíricos obtidos da produção de SLs em relação à variação das concentrações de EFA (% v/v) e OCR (g/L). Na superfície encontra-se uma região onde pode-se obter SLs de maior densidade em relação ao meio (1) e outra região onde houve a produção de SLs de menor densidade (2).	105
Figura 19. Resultados obtidos a partir da fermentação da levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419 para a produção de SLs utilizando diferentes fontes de carbono lipofílico.	107
Figura 20. Gel de proteínas SDS-PAGE dos caldos fermentados pela levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419 suplementados com diferentes tipos de óleos. Como controle e controle positivo, extrato do farelo de arroz (EFA) e um padrão de proteínas (PP) foram utilizados, respectivamente.	109
Figura 21. Cinética de Fermentação de Soforolipídeos pela levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419. As diferentes formas geométricas representam as variações dos diferentes substratos e produtos obtidos ao longo de 9 dias (216 horas) de fermentação.	110
Figura 22. Variação de pH e tensão superficial ao longo do tempo durante o processo fermentativo de produção de SLs pela levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419.	113
Figura 23. Análise da produção e consumo de glicerol alinhado a produção de SLs ao longo do cultivo da levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419.	114
Figura 24. Diferentes estados físicos dos SLs obtidos. (A): Forma precipitada após centrifugação à 4000 rpm x 20 min (4°C); (B): Estado sólido rígido após liofilização por 48 h junto ao meio de cultivo; (C) Estado parcialmente solubilizado em meio de cultivo; (D) SLs em forma líquida, viscosa, de aspecto gomoso após extração por solvatação, seguido de evaporação.	116
Figura 25. Diferentes adjuvantes de secagem utilizados no processo de formulação dos SLs em estado sólido. (a) Diferentes combinações de subprodutos agrícolas utilizados como adjuvantes de secagem no processo de liofilização de uma solução de SLs a uma concentração de 2,7 g/L, onde BCA: bagaço de cana-de-açúcar; CA: casca de arroz; FA: farelo de arroz. (b) Ilustração em perspectiva aumentada da combinação BCA/CA. O controle foi formulado a partir da secagem da solução de SLs sem a utilização dos adjuvantes.	118
Figura 26. Espectro infravermelho das ligações químicas presentes nos biossurfactantes soforolipídico obtido pela levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419 utilizando meios sintético (SL ₁) e, subprodutos agroindustriais (OCR, EFA) em diferentes concentrações (SL ₂ , SL ₃) como substratos em fermentação submersa.	121

Figura 27. Análise da CMC em solução aquosa dos SLs obtidos através da cepa <i>S. bombicola</i> Y-6419. Os arcos orientados para baixo representam o possível intervalo em que pode ser encontrado a CMC.....	128
Figura 28. Estabilidade Físico-Química da redução da tensão superficial inerente ao uso do biossurfactante soforolipídico obtido pela levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419 em diferentes concentrações salinas (A) e diferentes pHs (B).....	131
Figura 29. Granulometria de BCA, CA e FA realizado em peneiras MESH de diferentes diâmetros. Os resultados estão discriminados em unidade adimensional [-] em relação ao peso total submetido a separação granulométrica.....	133
Figura 30. Concentração de esporos de <i>T. harzianum</i> em meios de cultivo a base de FA, CA e BCA após 7 dias de FES.	135
Figura 31. Etapas no processo de FES pelo <i>T. harzianum</i> conduzida em embalagens plásticas autoclaváveis de Polietileno de alta densidade. (A) Estufa microbiológica + Luzes LED; (B) Meio de cultivo fermentado e pigmentado em verde; (C) Meio de cultivo após a extração dos esporos com uma solução salina de 0,9 % (m/m) NaCl e 0,1 % (v/v) Tween 80.	138
Figura 32. Contagem dos esporos ao final de 7 dias de FES utilizando os meios de cultivo M1 e M2. M1 consiste em 70/15/15 % (m/m) (FA/BCA/CA %) e M2 50/25/25 % (m/m). Os experimentos foram realizados em duplicatas e os resultados expressos a partir da média dos ensaios.	138
Figura 33. Biofertilizante à base do fungo <i>T. harzianum</i> . (a) Meio sólido fermentado pelo fungo <i>T. harzianum</i> após cultivo de 10 dias e seco em estufa à 40°C por 48 horas. (b) Gel SDS-PAGE de proteínas excretadas pelo fungo ao longo de seu cultivo em estado sólido, onde PBTh: Proteínas presentes no biofertilizante à base de <i>T. harzianum</i> ; EFA: proteínas presentes no extrato do farelo de arroz; PP: padrão de proteínas.....	143
Figura 34. Meio de cultivo submerso do fungo <i>T. harzianum</i> suplementado com diferentes concentrações de SLs.....	147
Figura 35. Análise microscópica das raízes da plântula de arroz após 10 dias de crescimento em uma incubadora BOD à 25°C e fotoperíodo de 12 horas, na qual as sementes provenientes do ensaio (a) SL1, (b) controle, (c) BTh1 e, (d) SLT1 estão dispostas na ilustração.	151
Figura 36. Cinética de germinação das sementes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) perante à aplicação dos bioprodutos (representados pelos símbolos e cores ao lado direito do gráfico) durante um período de 7 dias em uma incubadora BOD à 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Os ensaios codificados por SL são a respeito da aplicação dos SLs, BTh os ensaios da aplicação do biofertilizante à base de <i>T. harzianum</i> ., os ensaios SLT dizem respeito à aplicação conjunta dos bioprodutos e, C representa o controle (H ₂ O).	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais estratégias para a separação de SLs in situ acopladas com biorreatores. NI: Não Identificado. Adaptado de Dolman et al. (2019).....	51
Tabela 2. Diferentes pré-tratamentos aplicados às biomassas lignocelulósicas. Adaptado de Zabed et al. (2017); Prado et al. (2021).....	70
Tabela 3. Principais patentes envolvendo o uso e produção de soforolípídeos para aplicação na agricultura.....	72
Tabela 4. Principais patentes envolvendo o uso do fungo <i>Trichoderma</i> sp. como agente de controle biológico e unidade ativa de biofertilização.....	74
Tabela 5. Disposição das Corridas Experimentais Montadas a Partir do Software Statistica (StaSoft, Inc., OK, USA).....	83
Tabela 6. Composição estrutural química das biomassas lignocelulósicas in natura (BCA; CA) e após PTA (BCA _{PTA} ; CA _{PTA}). Os valores representados são as médias obtidas e foram denotados em % (m/m) ± δ , onde δ representa o desvio padrão da amostragem.....	91
Tabela 7. Perfil de ácidos graxos dos respectivos óleos utilizados como fontes de carbono lipofílico no cultivo da levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419 para a produção de biossurfactantes. 94	
Tabela 8. Planejamento experimental referente ao estudo da suplementação do meio de cultivo de <i>S. bombicola</i> Y-6419 com extrato de farelo de arroz (EFA) e óleo de cozinha residual (OCR) e seus respectivos resultados em relação à produção de SLs.	101
Tabela 9. Resultados da análise ANOVA a respeito dos resultados obtidos a partir do planejamento experimental factorial 2 ² implementado na produção de SLs pela levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419.	102
Tabela 10. Parâmetros cinéticos em relação ao processo fermentativo da levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419 e outros trabalhos nos quais também foi utilizado linhagens diferentes de <i>S. bombicola</i> com estratégias fermentativas similares e distintas ao presente trabalho.....	112
Tabela 11. Tensão superficial obtida a partir da dessorção dos SLs veiculados nas diferentes matrizes lignocelulósicas utilizadas como adjuvantes de secagem. O controle foi realizado a partir da tensão superficial obtida da solução de SLs liofilizada e ressuspensa em água destilada.....	119
Tabela 12. Picos de relação massa/carga (m/z) e seus respectivos tempos de retenção do presente trabalho em comparação a outros trabalhos encontrados na literatura.....	123
Tabela 13. Relação Composicional e as respectivas proporções mássicas dos ácidos graxos encontrados nos SLs sintetizados pela levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419 nos tempos 120 horas e 216 horas (final) de seu cultivo fermentativo.....	124
Tabela 14. Propriedades tensoativas, composição e características físico-químicas do biossurfactante produzido pela levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419.....	126

Tabela 15. Relação entre CMC e estrutura química de SLs biossintetizados a partir de diferentes substratos hidrofóbicos.	129
Tabela 16. Ensaio fermentativo conduzido a partir de diferentes composições mássicas do meio de cultivo sólido. Nesta tabela se encontra também os resultados da contagem final de esporos. Os experimentos foram realizados em duplicatas e o resultado expresso a partir da média obtida.	134
Tabela 17. Resumo dos resultados obtidos através de FES para a produção de conídios e metabolitos secundários de <i>Trichoderma</i> spp. por diferentes autores.	140
Tabela 18. Composição Química, biológica e propriedades físico-químicas do biofertilizante BTh.....	142
Tabela 19. Ensaio de biocompatibilidade do crescimento do fungo <i>T. harzianum</i> em cultivo submerso suplementado com diferentes concentrações de SLs e cultivo em estado sólido suplementado com 0,15 g/L de SLs	146
Tabela 20. Composição das formulações desenvolvidas a partir dos bioprodutos sintetizados pela levedura <i>S. bombicola</i> Y-6419 e pelo fungo <i>T. harzianum</i> . Sendo, SL: soforolipídeos; BTh: biofertilizante à base de <i>T. harzianum</i> ; SLT: mistura entre SLs e BTh.....	149
Tabela 21. Resultados referentes a aplicação dos bioprodutos nos ensaios germinativos das sementes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) e suas respectivas respostas morfológicas quantitativas.	150

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	Associação Planta-Microbiota	21
2.2	Biossurfactantes	24
2.2.1	Propriedades dos BSs	26
2.2.1.1	Tensoatividade	26
2.2.1.2	Concentração Crítica Micelar (CMC).....	30
2.2.1.3	Emulsões e Efeito Emulsificante de Tensoativos	33
2.2.2	Soforolipídios: Produção e Aplicações	35
2.2.2.1	Estrutura Química e Microrganismos Produtores.....	35
2.2.2.2	Aplicações de Soforolipídeos na Agricultura.....	37
2.2.3	Starmerella bombicola: Habitat, Aspectos Morfológicos e Bioquímicos	39
2.2.3.1	Habitat	39
2.2.3.2	Bioquímica e Metabolismo.....	40
2.2.3.3	Reguladores do Metabolismo de SLs	41
2.2.3.4	Via Metabólica e Regulação: Principais Enzimas e Cofatores Envolvidos.....	42
2.2.4	Produção de Soforolipídios	47
2.2.4.1	Atuais Avanços em Técnicas de Fermentação, Separação e Caracterização de SLs ...	47
2.2.4.2	Utilização de Substratos Renováveis e de Baixo Custo	52
2.2.5	Interações entre Microbiota-Biossurfactante-Planta.....	55
2.2.5.1	Aspectos Físico-Químicos.....	55
2.2.5.2	Atividade Biológica.....	57
2.3	Fungos Micoparasitas: base de Biopesticidas e Biofertilizantes	61
2.3.1	Trichoderma harzianum: um Agente Importante da Rizosfera.....	62
2.3.2	Fermentação em Estado Sólido.....	64
2.3.2.1	Fundamentos Técnicos.....	65
2.3.2.2	Biomassa Agroindustrial como Substrato em FES	67
2.4	Insumos Agrícolas a Base de Compostos Bioativos.....	71
2.4.1	Formulações a Base de Biossurfactantes: Estratégias e Aplicações	71
2.4.2	Formulações a Base de Fungos Entomopatogênicos: Estratégias e Aplicações.....	73
3	OBJETIVOS	75
3.1	Desenho Conceitual da Tecnologia.....	75
3.1	Objetivos Gerais.....	76
3.2	Objetivos Específicos.....	76
4	MATERIAIS E MÉTODOS	77
4.1	Fluxograma de Trabalho.....	77
4.2	Manutenção de Microrganismos.....	79
4.2.1	Isolados de S. bombicola.....	79
4.2.2	Linhagem Trichoderma harzianum	80
4.3	Matéria-Prima.....	80
4.3.1	Subprodutos Agroindustriais utilizados como matéria-prima	80
4.3.2	Pré-tratamentos	80
4.3.2.1	Pré-tratamento Alcalino (PTA) das Biomassas Lignocelulósicas	80
4.3.2.2	Pré-tratamento Físico	80
4.3.2.3	Obtenção do Extrato de FA.....	81

4.3.3	Caracterização Química	81
4.3.3.1	<i>Biomassa Lignocelulósica</i>	81
4.3.3.2	<i>Óleo de Cozinha Residual</i>	81
4.4	Ensaio Fermentativos	82
4.4.1	Produção de Biossurfactantes pela Levedura <i>S. bombicola</i> através de Fermentação Submersa	82
4.4.1.1	<i>Seleção dos Isolados de <i>S. bombicola</i> (Screening)</i>	82
4.4.1.2	<i>Avaliação da Substituição da Fonte de Nitrogênio e Dosagem da concentração de OCR</i>	83
4.4.2	Produção de Esporos pelo Fungo <i>T. harzianum</i> através de Fermentação em Estado Sólido (FES)	83
4.4.2.1	<i>Estudo da Composição do Meio de Cultivo e Tamanho de Partícula</i>	83
4.4.2.2	<i>FES em Embalagens de Polietileno</i>	84
4.4.2.3	<i>Avaliação da biocompatibilidade dos BSs Produzidos no Crescimento de <i>T. harzianum</i></i>	84
4.5	Ensaio de Germinação	85
4.6	Formulações	86
4.7.1	Preparo do bioativo à base de biossurfactantes (BBs) por meio da utilização de biomassa lignocelulósica como adjuvante de secagem	87
4.7	Métodos analíticos	88
4.7.1	Quantificação Celular	88
4.7.1.1	<i>Biomassa de <i>S. bombicola</i></i>	88
4.7.1.2	<i>Esporos de <i>T. harzianum</i></i>	88
4.7.2	Análise do Biossurfactante	89
4.7.2.1	<i>Tensão Superficial</i>	89
4.7.2.2	<i>Índice de Emulsificação (E_{24})</i>	89
4.7.2.3	<i>Extração e Quantificação</i>	89
4.7.2.4	<i>Cromatografia de Camada Delgada (CCD)</i>	90
4.7.2.5	<i>Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG-EM)</i>	90
4.7.2.6	<i>Cromatografia Líquida de Alta Performance Acoplada em Espectrometria de Massa (CLAP-EM)</i>	90
4.7.3	Gel de Proteínas	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
5.1	Caracterização e Pré-tratamento de Matéria-Prima	91
5.1.1	Material Lignocelulósico	91
5.1.1.1	<i>Caracterização BCA e CA</i>	91
5.1.2	Material Lipídico	93
5.1.2.1	<i>Caracterização dos Substratos Lipofílicos</i>	93
5.2	Biossurfactante: Produção, Caracterização e Análises Físico-químicas	95
5.2.1	Screening de linhagens de <i>S. bombicola</i> produtoras de BSs	95
5.2.2	Avaliação da produção de BSs utilizando a combinação de EFA e OCR	100
5.2.2.1	<i>Superfície de Resposta da Produção de SLs em Relação aos Parâmetros estudados</i>	104
5.2.3	Utilização de diferentes fontes hidrofóbicas como substrato para a produção de BSs	107
5.2.4	Cinética de Produção dos BSs	110
5.2.5	Extração e Separação dos SLs	115
5.2.5.1	<i>Processamento de Downstream: Opções Convencionais de Separação e Formulação</i>	115
5.2.5.2	<i>Utilização de Adjuvantes de Secagem Renováveis: Uma Estratégia Alternativa de Bioformulações</i>	117
5.2.6	Caracterização Química dos BSs	121
5.2.6.1	<i>Espectro IVTF</i>	121
5.2.6.2	<i>Caracterização de Massas por CLAP-EM</i>	122
5.2.6.3	<i>Caracterização dos Ácidos Graxos contidos nos SLs por CG-EM</i>	124

5.2.7	Caracterização e Estabilidade Físico-Química dos BSs.....	125
5.2.7.1	Concentração Micelar Crítica (CMC).....	127
5.2.7.2	Estabilidade Físico-Química.....	130
5.3	Produção de Esporos de <i>Trichoderma harzianum</i> via Fermentação em Estado Sólido	132
5.3.1	Screening da Composição do Meio de Cultivo Sólido.....	132
5.3.2	FES em Embalagens de Polietileno.....	137
5.3.3	Composição Química do Biofertilizante à base de <i>T. harzianum</i> (BTh).....	141
5.4	Análise de Biocompatibilidade Entre os Soforolipídeos e o Crescimento do Fungo <i>T. harzianum</i>	145
5.5	Ensaio Germinativos e Crescimento Vegetal.....	149
5.5.1	Formulações Envolvendo SLs e o Biofertilizante à base de <i>T. harzianum</i>	149
5.5.2	Análises dos Parâmetros Morfológicos das Plântulas de <i>Oryza sativa</i> L.....	150
5.5.3	Cinética de Germinação.....	152
6	CONCLUSÕES.....	155
	REFERÊNCIAS.....	157

1 INTRODUÇÃO

A agricultura, desde seus tempos primitivos, se mostrou fundamental para a sobrevivência da sociedade da forma como ela é conhecida. Com a aceleração do crescimento da população mundial fez-se necessário aumentar a produtividade de alimentos e plantas para suprir a demanda alimentícia e energética e ao mesmo tempo, utilizar eficientemente os recursos naturais, como hídricos, e terras aráveis sem haver desperdício de capacidade. Diante deste desafio, o uso excessivo de fertilizantes químicos, derivados de petróleo, bem como pesticidas passou a ser visto como principal estratégia para se manter a alta produtividade nas colheitas (Stenersen, 2004). Em contrapartida, este uso exacerbado de insumos agrícolas pode acarretar sérias consequências deletérias com respeito à funcionalidade microbiana do solo (Tsiafouli et al., 2015), depleção de nutrientes essenciais para o crescimento de plantas (de França et al., 2015), contaminação do solo e águas (Anderson et al., 2006) e, aumento de gases responsáveis pelo efeito estufa devido ao processamento de fertilizantes nitrogenados (FAO, 2021).

Mesmo diante dos problemas relatados, a agricultura desempenha um papel econômico fundamental, principalmente, em países em desenvolvimento, nos quais a produção e exportação de *commodities* formam a base do Poder interno Bruto (PIB). Como exemplo, no Brasil, ao longo dos últimos 3 anos (2018-2020), o balanço comercial do agronegócio contabiliza em torno de 296 bilhões de dólares em exportações que contribuem com o PIB do país (AGROSTAT, 2021).

Devido à forte influência agrícola na economia Brasileira, diversas políticas visando a liberação do uso de defensores agrícolas foram recentemente estabelecidas como por exemplo o projeto de lei 6299/2002 conhecido como “Pacote do Veneno”, o qual aprova a utilização de substâncias potencialmente carcinogênicas. Estes fatos repercutiram de maneira significativa no aumento da aplicação de pesticidas, fungicidas, herbicidas e bactericidas em terras de cultivo extensivo. Neste contexto, o Brasil foi responsável pelo uso de, aproximadamente, 377 quilo-toneladas de pesticidas no ano de 2018, vindo de uma tendência desde o ano de 2015 (FAO, 2021). Enquanto para fungicidas e bactericidas, em uma análise no período de 2010-2018, lidera os 10 países de maior uso com 52 quilo-toneladas por ano (FAO, 2021). Além disso, no caso de herbicidas, o Brasil se apresenta como o segundo país com maior consumo médio, de 216 quilo-toneladas, atingindo seu pico em 2018 com um consumo de 234 quilo-toneladas (FAO, 2021).

A partir desta análise quantitativa, é evidente que este uso necessita, urgentemente, ser substituído por produtos menos tóxicos, biodegradáveis, que não comprometam a saúde da população e, que proporcionem a recuperação da biodiversidade de áreas afetadas. Desta forma, desenvolvendo práticas mais sustentáveis para uma agricultura familiar e instaurando segurança alimentar para a população. Neste contexto, a Organização de Alimento e Agricultura das Nações Unidas (“*Food and Agriculture Organization of the United Nations*” – FAO) definiu os 5 princípios chave para uma agricultura sustentável, os quais podem ser resumidos pelos pontos: (I) aumento de produtividade e valor agregado para os sistemas de alimento; (II) proteção e melhoramento das fontes de recursos naturais; (III) melhora da qualidade de vida e promoção econômica; (IV) melhora da resiliência de pessoas, comunidades e ecossistemas e, por fim, (V) adaptação de leis para um novo desafio (FAO, 2021).

Considerando estes princípios fundamentais abordados, emergiu-se a necessidade de uma mudança de paradigma visando a implementação de práticas mais sustentáveis e ecológicas, bem como a substituição dos sintéticos convencionais por moléculas biocompatíveis e degradáveis. Uma das formas de contribuir para este cenário é a utilização de subprodutos agroindustriais (e.g. materiais lignocelulósicos) em processos de geração de moléculas de maior valor agregado que apresentem características adequadas e promissoras na implementação de uma agricultura orgânica (Abu Yazid et al., 2017). Com o avanço da biotecnologia, foi possível biossintetizar por meio de processos fermentativos, inúmeros produtos de base microbiana utilizando biomassa vegetal como fonte de carbono, inclusive biossurfactantes (Jiménez-Penálver et al., 2016); biopesticidas (Sachdev et al., 2018); biofertilizantes (Qiu et al., 2019) entre outros.

Neste contexto, os biossurfactantes são moléculas versáteis com destaque para suas propriedades tensoativas, podendo apresentar diversas aplicações nas indústrias de alimento, farmacêutica, biorremediação, cosmética, química, e entre outras (Naughton et al., 2019). Seu potencial na agricultura tem sido explorado nas últimas décadas por apresentar potencial em mobilizar nutrientes aderidos às partículas do solo, auxiliando na sua biorremediação (Sachdev e Cameotra, 2013). Isto é possível devido sua habilidade de modificar a polaridade de superfícies, permitindo ou impedindo a formação de biofilmes que são estruturas essenciais em comunidades microbianas na aquisição de nutrientes e colonização de habitats (de Rienzo et al., 2015). Conferem também atividade larvicida (Silva et al., 2014) e bactericida (Kiran et al., 2014) contra certas bactérias, podendo auxiliar no controle da patogenicidade de bactérias do solo, bem como na propagação de pragas. Além disso, podem

ser utilizados no tratamento de sementes (“*bio-priming*”) para um melhor índice de germinação e vigor no crescimento de mudas (Vasconcelos et al., 2020).

Dentre os microrganismos produtores de biossurfactantes, há um grande destaque para a levedura *Starmerella bombicola*. Esta é caracterizada pela sua produção de soforolipídeos (pertencente à classe de biossurfactantes glicolipídicos), tolerância osmótica à ambientes com alta concentração de açúcar e, pela assimilação de diversas fontes hidrofóbicas de carbono (de Graeve et al., 2018). Em outras palavras, apresenta baixa repressão catabólica diante de condições não-convencionais em um cultivo aeróbico. Isto faz com que a levedura possua alta atratividade industrial com possibilidade de escalonamento de processo.

Além dos biossurfactantes, os biopesticida e biofertilizante também exibem funcionalidade promissora na agricultura. São representados, em sua maioria, por agentes de controle biológico e promotores de crescimento vegetal; podem ser sintetizados por meio de cultivos de microrganismos que apresentem tais propriedades. Normalmente, não apresentam atividade toxicológica à saúde humana e, representam uma alternativa robusta de substituição dos defensivos agrícolas atualmente utilizados uma vez que não demonstram risco de contaminação dos ecossistemas (Sala et al., 2019).

Sobretudo, um microrganismo que apresenta vasta aplicação na agricultura é o fungo filamentosos *Trichoderma* spp., demonstrando propriedades não apenas de controle biológico, mas também promotora de crescimento de planta (Vinale et al., 2008). Uma vez associado ao rizoplane das plantas, conhecida como rizosfera (área do crescimento das raízes), confere um melhoramento da capacidade de aquisição de nutrientes essenciais para o seu crescimento, desempenhando desta forma, a biofertilização dos solos. Sua ação micoparasítica vem sido estudada por muito tempo, e exibe uma série de mecanismos que se estendem desde produção de toxinas até inibição direta de crescimento microbiano devido sua rápida proliferação, aquisição de nutrientes, e produção de esporos denominados, conídios (da Penha et al., 2019). Apresenta também, bom desempenho em fermentação em estado sólido (FES), obtendo melhor produtividade na síntese de metabólitos e, normalmente, maior antagonismo contra fitopatógenos em relação aos conídios produzidos em fermentação submersa (FSM) (Sala et al., 2019).

Diante da perspectiva descrita, é fundamental estabelecer novas estratégias para propiciar uma agricultura mais agroecológica que possa fornecer os alimentos necessários para suprir a demanda social e, ao mesmo tempo, causando o mínimo de impacto possível ao meio ambiente. Assim, a combinação de biomoléculas obtidas por meio de processos

sustentáveis que auxiliem no desenvolvimento e crescimento vegetal pode apresentar resultados promissores.

Neste contexto, o presente trabalho visa desenvolver formulações com foco de aplicação na agricultura, integrando a utilização do fungo endofítico *Trichoderma harzianum* CCT 2160 e os BSs produzidos pela levedura *Starmerella bombicola* UFMG-CM-Y6419 e avaliar seus efeitos no crescimento de sementes de arroz.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Associação Planta-Microbiota

A associação entre plantas e microrganismos desempenha um papel fundamental mutualístico na manutenção da vida destes organismos e na propagação de suas respectivas espécies. Esta relação consiste na modulação do habitat compartilhado através do benefício mútuo que se emerge a partir de mecanismos específicos relacionados a cada uma das espécies em correlação. Dentre estes mecanismos, por exemplo, está contido a capacidade nitrificante de diversas bactérias e fungos os quais através do processo de nitrificação, aumentam a biodisponibilidade de nitrogênio, facilitando a assimilação destas moléculas pelas plantas (Cavalcante et al., 2007).

Em acréscimo, a facilitação do acesso ao fósforo presente no solo também é de extrema importância não apenas para o crescimento de plantas, mas também para a ecologia terrestre. Uma vez que ortofosfatos ou fosfatos inorgânicos estão em maiores proporções no solo, a conversão destes em compostos acessíveis ao metabolismo da planta ou sua mineralização, é essencial para o ciclo de fósforo e remediação do solo (Baldotto et al., 2010).

Além disso, outros mecanismos diretos e indiretos também podem favorecer um ambiente nutricional mais completo, tal como a produção de fito hormônios, sideróforos, exopolissacarídeos, biossurfactantes, toxinas antipatogênicas e outros metabólitos secundários microbiano. Estes efeitos garantem uma maior funcionalidade do solo uma vez que as moléculas produzidas possuem funções fundamentais na fisiologia vegetal (Spaepen e Vanderleyden, 2011; Cusano et al., 2011; Alami et al., 2000; Raaijmakers et al., 2010). De fato, essas moléculas podem conferir aspectos importantes no desenvolvimento vegetal e contribuir com a repressão de possíveis fitopatógenos, que, eventualmente, poderiam se aproveitar de uma imunossupressão do hospedeiro, neste caso, a planta.

Da mesma maneira, as plantas também providenciam um ambiente favorável à proliferação da comunidade de microrganismos presente no solo. Através da rizodeposição, que consiste no depósito de diferentes moléculas na região das raízes, chamada de rizosfera, a colonização pela microbiota é propiciada (Bais et al., 2006). Essas moléculas são utilizadas tanto como substrato direto para sua manutenção celular como também podem atuar como sinalizadores químicos, resultando na indução de diversos processos metabólicos relacionados à divisão celular, proteção e estimulação da expressão de enzimas essenciais em várias rotas metabólicas (Bais et al., 2006). De forma análoga, a planta também é capaz

de captar perturbações exógenas na rizosfera a partir de receptores, os quais identificam proteínas presentes em diversos microrganismos, induzindo à resposta imune da planta contra potenciais parasitas. (Boller e Felix, 2009).

O sistema emergente do conjunto dessas intercorrelações é denominado microbioma da rizosfera ou rizomicrobiota e apresenta uma dinâmica complexa. Através de interações competitivas, mutualísticas e cooperativas o microbioma é moldado formando uma rede de associações entre microrganismo-microrganismo e microrganismo-planta, que resultam no equilíbrio da abundancia das espécies associadas. Esse sistema pode ser definido como o ecossistema da rizosfera e, necessita de um importante mecanismo de recrutamento para que seja efetivamente formado (Lemanceau et al., 2017). O recrutamento de microrganismos na rizosfera ainda permanece com uma série de questões a serem reveladas e pouco se sabe ao certo como a microbiota é selecionada. Apesar disso, postula-se que as plantas, através de um desenvolvimento evolucionário, conforme as linhagens se diferenciaram, aprenderam a minimizar as interferências de microrganismos oportunistas pelo recrutamento de uma microbiota simbiótica (Figura 1), que fosse capaz por meio de processos bioquímicos e micoparasiticos dificultar a proliferação de potenciais patógenos.

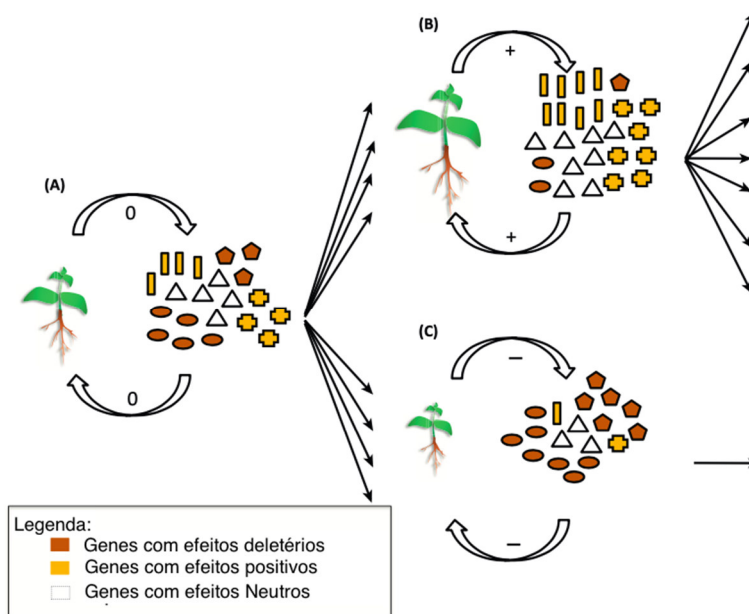


Figura 1. Mecanismo plausível de recrutamento e adaptação da microbiota pela planta. (A) Planta no primeiro estágio de diferenciação da microbiota; (B) Diversificação da microbiota com a transferência horizontal de genes deletérios para o crescimento da planta; (C) Diversificação da microbiota com a transferência horizontal de genes promotores de crescimento. Adaptado de Lemanceau et al. (2017).

Entretanto, a utilização de defensores agrícolas, por um lado é extremamente eficiente em prevenir infecções patogênicas que podem levar a perda de produtividade do cultivar, por outro lado, possui baixa especificidade levando também à morte diversos microrganismos simbióticos. Além disso, o uso de fertilizantes inorgânicos e derivados do petróleo são responsáveis por grande parte do depósito de gases do efeito estufa na atmosfera e também, contribuem para a depleção de fósforo disponível no solo (Vassilev e de Oliveira Mendes, 2018). Esta série de consequências dificulta o recrutamento da microbiota tornando o solo menos funcional e sensível a variações abióticas. Isso é ainda mais intensificado em um sistema intensivo de agricultura, onde regimes de monoculturas são implementadas (Postma-Blaauw et al., 2010).

Contudo, da mesma forma que relações sinérgicas existem, naturalmente, durante o crescimento de plantas, uma forma de estabelecer um solo saudável e funcional, que possa garantir um equilíbrio neste ecossistema contra possíveis perturbações, é baseada na formulação de biofertilizantes. Os biofertilizantes são soluções biologicamente ativas e consistem de unidades vivas (e.g. células, enzimas, material genético) de microrganismos capazes de realizar e melhorar processos biológicos necessários para a manutenção do solo (Flores-Gallegos et al., 2019).

Outros metabólitos secundários podem ser inseridos em bioformulações com o intuito de desenvolver biofertilizantes com características mais abrangentes. Por exemplo, a introdução de metabólitos com características antimicrobianas, sinalizadores, ou até mesmo estimulantes do sistema imune ou de crescimento como fito hormônios, são estratégias que podem melhorar a robustez e efetividade dos inoculantes. Desta forma, biofertilizantes e biopesticidas são os resultados obtidos através das estratégias mencionadas.

Portanto, do contrario da aplicação de agrotóxicos e fertilizantes, o desenvolvimento de produtos sustentáveis com capacidade de promover o crescimento em plantas, não só previne a rizomicrobiota de perder sua multifuncionalidade, mas também são facilitadores do recrutamento de uma microbiota mais equilibrada, que por sua vez reprime a proliferação de unidades patogênicas e estimulam uma resposta rápida do sistema imune de plantas (Richardson et al., 2009). Os principais desafios envolvidos na implementação de produtos com tais características estão relacionados ao processo fermentativo e viabilidade tecnocômica. Em suma, cientistas necessitam lidar com o metabolismo intrínseco de cada microrganismo utilizado, com dificuldades no processo de separação e purificação das biomoléculas alvo, bem como custos relacionados à matéria-prima. Com isso, é

imprescindível que o desenvolvimento de novas técnicas e o estudo do uso de matéria-prima renovável seja constantemente explorado.

2.2 Biosurfactantes

Biosurfactantes (BSs) são moléculas anfifílicas, possuem grupos polares e apolares que podem interagir com outras moléculas hidrofílicas e lipofílicas se alocando na interface de fluidos imiscíveis, bem como na superfície de fluidos. De fato, os BSs possuem propriedades tenso-ativas e emulsificantes, sendo importantes agentes de redução das tensões interfacial e superficial de fluidos, aumentando a mobilidade e miscibilidade de moléculas com diferentes polaridades (Banat et al., 2010). São produzidos por vegetais, animais e em grandes quantidades por bactérias, fungos e leveduras, demonstrando alta seletividade e especificidade (Sachdev e Cameotra, 2013). Em relação aos seus homólogos surfactantes sintéticos, conferem vantagens em sua utilização devido à alta estabilidade físico-química em adversas condições extremas de pH, temperatura e salinidade (Luna et al., 2013), possuem alta biodegradabilidade, biocompatibilidade e conseqüentemente figuram na classe das moléculas ambientalmente ecológicas e sustentáveis (Hirata et al., 2009).

Estas propriedades os fazem atrativos de um ponto de vista processual por suportarem efeitos adversos, entretanto ainda não há comprovada competitividade econômica para que sua implementação industrial em larga escala seja condicionada. É evidente que os BSs são moléculas de alto valor agregado por uma série de fatores, baixa produtividade comparada com outros produtos microbianos, como os biocombustíveis e ácidos orgânicos; são potenciais substitutos de seus homólogos sintéticos (e.g. surfactantes) com amplo espectro de aplicação industrial e, demandam processos de purificações, normalmente, custosos como cromatografia e ultrafiltração (Roelants et al., 2016).

Os BSs podem sofrer subclassificações dependendo de seus grupos funcionais tanto do grupo polar, quanto apolar. As principais categorias diferem-se a seguinte forma: (I) glicolipídios; (II) lipoproteínas ou lipopeptídeos; (III) fosfolipídios, ácidos graxos ou lipídios naturais; (IV) biosurfactantes poliméricos e (V) biosurfactantes particulados (Varjani; Upasani, 2017). Contidos nessas categorias apresentadas, alguns dos biosurfactantes mais estudados podem ser encontrados na Figura 2. Cada subclasse possui características físico-químicas inerentes à sua estrutura química, as quais conferem capacidades funcionais e aplicações de diferentes tipos. Entre eles, destacam-se os glicolipídios por serem os mais

estudados, possuem vantagens no processo de geração e por serem facilmente metabolizados e excretados por seus microrganismos produtores (Wang et al., 2019).

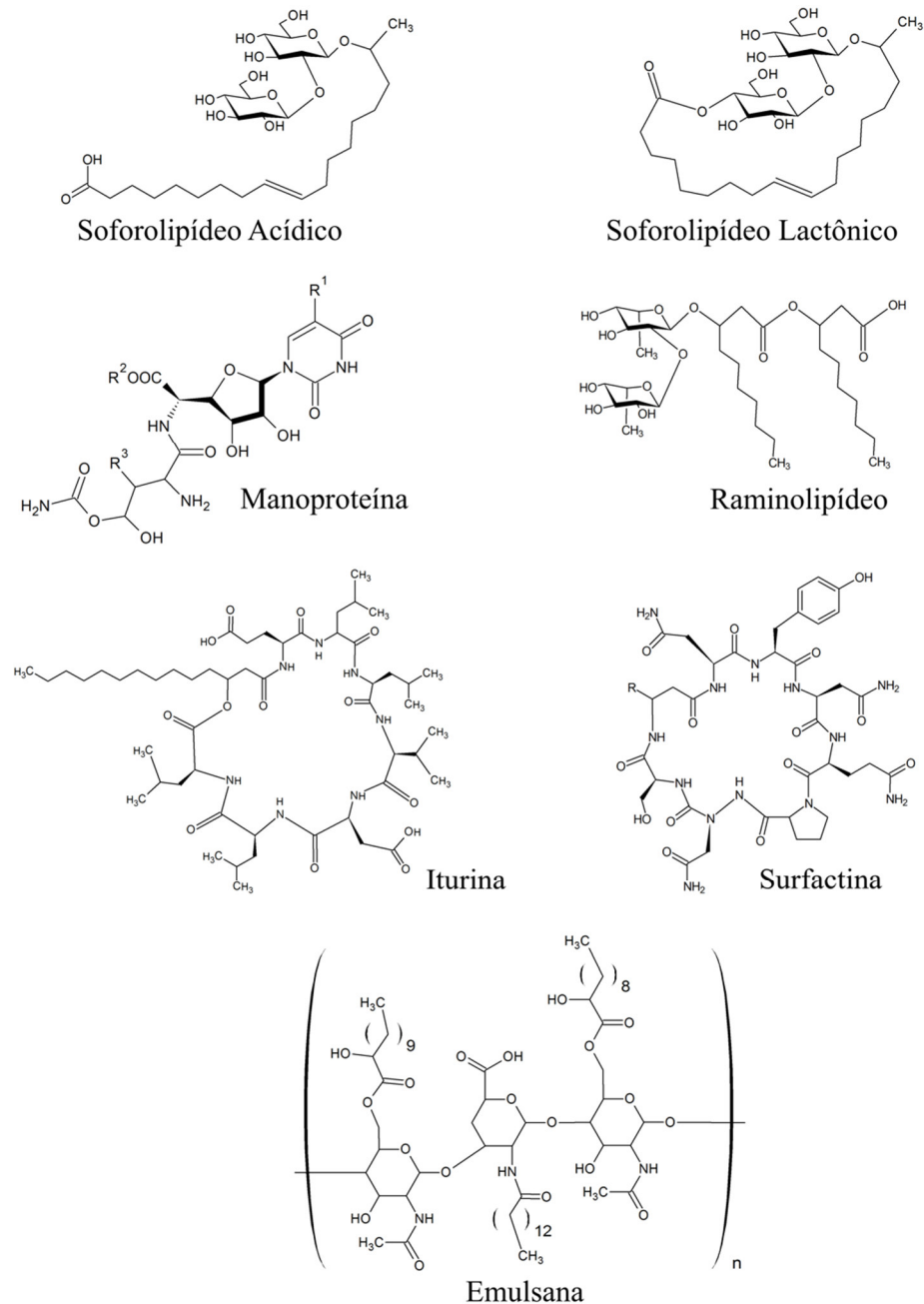


Figura 2. Tipos de biossurfactantes microbianos. Adaptado de Barbosa et al. (2022)

Os glicolípídios por sua vez, consistem de açúcares e lipídios, onde o grupo polar carboidrato é ligado através de uma ligação glicosídica a um grupo apolar alifático de ácido graxo. São biossintetizados em diferentes configurações e proporções dependendo do substrato utilizado para a sua produção. Estas diferenças são expressas de múltiplas formas,

podendo variar o grau de acetilação e quantidade dos monômeros de seus respectivos carboidratos, o tamanho da cadeia carbônica, bem como apresentar grupos hidroxila nas posições terminais ou subterminais no grupo lipídico. (Roelants et al., 2014)

Devido sua complexa estrutura e diversidade de grupos funcionais, eles se comportam similarmente como seus homólogos químicos quando estão dissolvidos em um meio líquido, formando micelas que permitem a captura de partículas hidrofóbicas e diminuindo a tensão interfacial entre dois fluidos pouco miscíveis ou imiscíveis, ocasionando na emulsificação dos mesmos. Isto é apenas possível quando se atinge a sua Concentração Micelar Crítica (CMC), a qual se apresenta em alguns casos menor para BSs em relação aos surfactantes sintéticos (Hirata et al., 2009).

Dentre as diversas aplicações industriais que estas propriedades podem proporcionar, como exemplo detergentes, biorremediação, cosmética, alimentos, farmacêutica, agricultura e mineração, é possível compreender também, princípios e funções que estas moléculas exibem, conferindo efeitos exclusivos e seletivos diante de múltiplas situações (Desai e Banat, 1997). Nota-se, portanto, efeitos como formação de espuma, detergência, emulsificação, de-emulsificação, redução de viscosidade, floculação, dispersão, adsorção e entre outros (Satpute et al., 2010)

Para entender melhor os fenômenos físico-químicos e interações moleculares quando os BSs estão em solução, é necessário que as propriedades tensoativa e emulsificante, bem como o processo de formação de micelas através da CMC sejam propriamente detalhados. Portanto os próximos tópicos deste estudo, elucidam de forma generalizada as características fenomenológicas responsáveis por toda versatilidade química destas biomoléculas.

2.2.1 Propriedades dos BSs

2.2.1.1 Tensoatividade

Moléculas tenso-ativas são chamadas de surfactantes e são caracterizadas como anfifílicas, ou seja, possuem em sua estrutura grupos polares e apolares. Em solução, são adsorvidas na superfície ou na interface entre fluidos. Isso provoca uma alteração nas forças intermoleculares neste contorno. Esta alteração faz com que haja uma redução da energia livre por unidade de área exercida pelas moléculas da superfície de um fluido, ocasionando em uma redução da tensão superficial (Satpute et al., 2010).

Toma-se como exemplo um sistema bifásico entre água/ar, a tensão superficial resultante é a soma das forças de coesão intermolecular e repulsão exercida pelo ar, as quais

fazem a fase líquida (água) se agregar e formar uma superfície com contorno definido. A medida com que um surfactante é adicionado a este sistema, estas forças são reduzidas e, conseqüentemente, esta superfície definida perde sua forma devido à modificação desta tensão de coesão uma vez que o surfactante aumentará a interação entre as interfaces água/ar. De fato, os surfactantes por serem moléculas anfipáticas, são adsorvidas e orientadas de tal forma que sua região polar interage com as moléculas de água, enquanto seu grupo apolar aponta para a superfície do ar.

A Figura 3 ilustra de forma simplificada as mudanças impostas pelos surfactantes em sistemas bifásicos. Este fenômeno pode apresentar propriedades atrativas se, de certo modo há um interesse em modificar a polaridade das superfícies em contato com o tensoativo ou até mesmo aumentar a transferência de massa e calor entre substâncias em fases distintas.

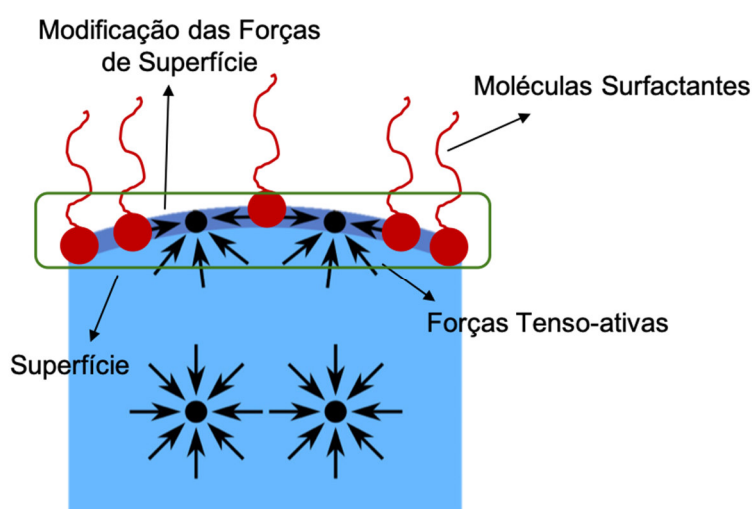


Figura 3. Efeito de moléculas surfactantes quando aplicadas em fluidos com polaridades distintas.

Tipicamente, os surfactantes apresentam uma redução na tensão superficial até atingirem sua CMC (tópico 2.2.1.2). No caso de uma mistura de dois líquidos imiscíveis, tem-se como base o exemplo mais clássico água/óleo, o surfactante se adsorve na interface óleo/água com o grupo hidrofílico direcionado à água enquanto o grupo hidrofóbico (cadeia de hidrocarboneto) apontado para a superfície oleaginosa. Para que haja uma estabilização da emulsão entre estes dois fluidos, o grau de adsorção e orientação das moléculas na interface líquido/líquido deve ser adequada a cada caso. Desta forma, é possível descrever a adsorção das partículas em termos de vários parâmetros de interação como cadeia molecular/superfície, cadeia e superfície do solvente. Portanto, a configuração resultante do surfactante é o resultado destas possíveis interações (Tadros, 2005).

Visando descrever termodinamicamente a interface entre dois fluidos imiscíveis, seja água e ar ou água e óleo, é essencial que esta interface seja definida por variáveis mensuráveis. Com isso, seja a interface de um líquido o limite entre duas fases imiscíveis e densas. Estes dois fluidos distinguíveis podem ser denotados pelas fases α e β , entretanto, no limite da interface entre estes fluidos define-se o plano Z , o qual possui uma espessura específica e propriedades que diferem das regiões α e β (Figura 4). Neste modelo, assume-se as hipóteses de que, ambas as fases α/β possuem propriedades termodinâmicas constantes até atingirem o limite Z e, no caso da interface água/ar, a fase vapor está saturada com a fase líquida (Gibbs, 1928).

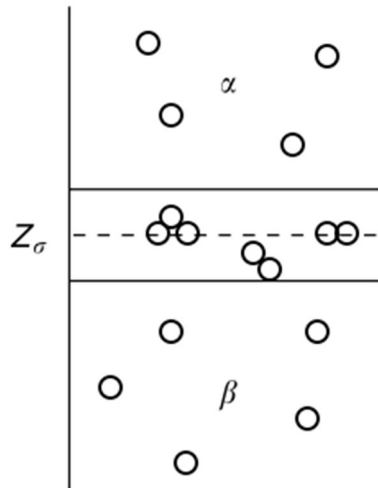


Figura 4. Representação da interface entre dois fluidos imiscíveis. Adaptado de Tadros (2005)

A partir destas hipóteses e modelagem, é possível definir a tensão superficial ou interfacial através da equação de estado de Gibbs-Deuhem, Equação (1):

$$dG^\sigma = -S^\sigma dT + Ad_\gamma + \sum n_i d\mu_i \quad (1)$$

Onde G^σ representa a energia livre da superfície, S^σ a entropia, A é a área da interface, n_i é o número de mols do componente i com um potencial químico μ_i na interface e, por fim, d_γ é o termo referente a variação da tensão interfacial. Em temperatura constante e sem a presença de adsorventes, pode-se rearranjar a Equação (1) evidenciando o termo d_γ , logo, encontra-se a Equação (2) simplificada:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G^\sigma}{\partial A} \right)_{T, n_i} \quad (2)$$

Em uma interface ou superfície estável, a força resultante das interações moleculares deve ser positiva, neste caso, a energia livre (G^σ) aumenta proporcionalmente à área interfacial para manter a tensão constante. Caso haja a adsorção de surfactantes ou BSs esta afirmação não é válida devido ao aumento significativo da área interfacial/superficial, causando a evaporação do líquido no caso água/ar ou a emulsificação de fluidos imiscíveis em água/óleo. Além disso, torna-se evidente que o elemento de tensão superficial (γ) é uma medida de energia por unidade de área de um determinado fluido, podendo ser representada por $[\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}]$, sendo dimensionalmente equivalente à força tangente do fluido por unidade de comprimento, desta forma, $[\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}]$. Portanto, o excesso de energia livre na superfície pode ser equiparado com a tensão superficial no caso de líquidos puros, ou seja, sem a presença de adsorventes.

Para modelar fenomenologicamente a adsorção de surfactantes em superfícies ou interfaces, normalmente, utiliza-se duas interpretações. A primeira delas adotada por Gibbs, o qual trata este fenômeno em um estado de equilíbrio, onde a segunda lei da termodinâmica pode ser aplicada utilizando concentração de superfície. A segunda, trata de uma equação de estado onde o surfactante é representado por um filme com duas dimensões e uma pressão superficial (Tadros, 2005). Para fins de simplificação, será abordado apenas a primeira interpretação com o objetivo de clarificar as variáveis impostas pelo sistema, o comportamento físico-químico dos surfactantes, bem como dos biosurfactantes, especificamente dos soforolipídios que podem ser considerados não-iônicos devido a natural presença de carboidratos ligados à grupos carboxílicos, os quais são fracamente ionizáveis.

Partindo da equação de Gibbs-Deuhem (Equação 2), em temperatura constante e na presença de adsorção, considerando o caso mais simples onde há a presença de dois componentes interagindo em uma mesma superfície, o soluto (surfactante) e seu respectivo solvente (água), encontra-se a Equação (3), a qual representa a interação de adsorção através da variação da tensão superficial e concentração do agente adsorvido (surfactante):

$$\Gamma_{2,1}^\sigma = -\frac{1}{RT} \left(\frac{d\gamma}{d \ln a_2^l} \right) \quad (3)$$

Onde $\Gamma_{2,1}^\sigma$ representa o número de mols de surfactante adsorvido por unidade de área e a_2^L denota a atividade do surfactante que pode ser aproximada à sua concentração molar. Para sistemas de duas fases, o qual é adequado para surfactantes não-iônicos, esta notação se torna válida uma vez que há uma baixa repulsão dos grupos polares que estão orientados na superfície do fluido, resultando em uma forte adsorção. Isto faz com que sejam pouco afetados por variações eletrolíticas como adição de sais ou mudanças no pH.

2.2.1.2 *Concentração Crítica Micelar (CMC)*

Os BSs e seus homólogos sintéticos quando em solução tendem a se agregar formando estruturas complexas de diferentes dimensões e formas. Estas estruturas são denotadas por micelas, as quais são responsáveis pela mistura das fases de diferentes polaridades. As micelas e suas diferentes estruturas resultam das forças de interações intermoleculares, sendo essas repulsivas e atrativas, entre as partes hidrofílica e hidrofóbica. Desta forma, este agregado de moléculas de mesma espécie se aloca na interface entre fluídos imiscíveis aumentando sua interação e solubilização. Em sua grande maioria, as micelas adquirem formas esféricas, embora possam estar orientadas de diferentes formas, como em camadas ou fibras. Mudanças de pH, temperatura, força iônica, e em alguns casos, concentração de surfactante são conhecidas por influenciar a forma de micelas (Satpute et al., 2010). De modo geral, a Figura 5 ilustra de maneira simplificada a estrutura esférica de uma micela.

O termo micela foi introduzido pela primeira vez por McBain (1913) através de ensaios de mobilidade de moléculas altamente carregadas. Para que, portanto, haja uma formação efetiva de micelas há uma concentração mínima de moléculas ou íons necessários que induzem a variação de diferentes propriedades físicas do meio em que estão inseridos. Estas variações ocorrem na região chamada de concentração micelar crítica (CMC). Acima da CMC o sistema torna-se coloidal, onde as forças atrativas permitem as moléculas se agregarem enquanto as forças repulsivas previnem as micelas de atingirem maiores tamanhos físico-quimicamente instáveis (Zajic e Seffens, 1983). Enquanto abaixo da CMC, as moléculas estão dispersas em solução na sua forma de monômeros.

A CMC varia de acordo com o tipo de surfactante e o tamanho da cadeia apolar presente em sua estrutura, sendo que os surfactantes iônicos apresentam maiores valores devido ao aspecto repulsivo de grupos com carga altamente carregadas, afastando assim os

seus similares. Para surfactantes não iônicos há uma grande diminuição da CMC e, de modo geral, quanto maior a cadeia apolar, menor é sua CMC. De fato, a ausência de grupos ionizados resulta em uma menor repulsão intermolecular, o que facilita a formação de micelas e seu aumento de tamanho, além disso, forças de interação molecular atrativas são formadas entre as unidades apolares (Tadros, 2005).

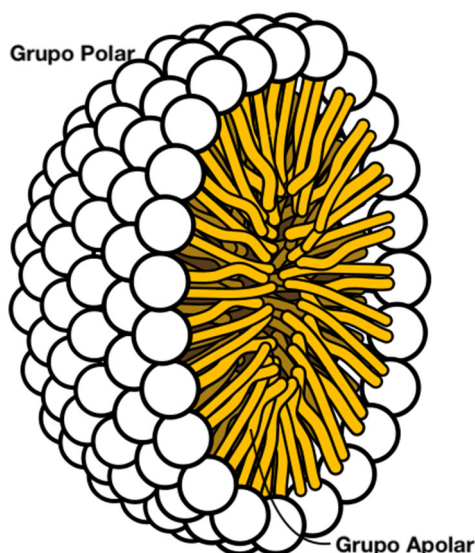


Figura 5. Estrutura esférica de uma micela.

De maneira breve, os surfactantes tendem a formarem estruturas como lipossomas ou apenas um agregado de moléculas, adquirindo funcionalidade e características físico-químicas únicas (Rodrigues, 2015). De fato, por possuírem apenas uma cadeia de hidrocarboneto, transitam tanto em unidades pequenas de micelas quanto grandes, dependendo da concentração molecular diluída no sistema aquoso e do número de agregação (Tanford, 1980). Em um ponto de vista industrial, este aspecto esboça grande atratividade devido sua versatilidade na aplicação, uma vez que é possível modificar a dinâmica micelar e seu comportamento em solução.

Com respeito ao número de agregação, este pode ser determinado por diferentes métodos como difração de luz, equilíbrio de diálise e osmometria (Zajic e Seffens, 1983). A título de curiosidade, tamanho Micelar pode ser aferido a partir de análises de microscopia eletrônica de crio-transmissão (Egelhaaf et al., 1998), enquanto a combinação entre ultracentrifugação e microscopia eletrônica se apresenta também como ferramenta útil para identificar densidade e peso molecular de micelas (Vogel et al., 2003).

Há uma série de flutuações quantitativas em parâmetros químico, eletroquímico, físico-químico e físico que indicam a ocorrência e formação de micelas em um sistema aquoso. De fato, mudanças na condutividade equivalente, pressão osmótica, turbidez, ressonância magnética, difusão, e tensão superficial fazem parte do conjunto de variáveis que estão sujeitas às variações abruptas conforme a adição de surfactante no sistema é realizada (Margaritis et al., 1979; Tadros, 2005). Um exemplo disto, a mínima tensão superficial que um fluido pode atingir, bem como as forças interfaciais entre dois fluidos está diretamente associado com a CMC. Como se pode observar na Figura 6, uma vez atingido a CMC, a tensão superficial apresenta não mais variações significativas em seu valor absoluto. Fenômeno o qual é consistente com o fato de que acima desta concentração, tensoativos ou moléculas surfactantes tendem a se associarem e formarem micelas.

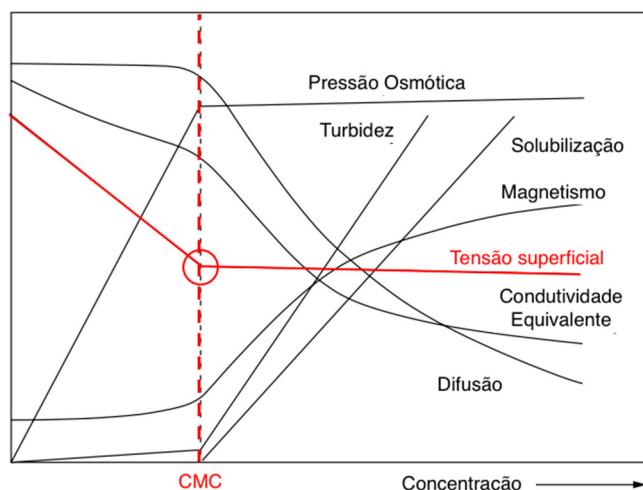


Figura 6. Variação de propriedades físico-química de fluídos pela variação da concentração de surfactantes. Adaptado de Tadros (2005)

Devido a sua relativa simplicidade de procedimento e reprodutibilidade, normalmente, os valores de CMC são obtidos a partir de ensaios de tensão superficial (γ). Outros métodos também podem ser aplicados como medidas de difusão, ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de fluorescência (Mukerjee e Mysels, 1971). De um ponto de vista cinético químico, a formação de micelas e a agregação de moléculas em uma estrutura complexa é dependente da força iônica do meio que está solubilizado e da temperatura implementada no sistema. Neste contexto, muitos cientistas utilizam de técnicas como raio-X, difração de luz e difração de nêutrons para apontar as diferentes formas e formatos possíveis de micelas. Nota-se também que as interpretações variam de acordo com o autor e diferentes conclusões podem ser extraídas em relação às suas formas.

Resumidamente, as formas esféricas podem sofrer distorções e, estão preferencialmente dispersas no sistema, havendo desta forma um equilíbrio e interação entre os monômeros dos surfactantes e seus respectivos estados agregados (micelas) (Tadros, 2005; Debye e Anacker, 1951).

Há diversos fenômenos que resultam do processo de formação de micelas, dentre eles, a emulsificação de fluidos pouco miscíveis e formação de coloides se demonstram atrativos uma vez que isto pode possuir vantagens em processos respectivos da indústria petrolífera, alimentos, agricultura, farmacêutica e entre outras. Para compreender de maneira mais detalhada a formação de emulsões, o tópico seguinte tem como objetivo elucidar a dinâmica de formação de emulsões bem como seus efeitos adversos nas propriedades físicas de um sistema coloidal.

2.2.1.3 *Emulsões e Efeito Emulsificante de Tensoativos*

Tomando em consideração o mesmo exemplo utilizado nos tópicos anteriores, sendo de um sistema bifásico, seja água/ar, água/óleo ou água/sólido, tem-se que diferentes denominações são dirigidas para cada caso. Como resultado, no primeiro, a dispersão de ar em água é chamada de espuma, emulsão e suspensão, respectivamente, para óleo em água e sólido em água. Em todas estas situações, a água, em maior concentração, é denominada por fase contínua do sistema, apresentando alta tensão interfacial livre devido às fortes interações intermoleculares. Por outro lado, considerando a fase dispersa, óleo, este sofre alta repulsão do sistema pela diferença de polaridade entre com respeito a fase contínua e, simultaneamente através de interações de Van der Waals, atrações intermoleculares de mesma natureza são estabelecidas. Isto faz com que as moléculas de óleo coalesçam, formando gotículas de tamanhos cada vez maiores e, pela diferença de densidade sofrem separação espontânea do sistema devido à ação da força gravitacional, formando por fim, uma camada alocada na superfície do sistema quando a sua densidade (ρ) é $\rho < 1$ ou sedimentando no fundo do sistema quando $\rho > 1$ (Daltin, 2011).

Este esquema mostra a dispersão de um líquido imiscível ou pouco miscível em outro formando, portanto, uma emulsão. De uma certa maneira, nenhuma emulsão em sua natureza é verdadeiramente estável, de modo que, naturalmente, as gotículas de óleo dispersas na fase contínua se agregam para diminuir a energia livre do sistema através de um aumento da entropia total (Mulqueen, 2003) conforme a segunda lei da termodinâmica aplicada neste caso para sistemas bifásicos em emulsificação (Equação 4).

$$\Delta G = \Delta A_{\gamma} - T\Delta S \quad (4)$$

Note que o termo ΔA_{γ} em sistemas onde não há adsorção de moléculas na interface de dois fluídos é relativamente maior que o termo de entropia ($-T\Delta S$), resultando em uma alta energia livre de Gibbs, a qual pode ser interpretada por um sistema instável. Portanto, é evidente que para que estas emulsões se estabilizem, moléculas que são capazes de neutralizar ou reduzir a tensão interfacial existente são requeridas, de forma que possam se estabelecer na interface entre os fluidos e diminuir a repulsão inerente de suas diferentes naturezas.

De fato, conforme adiciona-se moléculas tensoativas como os BS e surfactante neste sistema, devido ao seu caráter anfifílico, são preferencialmente alocadas na superfície das gotículas da fase hidrofóbica, com sua parte apolar direcionada para o interior da gota, enquanto sua parte polar aponta para fase aquosa. Desta forma, as estruturas resultantes são como micelas formadas pelo englobamento do óleo que foi permitido pelo decréscimo da tensão interfacial mediada pelo surfactante e, com isso, estabilizando as emulsões formadas (Satpute, 2010).

A estabilização de emulsões é dada por dois tipos de processos: (I) eletrostático e (II) efeito estérico (Mulqueen, 2003). Ambos são dependentes do tipo de surfactante utilizado, sendo que para estabilizações do tipo (I), surfactantes iônicos (aniônicos e catiônicos) são implementados e, estabilizações do tipo (II) são obtidas através de surfactantes não-iônicos.

Em (I) as superfícies das gotículas de óleo são eletricamente carregadas, atraindo desta forma, contra íons presentes na fase aquosa e formando uma camada elétrica. Ampliando isto para o sistema como um todo, a probabilidade de as gotículas coalescerem será baixa devido a repulsão das camadas de mesma carga formadas na superfície das gotas. Em (II), a estabilização se dá a partir do impedimento estérico realizado pelo grupo polar do surfactante alocado na superfície da gotícula. Isto é apenas possível quando moléculas tensoativas são adicionadas em excesso no sistema, em outras palavras, acima de suas CMCs e, como em todo caso, há um limite de saturação destas moléculas na superfície da fase interna.

Finalmente, diante dos aspectos teóricos apresentados, conclui-se que um BS funciona como um emulsificante através da estabilização e redução das gotículas dispersas, fazendo com que se reduza a diferença entre as densidades relativas das fases interna e contínua, conseqüentemente aumentando a viscosidade relativa. Estes princípios podem ser unidos visando a formulação de produtos de alto valor agregado na indústria de cosméticos,

farmacêutica e na agricultura. De fato, casos em que se deve aumentar o tempo de contato das substâncias ativas com o hospedeiro alvo, como por exemplo na agricultura, bioinsumos que levem em sua composição BSs podem ser vantajados, devido à sua alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, além de suas características antimicrobianas e tenso-atividade que permitirá maior contato com a planta alvo, resultando em um tempo prolongado de ação e minimização de excessos.

2.2.2 Soforolipídios: Produção e Aplicações

2.2.2.1 Estrutura Química e Microrganismos Produtores

Os soforolipídios (SLs) são glicolipídios formados por um grupo lipofílico de cadeia carbônica variando entre C16 – C20, apresentando uma hidroxilação (-OH) na posição terminal (ω) ou subterminal ($\omega-1$) e insaturações ao longo de sua estrutura que variam entre 0 – 2. (Tulloch et al., 1962; Davila et al., 1994). Sua porção hidrofílica é composta por um dímero de glicose com uma ligação glicosídica na posição β -(1–2), resultando em um dissacarídeo chamado de soforose, o qual pode apresentar diferentes graus de acetilação (grupo acetato) em sua estrutura nas posições 6' ou 6'' de seus respectivos monômeros (Roelants et al., 2019). Sua primeira identificação através de síntese microbiana (processo fermentativo) é datada desde 1961 com a utilização da levedura *Torulopsis magnoliae* em um trabalho marcante feito por Gorin et al. (1961).

Os SLs são normalmente subdivididos em duas classes principais: (A) soforolipídios lactônicos (SLL); (B) soforolipídios ácido (SLA), representados pela Figura 7.

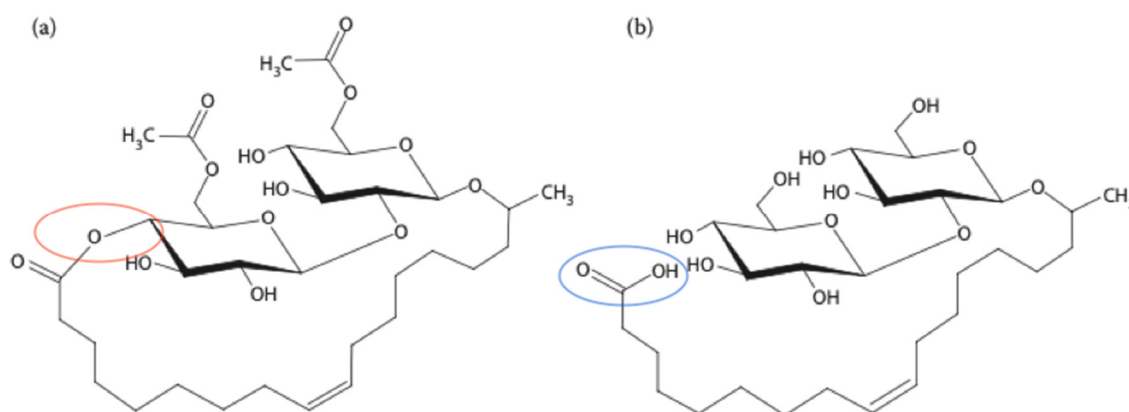


Figura 7. Principais Estruturas Químicas dos Soforolipídios. (a) Soforolipídio Lactônico; (b) Soforolipídio Ácido. O círculo vermelho representa a ligação lactônica entre o grupo carboxila e o segunda molécula de glicose. O círculo azul representa o grupo funcional carboxila. Adaptado de Kosaric e Vardar-Sukan (2015).

Para a classe dos SLL, uma macroestrutura cíclica é formada a partir de uma ligação lactônica (éster cíclico) entre o 4º carbono do segundo anel de glicose do dímero sofrorose e a terminação carboxílica da parte lipídica do biossurfactante (Tulloch et al., 1967). No caso dos SLAs, a terminação carboxílica permanece intacta em sua forma ácida, resultando em uma estrutura acíclica e sujeita à desprotonação dependendo do pH. Todas as diversificações demonstradas são dependentes do metabolismo do microrganismo, da natureza e tipo de matéria-prima (fonte de carbono) e, dos parâmetros de processo utilizados na produção (pH, aeração, modo fermentativo, concentração de substratos) (Davila et al., 1997; Guilmanov et al., 2002)

Em (A), nota-se uma estrutura com uma ligação éster entre o terminal carboxílico da parte hidrofóbica e o segundo monômero de glicose, resultando em um anel fechado sem possibilidade de ionização do ácido graxo, o que o torna uma molécula cíclica. Enquanto em (B), o anel está aberto, com o grupo carboxílico susceptível ao ataque de substâncias básicas em solução. Esta diferença confere um caráter mais ácido para a estrutura (B) e, conferindo diferentes propriedades físico-químicas. Dentre elas, a simples solubilidade em solventes de diferente polaridade e pH é alterada. Em faixas menores de pH, os SLL são mais solúveis devido ao ser caráter mais básico. A medida com que a faixa de pH de solução aumenta, há uma inversão de solubilidade, tornando os SLA mais solúveis devido a neutralização de seu caráter mais ácido. Isto também procede para o tipo de solvente utilizado, variando sua polaridade, obtém-se diferentes razões de solubilização entre SLL/SLA (Hu e Ju, 2001).

É válido mencionar que suas propriedades tensoativas são mantidas dentro uma ampla faixa de variação de pH e concentração salina. De fato, um notável trabalho de Shah et al. (2017) mostra que entre pH 2 – 10 e para concentrações salinas de NaCl até aproximadamente 20% (m/v), o SL produzido manteve-se estável um vez que os valores obtidos de tensão superficial foram constante, enquanto acima destas faixas (pH > 10; [NaCl] > 20%) a biomolécula perde sua capacidade de redução de tensão, abruptamente.

Notavelmente, existem diversos microrganismos nativos capazes de produzi-los por via fermentativa, *Candida riidocensis*, *Candida kuoi*, *Candida stellata*, as quais foram leveduras identificadas como produtoras de SL (Kurtzman et al., 2010) e apresentam diferentes respostas metabólicas em relação aos tipos produzidos, sendo SLA sintetizado em maiores quantidades em relação ao SLL. No caso de *C. kuoi* há a ocorrência também de SL polimérico, o qual apresenta duas moléculas de SLs ligadas pela carboxila terminal da parte hidrofóbica. Outras leveduras pertencentes à mesma espécie *Candida* spp. como *Candida apícola* (conhecida previamente por *T. magnoliae*) (Gorin et al., 1961), *Candida batistae*

(Rosa et al., 1999), *Candida florícola* (Imura et al., 2010) e entre outras que se mostraram industrialmente irrelevantes e não atrativas devido à baixa produtividade (Roelants et al., 2019).

Dentre os microrganismos até hoje explorados com potencial produção de SL, *Starmerella bombicola*, inicialmente referida por *T. bombicola* ou *C. bombicola*, destaca-se pela sua alta produtividade e capacidade de produzir SL em grandes concentrações (>200 g/L) (Daniel et al., 1998; Davila et al., 1997). Foi encontrada e isolada pela primeira vez em 1970 presente no mel (Spencer et al., 1970). Sua sobrevivência neste habitat demonstra que possuem alta tolerância em concentrações elevadas de glicose, isto faz com que sejam osmotolerantes. Documenta-se na literatura uma variedade de 23 homólogos de SLs incluindo porções acídicas e lactônicas produzidas por uma mesma linhagem selvagem de *S. bombicola* (Davila et al., 1993). Seu mecanismo metabólico inato, enzimas envolvidas na biossíntese de SL, moléculas moduladoras, estratégias de produção e suas aplicações, principalmente, envolvendo estratégias agrícolas serão descritas detalhadamente nas próximas seções deste trabalho.

2.2.2.2 *Aplicações de Sforolipídeos na Agricultura*

Este tópico destina-se em demonstrar, especialmente, a aplicação promissora de SLs no setor da agricultura como substância de controle biológico de potenciais fitopatógenos, promotor do crescimento em plantas e os seus efeitos indiretos, que diante de sua aplicação no solo, podem emergir.

Como relatado anteriormente, os SLs apresentam uma estrutura química anfifílica, podendo ser levemente aniônico dependendo de sua estrutura acídica (SLA) e, interação com moléculas de diferentes polaridades. Dependendo do método de análise e condições, sua CMC pode variar de 11 a 250 mg/L (Develter; Laurysen, 2010). Formam micelas acima de sua CMC que podem servir como lipossomas ou vesículas aprisionando em seu interior moléculas apolares como óleo, enquanto em sua superfície exterior interagir com moléculas polares como água. Reduzem a tensão interfacial entre dois fluidos imiscíveis e superficial entre ar e água em uma magnitude que pode superar os surfactantes sintéticos. Conforme o grau de ionização aumenta, cargas negativas são alocadas na superfície das micelas, modificando a forma, estado de agregação e, propriedades de superfície (Baccile et al., 2012). Apresentam boa estabilidade de suas propriedades tenso-ativas em diferentes condições de pH, salinidade e temperatura. No entanto, estas mesmas propriedades

mencionadas podem ter diferentes efeitos dependendo do modo (concentração, utilização de suportes e etc.) e área de aplicação.

De fato, em geral, emergem-se aplicações na indústria de alimentos, médica, biorremediação, setor de limpeza, agricultura, síntese de nanopartículas e entre outras (Rivera et al., 2019). Estes são alguns dos exemplos de possíveis aplicações, nas quais os SLs atuam de diferentes maneiras e seus mecanismos de ação variam de acordo com seu propósito. O seu protagonismo e difusão no mercado deve muito à sua maior produtividade com respeito aos outros tipos de BSs, tendo o maior compartilhamento no mercado de biossurfactantes, o qual foi avaliado em 2016 em torno de USD 3,99 bilhões com um crescimento de 5,6% ao ano e projetado a atingir USD 5,52 bilhões em 2022 (Hu et al., 2021). Desta maneira, é de extrema importância que a busca contínua pela viabilização da produção desta molécula persista para que sua aplicação nos setores mencionados seja eficientemente difundida.

Com respeito aos seus homólogos sintéticos, os surfactantes são classificados como adjuvantes em pesticidas devido ao seu mecanismo de ação de ativação da substância principal de determinada formulação. Muitos desses surfactantes utilizados na agricultura são tóxicos para os humanos e para a vida marinha, além de possuírem baixa biodegradabilidade, o que os fazem persistir longos períodos acumulados nos solos e efluentes. Portanto, é imperativo que uma opção mais sustentável, de menor impacto deletério às formas de vida seja consolidada, de forma que, progressivamente, os surfactantes sejam substituídos totalmente ou parcialmente, das inúmeras formulações de agrotóxicos.

Considerando que para um melhor desempenho da aplicação de pesticidas quatro quesitos chaves devem ser cumpridos: (1) características físicas da gotícula do spray, (2) depósito formado na superfície da folha, (3) penetração dos compostos na cutícula da folha e, (4) penetração nos tecidos do local de aplicação (Holloway e Stock, 2013). Desta forma, a implementação de surfactantes promove a solubilização, a maior transferência de massa entre as substâncias ativas e a folha e, uma maior taxa de penetração devido ao potencial de infiltração no estômato da planta pelo surfactante (Tadros, 2005). Devido aos motivos e características mencionadas, o uso de surfactantes se torna, basicamente, mandatório nas inúmeras formulações e estratégias adotadas na agricultura (Mulqueen, 2003).

Portanto, é de extrema importância que os BSs apresentem baixa ou nula toxicidade ao meio ambiente. De fato, foram demonstrados que os SLs são rapidamente degradados conforme determinado pelos métodos padronizados de respirometria manométrica e estudo

de estabilidade de metabólitos, apresentando alta biodegradabilidade (Hirata et al., 2009; Renkin, 2003). Sua toxicidade aquática é em magnitude 10 vezes menor comparado a seus homólogos sintéticos, apresentando nenhuma interferência no metabolismo reprodutivo de *Daphnia* (Renkin, 2003). Entretanto, apesar de muitos dos BSs já identificados não apresentarem toxicidade e não influenciarem sistemas aquáticos, propriedades larvicida e antifúngica contra potenciais patógenos de planta como *Botrytis cineria* foram observadas anteriormente (Yoo et al., 2005).

Especificamente, no caso dos SLs, uma inibição no crescimento de alguns fungos e bactéria gram-positiva, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecium*, *Propionibacterium acnes* e *Corynebacterium xerosis* foi averiguada (Kosaric e Vardar-Sukan, 2014). A capacidade dos SLs de modificar a hidrofobicidade de paredes celulares de diferentes microrganismos é um plausível mecanismo para que, eventualmente, ocorra a lise celular de células expostas à esta biomolécula. Isto foi postulado após a identificação do vazamento de enzimas intracelulares em um tratamento de *B. subtilis* (Kim et al., 2002). Além disso, promoção de germinação e crescimento em plantas induzido pela aplicação de SLs também foi observado em outros estudos, onde uma maior taxa de germinação em sementes de *Avena sativa*, *Lupinus luteus*, *Pisum sativum*, *Sinapsis alba* e *Zea mays* foi obtida após um tratamento prévio das sementes com SLs (Krawczynska et al., 2012).

Portanto, os SLs, além de representarem um papel adjuvante em formulações para a agricultura, podem funcionar como moléculas ativas na inibição do crescimento de potenciais patógenos. Essa característica reforça a necessidade da exploração destas moléculas em sistemas de agricultura ecológica, onde o objetivo não consiste em apenas alta produtividade, mas também em desenvolver metodologias de recuperação da funcionalidade do solo, resultando um vigor no crescimento de cultivares. Adiante, será discutido em maiores detalhes as formulações estabelecidas no mercado, bem como suas respectivas estratégias de aplicação e patentes vigentes (tópico 2.4)

2.2.3 *Starmerella bombicola*: Habitat, Aspectos Morfológicos e Bioquímicos

2.2.3.1 *Habitat*

Muitas das linhagens de *Starmerella bombicola* são encontradas em abelhas ou lugares que são usualmente visitados por abelhas, como flores, néctar e pólen (Rosa et al., 2003; Inglis et al., 1993). Há diversas regiões onde outras leveduras pertencentes à mesma

linhagem evolutiva de *S. bombicola* foram isoladas como América do Norte e Central, Europa, Ásia, Ilhas do Pacífico e África do Sul, isto demonstra uma capacidade adaptativa expressiva do microrganismo pela abrangência de condições climáticas e habitats (Lachance et al., 2011).

Em insetos, é encontrada usualmente em abelhas do gênero *Bombus* (Spencer et al., 1970), em espécies de *Bombus pratorum* (Espanha), *Bombus lapidaries* (Alemanha) e em associação com *Megachile rotundata*, presente especialmente no néctar e pólen (Lachance et al., 2011; Inglis et al., 1993). Além disso, também é encontrada em associação com espécies de besouros como *Conotelus obscurus* e *Aethina concolor*, assim como foi também isolada de flores de plantas da espécie *Calystegia sepium* e no néctar de *Knautia longifolia* (Rosa e Lachance, 1998; Lachance et al., 2011).

2.2.3.2 *Bioquímica e Metabolismo*

S. bombicola apresenta crescimento aeróbico facultativo, podendo na ausência de oxigênio apresentar metabolismo fermentativo e se destaca de outras leveduras devido ao seu alto potencial em assimilar fontes hidrofóbicas de carbono como lipídios, ácidos graxos, alcanos, ésteres de ácidos graxos e entre outros (Davila et al., 1994; Ashby et al., 2006; Cavaleiro e Cooper, 2003). Sua limitação em relação à assimilação de carboidratos faz com que glicose seja preferencialmente utilizada a outros como xilose, maltose, lactose e arabinose. Entretanto, apresenta bom crescimento em glicerol, fato que pode ser aproveitado em indústrias que o possuem como subproduto de processo.

Além disso, é classificada como osmotolerante, podendo suportar condições extremas de concentrações de glicose como 500 g/L, apresentando 24% de crescimento de biomassa em relação à meios com 20 g/L de glicose (Ruyters et al., 2015). A temperatura ideal de cultivo para o crescimento celular varia de acordo com a linhagem isolada. Quando isoladas de climas frios, pode apresentar crescimento à 4°C, e ótimo desenvolvimento entre 29 – 32°C. Para linhagens de climas mais quentes, apresentam crescimento entre 8 – 10°C, e taxas ideais de desenvolvimento são obtidas entre 32 – 34°C (Lachance et al., 2011)

Dependendo das condições de cultivo, se apresenta como uma levedura oleaginosa. Desta forma, quando há uma limitação da produção de SLs e ausência de carbono lipofílico no meio de cultivo, há a ocorrência do acúmulo de lipídios intracelulares. O conteúdo de triglicérides aumenta conforme o crescimento celular atinge a fase estacionária. Apesar de que não há evidências de que esses lipídios representem mais do que 20% (m/m) da biomassa

devido a falta de quantificação, o acúmulo de gotículas de gordura foi identificado por microscopia eletrônica de transmissão (Alcon et al., 2004).

2.2.3.3 *Reguladores do Metabolismo de SLs*

Seu metabolismo de SLs é fortemente regulado pelas concentrações de fósforo e nitrogênio, tornando-os elementos essenciais na regulação enzimática das proteínas envolvidas diretamente e indiretamente em sua síntese, principalmente, em enzimas do ciclo do ácido cítrico. As proporções ótimas C/N e C/P dependem de outros fatores como fonte de nitrogênio utilizado e tipo de substrato, e estão sujeitas às variações para cada caso (Albrecht et al., 1996; de Graeve et al., 2018). Considerando estes fatores, há diversos meios reportados, os quais foram elaborados e otimizados visando a maior produção de SLs, sendo possível atingir concentrações finais maiores que 100 g/L (Roelants et al., 2016). Como exemplo, é relatado na literatura que meios complexos como extrato de levedura é um grande regulador da produção de SL, sendo que em concentrações até 5 g/L estimula-se a síntese de SL em sua forma lactônica, enquanto que entre 5- 10 g/L sua forma acídica é prevenida (Casas e García-Ochoa, 1999). Para outros autores a combinação entre extratos e diferentes minerais pode proporcionar um melhor desempenho em sua biossíntese (Lang et al., 2000; Van Renterghem et al., 2019; Casas et al., 1996)

Com respeito a sua estrutura química, é possível afirmar que os SLs derivados de *S. bombicola* são dependentes da fonte hidrofóbica do meio de cultivo. A simples alteração entre óleo de soja e óleo de girassol, ou ainda ácido oleico e ácido esteárico pode resultar em proporções extremamente distintas de cada homólogo de SL sintetizado (Asmer et al., 1988). Outra importante relação entre SL e substrato reside no efeito da suplementação com alcanos. Nesses ensaios os SLs derivados dessas fontes tendem a estar em sua forma cristalina, enquanto para substratos como ácidos graxos são obtidos na forma de gomas oleaginosas. Além disso, para alcanos de comprimentos de cadeia entre C12 – C16 o transporte ao meio intracelular é facilitado e, conseqüentemente, um melhor rendimento de SLs é obtido. A medida com que a cadeia carbônica aumenta (C17 – C20), há a diminuição do rendimento de síntese (Cavalero e Cooper, 2003).

A incorporação direta da fonte hidrofóbica ao SL faz com que sua estrutura seja extremamente variável. Intuitivamente, é esperado que quanto maior a incorporação direta maior será a síntese de SL. No entanto, ao suplementar alcanos de diferentes tamanhos de cadeia notou-se que compostos como pentadecano e heptadecano possuem uma das maiores

porcentagens de incorporação direta, 80% e 90%, respectivamente. Em contrapartida, maiores rendimentos foram obtidos com hexadecanos e ácidos graxos de cadeia com 18 carbonos (Cavalero e Cooper, 2003). Apesar de neste último caso, tenha-se obtido uma síntese mais eficiente e que grande parte dos SLs produzidos apresentarem estruturas lipídicas com 18 carbonos, este não é um exemplo significativo de incorporação direta uma vez que porções lipídicas com 16 carbonos saturados ou com uma instauração também foram identificadas.

2.2.3.4 Via Metabólica e Regulação: Principais Enzimas e Cofatores

Envolvidos

A síntese de SLs exige um sistema de conjunto enzimáticos robusto e precisamente regulado, podendo ser modulado alostéricamente por diversos fatores exógenos. Como mencionado nos tópicos anteriores, a presença de uma fonte hidrofóbica represente um indutor ou modulador alostérico positivo deste conjunto de enzimas. Este conjunto é orquestrado, especificamente, pelo citocromo P450 mono-oxigenase (CYP52M1). Este complexo proteico codificado por CYP52M1 é responsável pela primeira etapa de síntese dos SLs, na qual é realizada a hidroxilação da cadeia carbônica lipídica na posição terminal (ω) ou subterminal ($\omega-1$) (Van Bogaert et al., 2013). A afinidade entre os substratos hidrofóbicos, bem como pela sua inserção na molécula de SL é fortemente governada pelo citocromo P450. Normalmente, este complexo possui alta afinidade por ácidos graxos como ácido esteárico (C18:0) ou até mesmo ácido oleico (C18:1) embora já tenha sido reportado trabalhos onde intermediários de 16 carbonos tenham sido encontrados nas estruturas de SLs (Ashby et al., 2008; Tulloch et al., 1962).

O mecanismo de síntese de SL pode ser representado por um sistema de 6 etapas enzimáticas, das quais as etapas 1, 2 e 3 são essenciais e limitantes para sua produção. Dentre as etapas 4, 5 e 6 apenas a 5 tem a função de transportá-lo ao meio extracelular com o gasto de uma molécula de ATP. A ilustração esquemática da via metabólica, geralmente presente em *S. bombicola* pode ser representada pela Figura 8.

Portanto, em (1) tem-se a hidroxilação da cadeia lipídica (posição ω ou $\omega-1$) catalisada pelo citocromo P450 com o gasto de uma molécula do cofator NADPH, oxidando-o a NADP⁺ (Van Bogaert et al., 2013). Este cofator pode ser disponibilizado pela sua própria concentração intracelular fornecida a partir de vias como pentose fosfato ou até mesmo β -oxidação de lipídios, as quais também são fontes importantes de precursores de constituintes

celulares como DNA, RNA, amino ácidos e membranas celulares. Cofator NADPH também pode ser disponibilizado através da atividade da enzima málica a qual converte malato em piruvato por meio de reações anapleróticas, também para a regeneração ou síntese de constituintes celulares como amino ácidos. O citocromo P450 está presente em células eucariontes e apresenta uma série de outras funções essenciais responsáveis pelo metabolismo de hidrocarbonetos (Denisov et al., 2005). Dentre elas, para este caso aplica-se a mono-oxigenação por meio da hidroxilação a fim de que a molécula esteja em seu estado de maior energia para a próxima etapa da síntese de SL.

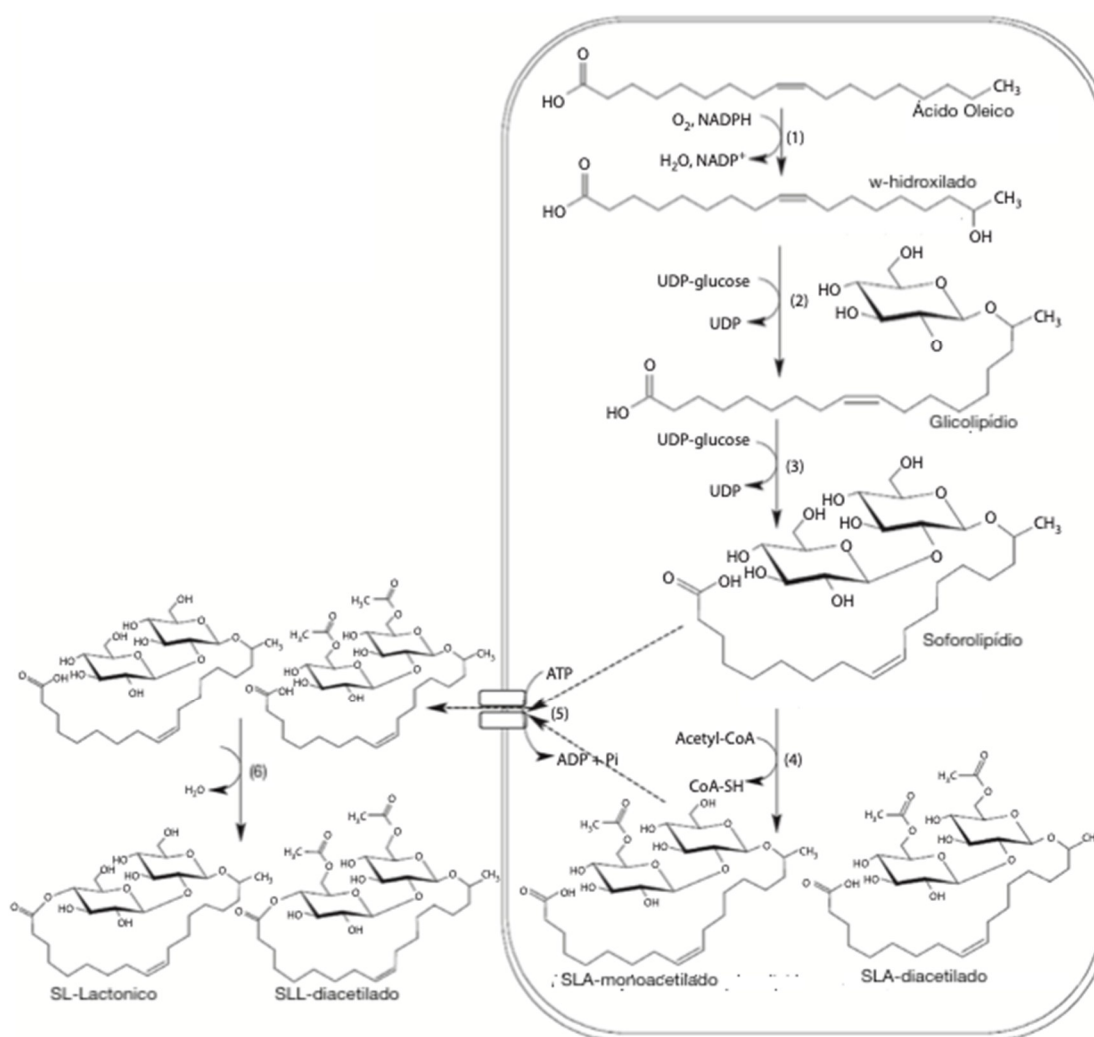


Figura 8. Via metabólica da produção de Soforolipídios pela Levedura *S. bombicola*. (1) ω -hidroxilação catalisado pelo Citocromo P450; (2) glicosilação catalisada pela enzima UGTA1; (3) glicosilação de glicolípídios catalisada pela enzima UGTB1; (4) acetilação de SL catalisada pela enzima at; (5) transportador de SLs; (6) lactonização de SLAs catalisada pela enzima SBLE. Adaptado de Kosaric e Vardar-Sukan (2015).

Assim, em (2) ocorre a glicosilação do terminal hidroxilado inserindo um monômero de glicose através de uma ligação glicosídica. Nesta etapa a enzima UDP-glicosiltransferase

(UGTA1) catalisa esta reação carregando uma molécula de glicose proveniente de outros fluxos metabólicos como pentose fosfato ou glicólise e inserindo-a na molécula precursora de SL sem gasto de ATP ou sem a necessidade de cofatores enzimáticos. Esta enzima UGTA1 foi identificada por Saerens et al. (2010) através de um design de sequenciamento de genes que resultou ao final em uma linhagem ausente do gene *ugtA1*, responsável por codificar a expressão de UGTA1. Esta linhagem de *S. bombicola* Δ *ugtA1* foi submetida a ensaios enzimáticos e comparados com uma linhagem selvagem. A partir disto notou-se que as linhagens Δ *ugtA1* não apresentaram atividades detectáveis de glicosilação em precursores lipídicos nos ensaios enzimáticos, assim como também não apresentaram síntese de SLs. Estes resultados mostraram que a enzima UGTA1 desempenha um papel crucial e limitante na produção de biossurfactantes pela levedura *S. bombicola* (Saerens et al., 2010).

Neste ponto, a molécula de SL se encontra como um glicolipídio, levando em sua estrutura um monômero de glicose e um corpo lipídico de ácido graxo. Assim, com o objetivo de preparar a molécula para os consecutivos passos de síntese, em (3) a enzima UDP-glicosiltransferase UGTB1 é encarregada de transferir mais um monômero de glicose, integrando-o à estrutura resultando. Em contrapartida, a especificidade desta enzima é estritamente relacionada à hidroxila da posição 2' do primeiro anel de glicose. É importante mencionar que as enzimas UGTA1 e UGTB1 apesar de desempenharem funções similares e devido à este fato é comum assumir que as suas atividades possuem papéis redundantes. No entanto, UGTB1 é seletivamente expressada e modulada por glicolipídios, em outras palavras, não apresentam atividade quando são submetidas à ensaios enzimáticos nos quais apenas ácido graxo é utilizado como substrato ou acceptor (Saerens et al., 2010).

Para confirmar esta hipótese, a identificação e caracterização funcional do gene *ugtB1* presente em *S. bombicola* ATCC 22214 foi realizada e posteriormente excluído com o intuito de criar uma linhagem mutante, sendo *S. bombicola* Δ *ugtB1*, capaz de sintetizar biossurfactantes diferentes dos provenientes do sistema inato de *S. bombicola* e com propriedades modificadas. De fato, após este procedimento a levedura passou a sintetizar apenas glicolipídios, indicando que a enzima UGTB1 possui especificidade única para moléculas de glicolipídios e, que UGTA1 não se apresenta como uma enzima multifuncional uma vez que apenas uma etapa de glicosilação foi identificada. Portanto, as funções provenientes das etapas (2) e (3) são complementares e não redundantes (Saerens et al., 2011).

Voltando às etapas de síntese de SLs, tem-se que após a segunda glicosilação da molécula de glicolipídio, há a formação do SL em sua forma não acetilada e acídica, ou seja,

sua estrutura macro está disposta em forma aberta, com o grupo carboxílico proveniente da cadeia lipídica exposto. Ainda assim, diversos trabalhos, anteriormente, haviam reportado em sua grande maioria a presença de grupos acetila em diferentes graus, nas posições C6' ou C6'', referentes aos monômeros de glicose (Asmer et al., 1988; Davila et al., 1993). Além disso, apesar do trabalho de Otto et al. (1999), no qual foi obtido uma proporção de 45% de SLL não acetilado, a única forma convencional de se obter SL não acetilado se dava a partir de hidrólise alcalina (Hu e Ju, 2001). Este processo tinha algumas desvantagens, e uma limitação crucial que impedia este processo de ser amplamente executado, que se baseava na hidrólise do anel lactônico resultando em um SLA não acetilado, o qual possui baixo interesse industrial e pouca aplicação.

Portanto, para que houvesse a presença de SLs não acetilados e acetilados, outras etapas ainda necessitavam de identificação e caracterização. De fato, se há a ocorrência de diferentes tipos de SLs sendo excretados extracelularmente, é possível afirmar que uma etapa do processo de síntese é dedicada unicamente à acetilação da molécula. Com este raciocínio conduziu-se a identificação do gene responsável por codificar a enzima acetiltransferase (*at*), denominado por *at*. Após submeter a linhagem selvagem de *S. bombicola* ATCC 22214 à deficiência deste gene, resultando em *S. bombicola* Δat , pode-se observar a síntese de SLs ausentes de grupos acetilas nas posições 6' e 6''. Desta forma, pode-se identificar a etapa (4) da via metabólica, a qual não é caracterizada como limitante uma vez que a biomolécula foi produzida continuamente ao longo do processo fermentativo. Apesar do baixo rendimento de síntese, através desta metodologia foi possível não só elucidar uma etapa importante no processo, como também produzir SL não acetilado com alta pureza (Saerens et al., 2011b). Dentre as características específicas deste tipo de SL, destaca-se menor citotoxicidade em relação aos seus homólogos, o que pode ser uma propriedade interessante na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de medicamentos antivirais (Shah et al., 2005).

Consecutivamente, a etapa (5) desempenha a função de transporte dos SLs ao meio extracelular. Com o gasto de uma molécula de ATP, a proteína transportadora MDR excreta ao meio externo moléculas de SLA não acetilado e acetilado. Por fim, na etapa (6) os SLAs podem sofrer lactonização através da enzima lactona (SBLE), convertendo-se a SLL com diferentes graus de acetilação (Ciesielska et al., 2014). Os primeiros sinais da descoberta desta proteína por meio de uma caracterização exoproteômica abriu caminho para diversas suposições e perspectivas devido ao fato de que esta proteína possuía semelhança, com 33% dos aminoácidos presentes, à lipase A (CALA) encontrada em *Pseudozyma antarctica*.

Justamente, CALA tem maior afinidade e preferencia em catalisar reações de esterificação em lipídios às reações de hidrólise (Brenneis e Klay, 2004).

A caracterização cinética de SBLE foi realizada após a recombinação e expressão em *Pichia pastoris* seguido de sua purificação. Seu sítio ativo foi identificado como sendo na posição Ser₁₉₄, uma vez que a deleção do códon deste aminoácido culminou na inatividade da enzima (Ciesielska et al., 2016). A descoberta de SBLE resultou em um grande avanço na tecnologia de biossurfactantes, uma vez que a deleção do gene responsável por sua expressão gerou linhagens capazes de produzir misturas puras de SLAs (Ciesielska et al., 2014). Além disso, sua super expressão resultou em linhagens aptas a sintetizarem SLL com grau de pureza de aproximadamente 99% (Roelants et al., 2016). Isto de certa forma confere uma maior viabilização econômica para o processo de purificação, na qual concentra-se, normalmente, 60 – 70% das despesas processuais, além disso, aumenta-se a atratividade do produto uma vez que é possível melhorar sua especificidade de aplicação e produtividade.

No que diz a respeito sobre a afinidade de cada uma das enzimas envolvidas na via metabólica de SLs em *S. bombicola* em relação aos substratos, é incerto afirmar que existam fontes de carbono corretas para sua produção, entretanto é válido ressaltar que alguns tipos de ácidos graxos ou alcanos são mais facilmente assimilados devido à capacidade de transporte e maior afinidade ao citocromo P450, no qual se procede a etapa (1) de hidroxilação. Consequentemente, UGTA1 irá ser favorecida quando a hidroxila está presente nos carbonos 17 ou 18 de ácidos graxo como esteárico ou oleico. Enquanto para UGTB1, é mais preciso dizer que sua afinidade depende restritamente da presença de glicolipídios, desta forma, é evidente a diferença funcional entre UGTA1 e UGTB1, mostrando que ambas são complementares e necessárias para a completa síntese de SLs. Uma vez que a concentração de SLA intracelular é superior, a enzima acetiltransferase se mostra mais efetiva e ativa em sua presença, entretanto ainda apresenta uma margem inferior de atividade quando na presença de glicolipídios ácido. No entanto sua atividade em substrato SLL é relativamente nula (Searens et al., 2015). Portanto, através das evidências reunidas até o presente momento, o conjunto enzimático responsável pela síntese de SLs pode ser regulado de diferentes formas e depende de reações sucessivas que são moduladas, consecutivamente, pelas moléculas que antecedem cada etapa.

2.2.4 Produção de Soforolipídios

2.2.4.1 Atuais Avanços em Técnicas de Fermentação, Separação e Caracterização de SLs

O estado da arte da fermentação de SLs e BSs em geral é de natureza mais complexa em relação a outros processos fermentativos. Normalmente, a produção de bioprodutos em fermentações submersas é constituída por um sistema de 2 fases, conforme apresentado pela Figura 9, compondo as unidades celulares do microrganismo em seu estado sólido e o meio de cultivo em seu estado aquoso. A medida com que a molécula de interesse é sintetizada, as células podem ser removidas do sistema por sedimentação ou centrifugação, e, portanto, o caldo fermentado submetido às operações de purificação que são específicas para cada produto. Brevemente, no caso de produtos intracelulares, o interesse comercial reside dentro das próprias células, sendo essas submetidas ao rompimento celular seguido da extração do produto alvo. Ainda assim, o sistema principal continua constituído por 2 fases físicas.

No entanto, a fermentação de BSs, precisamente, de SLs, para uma maior produtividade e rendimento é demandado uma fonte hidrofóbica de carbono. Nota-se que ao introduzir uma fase, basicamente, imiscível em água ou minimamente miscível, três fases, naturalmente, resultam do sistema, sendo elas constituídas por células, fase aquosa (meio de cultivo) e fase lipofílica (fonte hidrofóbica: óleos, ácidos graxos e etc.). A ocorrência deste complexo meio de cultivo torna, em escalas laboratoriais, o manuseio de ferramentas e técnicas analíticas de quantificação mais difíceis de serem conduzidas, ou até mesmo, exigindo a elaboração de procedimentos específicos para cada caso trabalhado. Recirculação de células, sistema com alta densidade celular, e fermentação em dois estágios são exemplos de diferentes estratégias aplicadas por autores nesta área (Daniel et al., 1998; Gao et al., 2013; Van Renterghem et al., 2018).

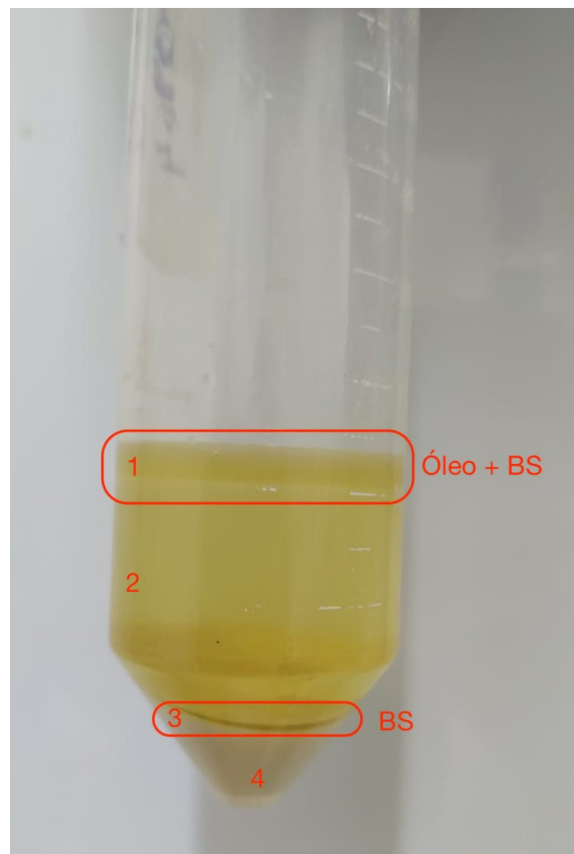


Figura 9. Esquema da distribuição de fases da fermentação de SLs após centrifugação à 4000 rpm. Fases – (1) Óleo residual + SL baixa densidade; (2) Caldo fermentado; (3) SL alta densidade; (4) Biomassa *S. bombicola*.

Conforme há o avanço da fermentação, crescimento exponencial celular, início da fase estacionária, inicia-se a produção de SLs, emergindo mais uma fase neste sistema, tornando-o mais complexo devido à interação deste composto com ambas as fases majoritárias no sistema, definidas por água e óleo (Figura 9). Esta interação resulta em um certo grau de emulsificação uma vez que os SLs possuem propriedades surfactantes (Liu et al., 2019). Além disso, em sistemas com alta frequência de agitação e aeração, como em biorreatores, há a ocorrência da formação de um excesso de espuma não controlada, causando a migração do BS à superfície meio de cultivo/ar e, conseqüentemente, a limitação da transferência de oxigênio para o sistema e o arraste do produto à corrente de saída do biorreator (Winterburn e Martin, 2012).

É evidente que isto cause problemas referentes ao manuseio e processamento do caldo fermentado, portanto, a elaboração de análises quantitativas e qualitativas das biomoléculas de interesse é imprescindível para a documentação de resultados confiáveis e reproduzíveis. Um dos problemas enfrentados por pesquisadores nesta área, é, justamente, a falta de padronização analítica e, apresentação da caracterização dos produtos obtidos,

refletindo em resultados equivocados e com baixa confiabilidade (Roelants et al., 2019). A fim de direcionar soluções aos desafios mencionados, diferentes autores realizaram trabalhos ao longo de suas investigações para melhorar a reportagem de resultados e obter quantificações mais precisas em relação à produção de BSs.

Neste sentido, uma das estratégias elaboradas se baseia na utilização dos BSs, ou especificamente, dos soforolipídeos obtidos durante a fermentação, purifica-los a partir de técnicas cromatográficas, confirmar suas estruturas químicas por espectrometria de massas (MS) e, por fim, após confirmação, implementá-los como padrão para futuras análises e quantificação de resultados (Waddekar et al., 2014). Isso se mostra, muitas vezes, necessário devido à complexidade e especificidade da mistura de soforolipídeos que pode suscitar de um cultivo microbiano em meios complexos, suplementados com substratos, em alguns casos, lignocelulósicos, renováveis e subprodutos industriais. Nesses casos, há possivelmente alterações nas biomoléculas formadas, o que dificulta a utilização de padrões comerciais, portanto, a estratégia mencionada ela é válida para a facilitação da análise dos resultados e deve ser conduzida com precaução e transparência no método de obtenção das moléculas analisadas em seu estado purificado.

Técnicas analíticas envolvendo equipamentos como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAP), Cromatografia Líquida de Ultra Performance (CLUP), Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Infravermelho de Transformada de Fourier (IVTF), Cromatografia Gasosa e, mais recentemente, Espectrometria de Massa (EM) e Ionização de Matriz Assistida (IMA) (Price et al., 2009; Rudden et al., 2015; Asmer et al., 1988; Smyth et al., 2014). Para aumentar ainda mais a eficiência de análise, o acoplamento de CLAP com EM (CLAP-EM) proporciona uma caracterização completa quantitativa e qualitativa, sendo este método a opção mais favorável para a identificação de compostos os quais já são conhecidos e se espera a partir de um determinado microrganismo utilizado (Twigg et al., 2021).

Nota-se que com exceção de CLAP-EM, todas as técnicas, principalmente, RMN exigem compostos em seu estado semi-purificado para assegurar que a verdadeira estrutura do BS, livre de metabólitos fermentativos, proteínas e resíduos nutricionais, seja elucidada. Entretanto, apesar de que CLAP-EM tenha excelente desempenho apenas com o caldo fermentado livre de células, é de extrema importância que o equipamento tenha sido calibrado a partir de um padrão interno puro referente ao composto de interesse, sintetizado via química ou biológica. Portanto, uma de suas desvantagens é sua limitação para identificação de BSs que já tenham sido purificados e caracterizados, preliminarmente, em

outros estudos. Além disso, são métodos de baixa acessibilidade econômica, demandam altos investimentos e energia e, requerem a operação de profissionais especializados para sua adequada operação (Twigg et al., 2021).

Visto que o pré-requisito mínimo para uma análise confiável da quantificação de SLs, com exceção de algumas técnicas, necessita da molécula em seu estado semi-purificado, formas de obter-se-á vêm sendo desenvolvidas e melhoradas conforme técnicas de processos fermentativos são exploradas, especificamente, no campo de SLs. Não apenas por um motivo de quantificação, mas também de uma tentativa de ampliação de escala, ultimamente, o acoplamento de biorreatores com unidades de separação vem sendo estudado com o intuito de viabilizar a comercialização de BSs e, de forma mais massiva os SLs, os quais atualmente apresentam-se em maiores trabalhos devido sua alta produtividade e propensão em uma escala industrial. (Dolman et al., 2019).

Neste contexto, é importante mencionar que o modo de operação identificado como ideal para este sistema é dependente de estratégias de batelada alimentada. O objetivo de sistemas que utilizam de batelada alimentada tem como base o alongamento do período em que o microrganismo direciona seu metabolismo à síntese do produto de interesse assistido pela alimentação do substrato de maior assimilação catabólica. Desta forma, custos inerentes ao preenchimento, esvaziamento e esterilização do reator são amenizados devido ao maior tempo de fermentação e, à maior produtividade (Dolman et al., 2019).

Por outro lado, no caso de produtos como BSs, conforme há sua formação, a viscosidade do meio fermentativo aumenta, atinge-se o volume máximo de trabalho do reator, diminui-se a transferência de oxigênio ao sistema e, a demanda de potencia de agitação e aeração, conseqüentemente, aumenta para que mesmas taxas de transferência de massa sejam atingidas nesta nova condição. Concomitante a estes desafios, devido ao acúmulo de produto no meio fermentado, ocorre-se também uma repressão catabólica do microrganismo e a eventual inibição de metabolismo de BSs (Dolman et al., 2019). Portanto, o acoplamento do biorreator com unidades de separação é introduzido como uma promissora alternativa em aliviar os estresses causados pelos desafios inerentes à esta estratégia, uma vez que a remoção do produto é realizada em série com a unidade fermentativa (Dolman et al., 2017).

Dentre as inúmeras estratégias de separação *in situ* de BSs, apenas algumas são consideradas viáveis em um cenário industrial, uma vez que o escalonamento de certos esquemas é de difícil implementação por apresentarem custos mais elevados, tornando o produto final, economicamente, não competitivo. De fato, os estados da arte envolvendo tais

métodos são complexos e antes que sejam conduzidos em largas escalas, é necessário que uma modelagem e operação meticulosa do seu funcionamento seja provado eficiente e reproduzível. Contudo, encontra-se de forma resumida, representada pela Tabela 1, as principais estratégias de separação *in situ* adotadas, especificamente, para a produção de SLs.

Ainda em relação aos processos de separação, é importante mencionar que o uso de solventes continua sendo uma estratégia relativamente eficiente a nível laboratorial em frascos agitados (Pulate et al., 2013). O emprego de solventes orgânicos como acetato de etila e etanol são excelentes parâmetros de comparação quando se necessita de uma precisa quantificação e semi-purificação de SLs em pequenos volumes de fermentação. No entanto, para escalas maiores, piloto ou industrial, o uso de solventes pode impactar negativamente o meio ambiente e agregar altos custos na produção devido a necessidade de um alto volume para sua purificação e à adição de operações unitárias de recuperação dos solventes. Outras estratégias de purificação como a utilização de colunas de sílica gel acoplado com CCD também se apresenta como uma opção de extrema eficiência, entretanto de difícil ampliação de escala devido ao baixo volume de processamento e manutenção do equipamento (Shah et al., 2017).

Tabela 1. Principais estratégias para a separação de SLs *in situ* acopladas com biorreatores. NI: Não Identificado. Adaptado de Dolman et al. (2019).

Técnica de Separação	Produtividade - Concentração final	Recuperação / Pureza	Referência
Ultrassom + Separação	1,9 g/L.h – 365 g/L	NI	Kim et al. (2009)
Gravitacional	0,34 g/L.h – 73,8 g/L	11% recuperação/ NI	Palme et al. (2010)
Gravitacional	1,6 g/L.h – 477 g/L	NI / 74% pureza	Zhang et al. (2018)
Gravitacional	2,3 g/L.h – 387 g/L	NI	Marchal et al. (1999)
Gravitacional com recirculação	1,07 g/L.h – 540 g/L	86%/ NI	Dolman et al. (2017)
Gravitacional com recirculação	2,4 g/L.h – 1,7 kg de SL	93%/ NI	Wang et al. (2020)
Ultrafiltração	0,22 g/L.h – (NI)	65%/ 95%	Van Renterghem et al. (2018)

2.2.4.2 Utilização de Substratos Renováveis e de Baixo Custo

A procura por matérias-primas renováveis para a aplicação em bioprocessos e na indústria de energia está presente há décadas com o objetivo de reduzir os custos de produção, amenizar os impactos ambientais do manejo inadequado de resíduos e reduzir a competição entre a indústria de alimentos e agricultura como produtora de insumos básico para produtos de maior valor agregado.

Esta prática estimulou cientistas e diferentes setores da economia a procurarem por mais subprodutos que fossem capazes de suprir a demanda de substratos exigida em diferentes processos químicos e bioquímicos. Especificamente, em bioprocessos a unidade nutricional e fonte de carbono universal de grande parte dos microrganismos já identificados é obtida através da glicose, a qual pode ser obtida a partir de biomassa vegetal (Rezania et al., 2020). Para que a produção de soforolipídios pela levedura *S. bombicola* seja economicamente atrativa, demanda-se também fontes renováveis de carbono que possam diminuir o custo de produção e obter um mercado competitivo em relação aos seus homólogos sintéticos surfactantes (Rivera et al., 2019). Neste contexto, o trabalho de encontrar substratos renováveis para sua produção se torna um pouco mais complicado.

De fato, fontes carbônicas hidrofóbicas residuais podem conter diversas impurezas como peróxido de hidrogênio, sais ou até mesmo compostos fenólicos que são recalcitrantes para o metabolismo microbiano, causando a inibição de seu crescimento e, conseqüentemente, a perda de produtividade. Outro fator que interfere a sua produção é o fato de que o espectro de carboidratos que podem ser fermentados por *S. bombicola* é pequeno, o que dificulta a seleção do substrato. Em contrapartida, devido ao uso de fontes hidrofílicas e lipofílicas as possibilidades de combinação entre fontes renováveis e não-renováveis são ampliadas, podendo assim compensar as desvantagens de uma fonte através de outra.

A natureza anfifílica dos SLs permite que diferentes alternativas em relação ao substrato assimilado pelos microrganismos produtores sejam implementadas. Desta forma, glicerol (Bhangale et al., 2014), melaço de cana-de-açúcar (Daverey et al., 2009), resíduos da indústria de laticínios (Daniel et al., 1999), hidrolisado hemicelulósico e celulósico (Marcelino et al., 2019; Konishi et al., 2015) formam um espectro restrito de possibilidades de fontes hidrofílicas de carbono atrativas para a produção de SLs. No entanto, fontes hidrofóbicas provenientes de subprodutos industriais ou de resíduos gerados em domicílios

e na indústria de alimentos podem ser reaproveitadas em processos fermentativos como fontes carbônicas precursoras da estrutura lipídica dos SLs.

A vantagem de utiliza-los reside na possibilidade de amenizar os custos com matéria-prima lipídica de alta pureza, como os ácidos oleico e esteárico que representam um alto custo no processo. Dentre as fontes já avaliadas pela literatura, destaca-se óleo de cozinha residual (Fleurackers, 2006), gordura animal residual (Deshpande e Daniels, 1995), óleos residuais do processamento de vegetais (Kim et al., 2005) e óleos não-convencionais (Pekin et al., 2005). Outras fontes de carbono que englobam ambos substratos hidrofóbicos e hidrofílicos são resíduos alimentícios, de confeitaria e de indústria têxtil (Kaur et al., 2019).

A busca por outras fontes de nitrogênio também possui uma enorme importância em uma produção mais sustentável de BSs. A síntese de SLs está intimamente relacionada com o metabolismo de nitrogênio (proteínas e aminoácidos), como mencionado no tópico (2.2.1.4). Tendo em vista este aspecto, diferentes autores buscaram fontes alternativas para a substituição de nitrogênio proveniente de fontes de custo elevado como o extrato de levedura. Alternativamente, hidrolisado de sabugo de milho apresentou-se promissor para esta função (Davila et al., 1994). Entretanto, a busca por outras possíveis matérias-primas residuais capazes não só de fornecer proteínas, mas como também outras vitaminas e minerais é de extrema importância para se reduzir os custos respectivos aos meios de cultivo e seus impactos inerentes de produção.

Uma estimativa de custos para a produção de SLs utilizando os rendimentos e condições de processo obtidas através da utilização de *S. bombicola* foi realizado, impondo um aumento de escala em nível industrial. Neste contexto, modelou-se os gastos inerente aos processos que utilizam fontes primárias de carbono hidrofóbico, como óleos vegetais não residuais, fontes de nitrogênio como ureia e extrato de levedura e glicose anidra. Nota-se que estas matérias-primas podem possuir origem biológica ou vegetal, entretanto, não se enquadram em uma categoria renovável devido às suas procedências e processo de geração (Ashby et al., 2013).

No entanto, notavelmente, estima-se que os principais custos envolvidos na produção de SLs estão relacionados com o processamento pós-fermentação, separação, lavagem, e purificação do produto obtido. Nessas operações, uma demanda considerável de utilidades como água e energia são requeridas uma vez que equipamentos como secadores à vácuo, secador por spray (“*Spray-Dryer*”), centrifugas e evaporadores são normalmente utilizados devido a necessidade de se obter um produto suficientemente puro que possa sofrer cristalização espontânea após sua extração. Do contrário, dificuldades associadas ao

manuseio do produto final no seu estado viscoso e pegajoso podem acrescentar maiores custos pela inserção de outras operações unitárias, mitigando sua implementação em uma escala industrial (Ashby et al., 2013).

Em um segundo caso, foi feita uma análise da viabilidade tecno-econômica da produção de SLs através da co-utilização de resíduos alimentícios como fonte de carbono, proteica e lipídica. Diferentemente da modelagem citada anteriormente, o método de extração implementado neste estudo se refere à separação física do biossurfactante, o que elimina a utilização de solventes orgânicos para sua extração. Deste modo, induz-se a precipitação espontânea de SLs a partir do aquecimento e resfriamento abrupto do meio (Roelants et al., 2016). Como unidade de purificação final do bioproduto em forma cristalina utilizou-se secagem por congelamento, enquanto para a forma líquida implementou-se ultrafiltração.

À critérios comparativos, para SLs produzidos unicamente de substratos não-renováveis e purificados por métodos químicos o custo obtido foi de US\$ 2,95/kg de SL. Enquanto para a co-utilização de resíduos alimentícios e métodos físicos de separação, o custo obtido foi de US\$ 19,65/kg. Com respeito ao segundo caso, esta discrepância está atribuída ao maior número de equipamentos utilizados devido à necessidade de etapas de hidrólise enzimática da matéria-prima, e também da produtividade e rendimento obtidos a partir deste processo.

Portanto, a necessidade de amenizar os custos envolvidos em sua produção para uma maior competitividade e introdução ao mercado mundial é proeminente. Desta forma, a busca por diferentes alternativas e otimização de processos e de projetos, que possam atender a demanda industrial para um produto proveniente de um processo mais sustentável e economicamente viável ainda é imperativa. A utilização de substratos renováveis, métodos de separação física e estratégias fermentativas representam os caminhos de desenvolvimento biotecnológicos que podem oferecer soluções aos problemas enfrentados atualmente relacionados a implementação de SLs em escala industrial.

Em um ponto de vista socioeconômico, a utilização de substratos renováveis representa uma estratégia condizente com o paradigma de uma sociedade moderna, menor competição com a distribuição de alimentos e utilização de subprodutos, agregando valor e formando um sistema sustentável de produção. Em teoria, este sistema representado pela Figura 10, é um modelo epistemológico de economia circular que se baseia nos princípios de sustentabilidade e visa desenvolver autonomia social, econômica e ambiental para garantir bem-estar e subsídios que favoreçam a inclusão de diferentes formas de vida.



Figura 10. Esquema Representativo de Economia Circular.

2.2.5 Interações entre Microbiota-Biossurfactante-Planta

2.2.5.1 Aspectos Físico-Químicos

Os BSs por serem moléculas tensoativas e apresentarem atividade anfífilica possuem atividade versátil quando aderidos e adsorvidos nas partículas do solo. Este por sua vez, é composto por minerais, matéria orgânica e organismos vivos. Os organismos vivos podem se diferir quanto taxonomia e funcionalidade. Neste sistema dinâmico composto pelas interações entre todos os componentes mencionados forma-se em associação com as plantas, a rizosfera. Na rizosfera, os BSs agem como agentes moduladores, em outras palavras, são moléculas reativas que podem conduzir ou coibir processos físico-químicos e biológicos.

No que diz respeito aos processos físico-químicos, ressalta-se a capacidade de mobilização de nutrientes, alteração das forças intermoleculares que envolvem as moléculas presentes no solo e, solubilização de moléculas hidrofóbicas como óleos, fenólicos, terpenos hidrocarbonetos e entre outras (Kumar et al., 2021). Os focos principais nessa instância examinam a capacidade dos BSs em auxiliar nos processos de biorremediação de solos, portanto, solubilização metais pesados de baixa disponibilidade para que eventualmente possam servir de micronutrientes para o crescimento de vegetais (Singh et al., 2018); solubilização de hidrocarbonetos em locais contaminados por derramamento de resíduos de indústria alimentícia, agroindústria e refinadoras de petróleo, auxiliando na homogeneização e dissolução desses hidrocarbonetos, os quais uma vez disponíveis em meio aquoso podem servir como substrato para o crescimento de bactérias e fungos (Singh et al., 2018).

A Figura 11, demonstra de maneira ilustrada o processo de mobilização desses nutrientes e como isso está relacionado com a concentração de BSs contidos no solo. Acima de sua CMC, os BSs obtêm propriedades que se assemelham às vesículas. Ou seja, servem como envelopes que podem estar carregados eletricamente ou neutros. Esses envelopes interagem intermolecularmente com seus semelhantes e com outros íons e moléculas presente no solo. Quando essas interações formam macromoléculas e atingem as raízes dos vegetais aderem à sua superfície, podendo alterar a quantidade de carga ou a hidrofobicidade desta superfície. Essas mudanças podem ter efeitos benéficos, dentre eles, uma maior assimilação de nutrientes e redução da tensão interfacial, melhorando também a aderência dessas moléculas na superfície das raízes.

Neste processo de dessorção dos nutrientes do solo, as interações intermoleculares biossurfactante-metal são mais fortes do que as interações solo-metal, desta forma, os metais tendem a estar ligados às moléculas tensoativas e, ao entrarem em contato com a água disponível no solo podem ser solubilizados devido às interações também fortes que os biossurfactantes possuem com a água. Esta por sua vez, também sofre a ação de redução de sua tensão superficial conferida pelos BSs, facilitando o processo de difusão (Pacwa et al., 2011; Rufino et al., 2011).

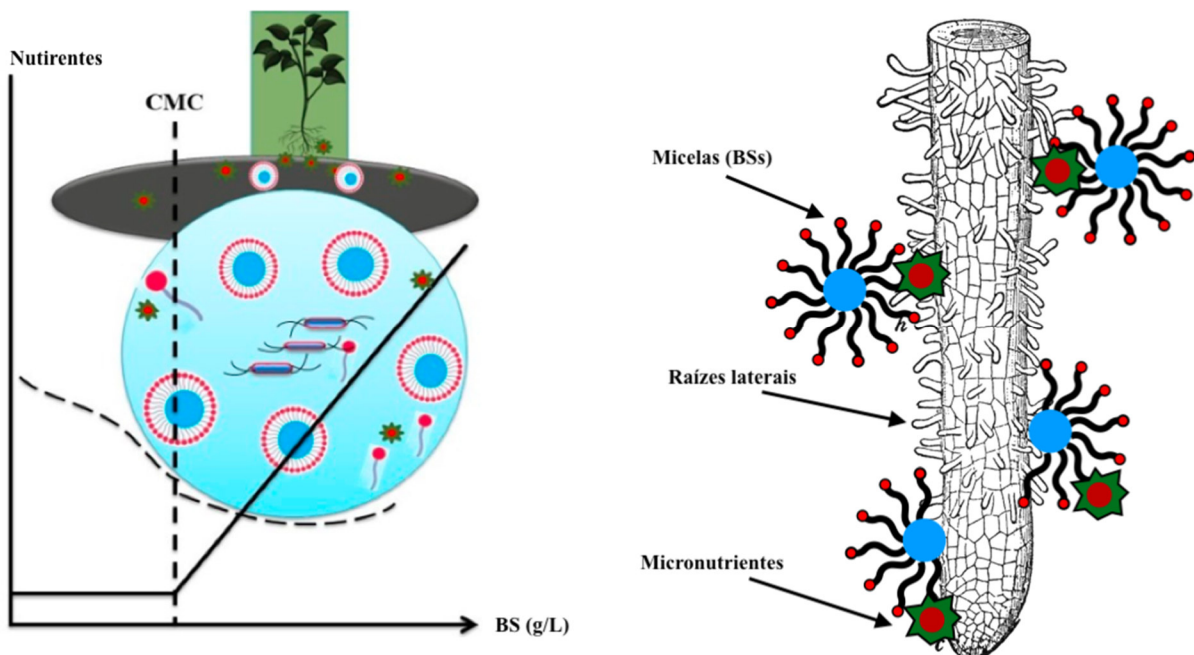


Figura 11. Esquema representativo do mecanismo dos BSs envolvendo a mobilização de nutrientes às raízes de vegetais durante o crescimento no solo. Adaptado de Kumar et al. (2021)

2.2.5.2 Atividade Biológica

Tem-se com relação a atividade biológica dos BSs, múltiplos efeitos que podem ser concebidos por interações intermoleculares durante os processos bioquímicos e fisiológicos conduzidos por microrganismos e organismos de maior complexidade como as plantas.

Primeiramente, em uma perspectiva mais generalizada, os BSs podem atuar diretamente em paredes celulares e membranas plasmáticas. Visto que essas estruturas celulares são compostas por lipídeos e glicoproteínas entre outros grupos funcionais como ésteres de fosfato que conferem características semelhantes aos BSs, ou seja, comportamentos anfifílicos, interagindo tanto com superfícies ou fluidos polares e apolares. Especificamente, existem diferentes níveis de hidrofobicidade de membranas e superfícies celulares entre os microrganismos e as plantas. Neste sentido, os BSs podem alterar essa hidrofobicidade tanto por meio de interações fracas (e.g. interações de Van der Waals) ou fortes (e.g. pontes de hidrogênio; dipolo-dipolo) quanto por modificações ocasionadas por remoção de grupos funcionais ou radicais presentes nas terminações de cadeias (Zeng et al., 2018). Alterar a hidrofobicidade dessas estruturas se traduz em alterações no comportamento de aderência desses organismos aos substratos, metabólitos e superfícies; motilidade e sinalização celular (Kaczorek et al., 2018). Deste modo, a avaliação desse efeito deve ser racionalizada à fim de interpretar se há uma repercussão positiva, no caso do melhoramento das atividades biológicas ou negativa caso haja uma perda de funcionalidade metabólica.

Neste contexto, múltiplos trabalhos foram realizados, majoritariamente, avaliando alterações na aderência de células microbianas em diferentes substratos quando expostas aos biossurfactantes (Kaczorek et al., 2018). Ressalta-se, dentre esses trabalhos, que os raminolipídios (RLs), dependendo de sua concentração podem causar efeitos contrários. Por exemplo, em um estudo conduzido por Ma et al. (2018), foram avaliados diferentes parâmetros como biomorfologia, hidrofobicidade, grupos funcionais de superfície celular e potencial zeta das células de *Pseudomonas* sp. Ph6. Observa-se diante disto, que todos os parâmetros analisados foram afetados diretamente pela concentração de RLs, além disso, houveram modificações nas células quanto aos grupos funcionais de superfície, identificando uma ausência do pico de lipopolissacarídeos (990 cm^{-1}) e, um aumento da camada de polímeros extracelulares (Ma et al., 2018).

Ainda foram observados efeitos quanto ao aumento da hidrofobicidade celular, a qual foi atingida a uma concentração de 100 mg/L de RLs, enquanto a uma concentração de 200 – 400 mg/L foi observado uma abrupta diminuição de sua hidrofobicidade. Por fim, as

análises de potencial zeta indicaram alterações com respeito aos íons e cargas em sua superfície celular, de modo que, em menores concentrações (100 mg/L) observou-se uma maior susceptibilidade de aceitação de prótons, enquanto que para maiores concentrações (400 mg/L) houve uma diminuição do potencial zeta resultante, indicando uma menor estabilidade do sistema (Ma et al., 2018). É válido mencionar que estes efeitos podem variar também de acordo com o microrganismo modelo utilizado nos ensaios, uma vez que há especificidades intrínsecas de cada um devido às diferenças morfológicas e estruturais químicas de cada espécie analisada, como por exemplo, o perfil de lipídeos, proteínas e grupos funcionais de membrana (Lin et al., 2017; Sotirova et al., 2008).

Além das mudanças na hidrofobicidade celular, também é notório observar outros efeitos. Suscita-lhes, portanto, outros mecanismos que são definidos pela capacidade dos BSs de fluidizar as membranas celulares e, com efeito, sua própria permeabilização (Kaczorek et al., 2018). A interação dos grupos funcionais, proteínas, lipídeos, e polissacarídeos de membrana com os BSs, possivelmente, fazem com a que as trocas de cargas sejam maiores. Essa troca permite que se abram poros e canais ao longo das cadeias fosfolipídicas, permeabilizando essa estrutura celular. De fato, diferentes estudos mostraram que pela modificação da permeabilização foi possível identificar um aumento de excreção de metabólitos e enzimas (Zaragoza et al., 2009; Sana et al., 2018). Por exemplo, foi observado que o uso de raminolipídios, possivelmente, foi responsável pela liberação ou remoção de parte da camada de lipopolissacarídeos das membranas externas de bactérias Gram negativas (Al-Tahhan et al., 2000).

Outro efeito constatado diz respeito à capacidade dos BSs de alterar a fluidização de membranas plasmáticas. A fluidez de membrana está associada a presença dos diferentes grupos de ácidos graxos que compõem a bicamada fosfolipídica, desta forma, atribui-se a cada espécie e o habitat no qual a comunidade de microrganismos está exposta, o perfil lipídico de membrana (Li et al., 2002). Garantir uma fluidez adequada é imprescindível para manter atividades metabólicas e o transporte de substrato ao meio intracelular. Dentre os aspectos que realizam a manutenção da fluidez, têm-se o balanço entre ácidos graxos insaturados e saturados, tamanho de cadeia carbônica e, a presença de proteínas ancoradas (Kallimanis et al., 2007). Evidentemente, os mecanismos propostos para que haja uma modificação dessa fluidez por meio dos BSs, têm como princípios mudança na razão entre cadeia saturadas e insaturadas lipídicas e, adaptação homeoviscosa como meio de regular a fluidez celular (Murínová et al., 2014; Li e Zhu; 2014).

Acerca, aumento da atividade enzimática, maior excreção de metabólitos e, alterações na regulação de genes são alguns dos efeitos que lhes suscitam (Shao et al., 2017). Isoladamente, os BSs em contatos com enzimas e proteínas podem realizar um efeito de estabilização de estrutura e, ainda melhorar a conformação estrutural, lhes conferindo maior atividade e estabilidade térmica e mecânica (Xu et al., 2021; Liang et al., 2010). Interações eletrostáticas nos sítios ativos das enzimas e interações hidrofóbicas entre as cadeias alquila de hidrocarbonetos, resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e os BSs são possíveis hipóteses que descrevem os fenômenos que governam as mudanças nessas estruturas (Shao et al., 2017; Karbassi et al., 2003). À critério de exemplo, Chen et al. (2021) avaliaram o efeito de um SLL (soforolípídeo lactônico) em proteína de soja isolada, demonstrando que a mistura entre estes elementos resultou em mudanças conformacionais na estrutura secundária da proteína, as quais foram governadas por interações hidrofóbicas e por pontes de hidrogênio realizadas entre os terminais da proteínas e o SLL (Chen et al., 2021).

Por fim e não menos importante, a codificação e expressão de genes são fenômenos que também são influenciados pela presença de BSs. Apesar da ausência de informações mais concretas sobre os mecanismos dos quais advêm o aumento ou a depreciação da regulação de genes em microrganismos quando submetidos aos tratamentos com surfactantes ou biosurfactantes. Presume-se que esses eventos podem estar indiretamente relacionados à associação dos BSs com membranas, onde se acoplam e as permeiam entrando em contato com o meio intracelular onde ocorrerá a interação dos BSs com o material genético (Kaczorek et al., 2018; Shao et al., 2017).

A somatória de todos os efeitos, sejam eles, aumento de permeabilidade, fluidização, alteração de hidrofobicidade e modificações enzimáticas, podem ser responsáveis por induzir uma sinalização celular de defesa, e esta por sua vez, causar um impacto tanto positivo quanto negativo na regulação da expressão genética de microrganismos ou até mesmo de plantas (Schellenberger et al., 2019; Cai et al., 2018). O conjunto de efeitos dos BSs sobre membranas plasmáticas estão ilustrados na Figura 12, representando os possíveis mecanismos de interação emergentes do contato.

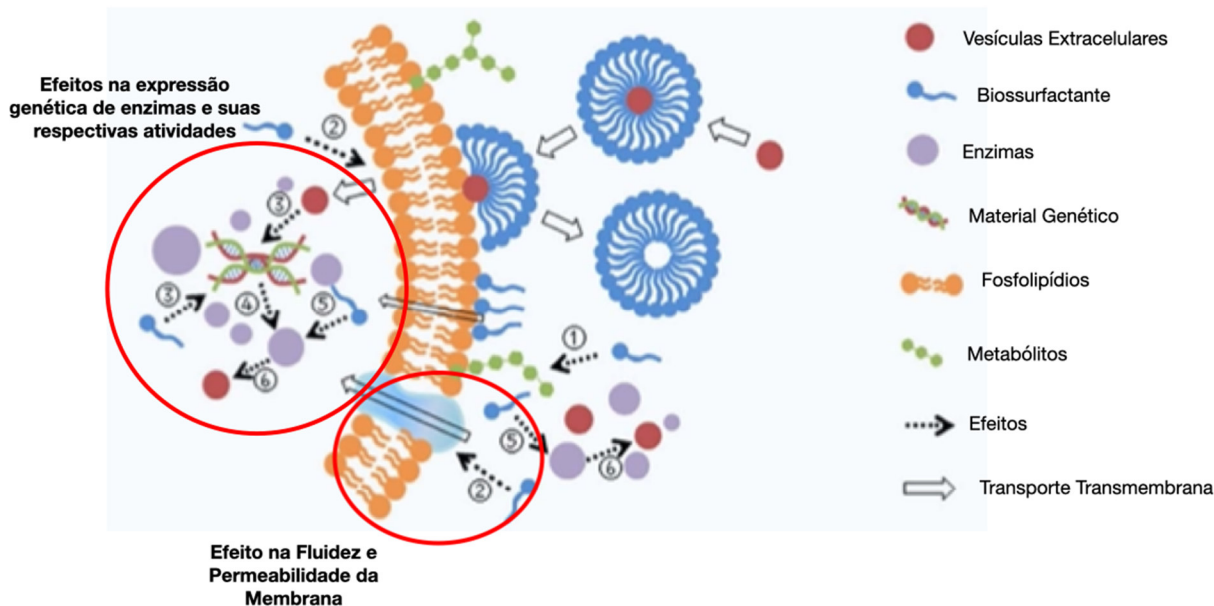


Figura 12. Atividade biológica e possíveis efeitos derivados dos biossurfactantes quando associados às membranas celulares. Adaptado de Shao et al. (2017)

Com relação a regulação de genes e metabolismo, alguns tipos de biossurfactantes, como lipopeptídeos e raminolípidios já foram identificados como indutores do sistema imune em plantas (Schellenberger et al., 2019). Estas moléculas, até o momento, estão classificadas como indutores derivados de lipídios microbianos, os quais apresentam padrões de invasão que são identificados, possivelmente, por lipoproteínas de membrana. Em contrapartida, os mecanismos de identificação adotados pelos vegetais, para identificação destas moléculas, ainda estão subexplorados. Apesar disso, verifica-se evidências que apontam para as modificações que os biossurfactantes realizam nos grupos funcionais de membrana. Essas modificações alteram a composição lipídica e interagem com proteínas ancoradas, estimulando a expressão de genes envolvidos na proteção inata de vegetais e provocando uma resposta imunológica devido aos receptores imunológicos também presentes na membrana celular de plantas (Monnier et al., 2019; Monnier et al., 2018).

Considerando todos os fundamentos postulados ao longo desta seção, ainda se apresenta incerto a efetividade dos biossurfactantes em propiciar melhores condições para que haja uma maior troca metabólica e conseqüentemente, uma maior cooperação entre microrganismos produtores de moléculas tensoativas, a microbiota da rizosfera e as plantas. No entanto, há indícios substantivos de que sejam, seus efeitos, promissores, quando utilizados de maneira racional e que sejam avaliados fatores que possam influenciar essas interações, como por exemplo, a própria concentração dos biossurfactantes utilizados. Ressalta-se, novamente, que os efeitos descritos possuem controversas, uma vez que podem

ser tanto positivos (aumento da atividade metabólica) quanto negativos (atividade antimicrobiana), dependendo das espécies que interagem e das condições de interação.

Portanto, é de substantiva importância que haja uma biocompatibilidade entre os organismos e os biossurfactantes para que, no caso do desenvolvimento de bioinsumos visando aplicação na agricultura, de suas interações suscitem respostas benéficas ao cultivo e ao solo. Até este momento, radicou-se as vantagens, e todos os efeitos físico-químicos e biológicos provenientes da utilização dos biossurfactantes, especificamente, aplicados à agricultura. Subsequentemente, à título de maiores esclarecimentos, os próximos tópicos levam em consideração o por quê da utilização conjunta de fungos Entomopatogênicos e qual o papel desta classe de microrganismos na manutenção da saúde, funcionalidade e disponibilidade de nutrientes no solo, concomitante com seu papel de proteção biológica quando associados às plantas.

2.3 Fungos Micoparasitas: base de Biopesticidas e Biofertilizantes

Em alinhamento com uma agricultura baseada em práticas sustentáveis, visando o manejo ecológico do solo, bem como a diminuição de contaminantes que se estendem além do perímetro de plantio através de lençóis freáticos, é esperado que o uso de biofertilizantes e biopesticidas se amplie devido a necessidade da mudança de paradigma social e ambiental proeminente nos dias atuais.

Diante deste desafio, algumas soluções podem ser encaminhadas com maiores chances de obterem resultados satisfatórios e suficientes em relação a substituição de agrotóxicos. Essas soluções consistem na aplicação de fungos com características entomopatogênicas. Fungos entomopatogênicos possuem mecanismos que opõem a proliferação de patógenos e pragas em solos e em plantas (Mascarin e Jaronski, 2016). Esses mecanismos são constituídos pela formação de esporos, os quais representam sua unidade ativa de maior virulência, bem como a síntese de toxinas e metabólitos que são capazes de inibir o metabolismo de potenciais parasitas (Verma et al., 2007). Além disso, podem exibir síntese de enzimas capazes de realizar processos de recirculação de nutrientes, mantendo assim, a fertilidade do solo e biodisponibilidade de matéria orgânica (Stewart e Hill, 2014).

Os fundamentos citados a cima descrevem de maneira objetiva os efeitos diretos destes fungos diante de um microbioma. No entanto, outros efeitos indiretos emergem da aplicação desses fungos, por exemplo, a remodelação da microbiota é um efeito indireto essencial para que as funções metabólicas do bioma do solo sejam melhoradas ou

intensificadas. A introdução de outras espécies no solo causa perturbações que podem ser extremamente benéficas ao balanço da comunidade microbiana, resultando em uma maior produtividade da planta em associação (Wang et al., 2021).

Há inúmeros fungos capazes de realizar atividades antimicrobiana e promotoras de crescimento de plantas. Assertivamente, algumas espécies em particular são mais eficazes em inibir uma maior variedade de fitopatógenos, outras em providenciar mais mecanismos capazes potencializar o crescimento de plantas. Entretanto, a questão que deve ser explorada não pode, simplesmente, se basear em qual possui maior variedade de funções, mas sim qual terá um maior efeito simbiótico com o tipo de planta, e o solo em questão.

Com isto em mente, existem alguns fungos filamentosos esporulantes que são mais explorados devido aos seus diversos atributos em estabelecerem ambientes caracterizados pela maioria dos benefícios mencionados, sendo assim mais atrativos por apresentarem mais de um mecanismo em seu metabolismo. Dentre eles, destaca-se *Trichoderma* spp., *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopiliae*, *Isaria javanica*, *Clonostachys rosea*, entre outros (Sala et al., 2019). Portanto, será resumido as funções e características metabólicas do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*, o qual foi escolhido para compor o produto final deste trabalho. Técnicas fermentativas para se obter suas unidades virulentas (conídios) como fermentação em estado sólido (FES) também será abordada em seus aspectos tecnô-ômicos e, quais as vantagens em um processo cujo cultivo é feito em uma matriz sólida.

2.3.1 *Trichoderma harzianum*: um Agente Importante da Rizosfera

O solo abriga uma abundante diversidade de microrganismos capazes de exercer diversas funções. Essa biodiversidade permitiu a diferenciação e especiação de inúmeros organismos, os quais desenvolveram fenótipos adaptados ao seu habitat de origem. Com isso, inúmeros mecanismos de defesa surgiram como uma resposta à ambientes de alta competitividade e complexidade como o solo (Copping e Menn, 2000). Dentre os microrganismos que apresentam sistemas de defesa mais robustos, destaca-se o fungo filamentoso *Trichoderma* spp. Este por sua vez, exibe alta atividade micoparasítica e efeitos antagônicos contra uma série de pragas e patógenos (Baker e Cook, 1974).

Devido a estes atributos, *Trichoderma* spp. é significativamente explorado como componente essencial em métodos de controle biológico (Whipps e Lumsden, 2001). Apesar de outros fungos e microrganismos também apresentarem atividade antagônica contra outros patógenos, *Trichoderma* possui determinadas vantagens que se sobressaem e propiciam sua

aplicação mais difundida. De fato, o fungo pode ser usado a partir das suas unidades de reprodução, os esporos, também referidos como conídios, que por sua vez são mais tolerantes a condições ambientais adversas se comparado com seus micélios (Verma et al., 2007). No entanto, a formação de micélios é um processo importante de colonização, promove a proliferação do fungo e a síntese de metabólitos secundários os quais são agentes antagonísticos importantes na contenção de fitopatógenos (Yeddia et al., 2000).

Os modos de ação do *Trichoderma* spp. apresentam diferentes formas de proteção contra eventuais patógenos. Esses modos podem ter efeitos diretos no crescimento de parasitas, um exemplo disso é a produção de quitinase, catalisando uma reação direta na ruptura da parede celular de fungos (Zelinger et al., 1999), ou até mesmo a produção de antibióticos capazes de inibir o crescimento de fungos como *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* (Hanson e Howell, 2002). Além disso, destaca-se por ser potencial competitivo em comunidades complexas de microrganismos como o caso de uma microbiota do solo. Apresenta grande atividade metabólica mesmo na presença de diversos outros organismos, sua assimilação de nutrientes e colonização da rizosfera é rápida, aumentando a probabilidade de sobrevivência uma vez que seus micélios protegerão contra a invasão de outros microrganismos oportunistas e seus esporos realizarão antagonismo direto contra potenciais competidores (Celar, 2003).

Não obstante, dentre tantos aspectos positivos da presença de *Trichoderma*, pode-se enfatizar também seu mecanismo de indução do sistema imune de plantas. Por estar majoritariamente localizado na superfície das raízes, sua presença acarreta efeitos indiretos na microbiota local. Controla a abundância das espécies em sua volta e, devido ao acúmulo de toxinas em sua região de crescimento há também uma mudança no metabolismo da planta hospedeira. Essas mudanças envolvem processos importantes do mecanismo de defesa contra fitopatógenos, por exemplo, a expressão de genes associados à estresses bióticos e abióticos induzido por sua presença podem ser detectados (Khan et al., 2004).

Portanto, as duas formas principais de transferir resistência a planta hospedeira mediada pela presença de *Trichoderma* podem ser resumidas em resistência sistêmica adquirida (RSA), traduzida pela síntese de metabólitos que agem diretamente no crescimento de patógenos, e também pela resistência sistêmica induzida (RSI) representada pela indução do sistema imune inato da planta, conduzindo-a a modificar seu metabolismo e adaptá-lo à uma situação de estresse (Singh et al., 2011; Elad, 1996). Essas interações simbióticas resultam em um melhoramento do crescimento da planta, codificado pela maior área foliar, maior índice de germinação e aumento da biomassa acumulada (Altomare et al., 1999).

Os aspectos comentados acima sugerem que os benefícios da introdução do *Trichoderma* no solo não estão limitados apenas à processos de resistência. Todavia, outros mecanismos promotores de crescimento de plantas também podem estar associados. Desta forma, é possível que estejam envolvidos também, a produção de fito-hormônios tanto pela planta hospedeira quanto pelo fungo, produção de vitaminas, solubilização de nutrientes do solo, melhoramento da captura, transporte de nutrientes, desenvolvimento de raízes e taxa fotossintética (Stewart e Hill, 2014).

Existem incontáveis trabalhos envolvendo *Trichoderma*, o espectro de aplicação varia desde desenvolvimento de inoculantes sólidos, líquidos, aderidos em suporte, até aplicações com o uso de mais de uma espécie de microrganismo. Em culturas de arroz (*Oryza sativa* L.) diferentes espécies de *Trichoderma* já foram examinadas e, conclusivamente, exibem diferentes efeitos no crescimento da planta, tanto na especificidade de patógenos inibidos quanto nos efeitos abióticos aliviados por cada espécie (Debnath et al., 2020). É possível que a magnitude de cada efeito resultante da aplicação do fungo esteja relacionada com as diferentes taxas metabólicas de cada espécie, entretanto, é de extrema importância que o tipo de solo não seja negligenciado preliminarmente. As comunidades microbianas podem variar de um tipo de solo ao outro, portanto, os efeitos podem variar devido a composição da microbiota, em outras palavras, modificam a funcionalidade do solo.

2.3.2 Fermentação em Estado Sólido

O modo de reprodução de fungos através da formação de micélios torna não só possível, mas como também propícia a utilização de Fermentação em Estado Sólido (FES) como bioprocessos para se obter os esporos e os metabólitos secundários, os quais atuarão no processo de controle biológico e promoção do crescimento da planta hospedeira (Raimbault, 1998). Devido a atividade celulolítica de *Trichoderma* spp., torna-se viável a utilização de biomassa lignocelulósica em FES como suporte e substrato para o crescimento e fermentação do fungo. Portanto, visando explorar os conceitos e aspectos técnicos do processo, os próximos tópicos abordam de forma sucinta os principais parâmetros que influenciam na fenomenologia e dinâmica fermentativa de FES.

2.3.2.1 *Fundamentos Técnicos*

A FES é um processo fermentativo no qual utiliza-se uma matriz sólida como suporte e também, em alguns casos, como substrato e fonte de nutrientes para o crescimento de um determinado microrganismo. Sua dinâmica está mais próxima de um habitat natural, portanto microrganismos submetidos à FES se adaptam mais rapidamente. Assim, a quantidade de água no sistema deve ser limitada a uma quantidade mínima, evitando o seu excesso (Pandey et al., 2001). A matriz sólida usada como suporte servirá de apoio possibilitando a aderência do microrganismo em sua superfície, neste contexto é feita de um material inerte. Assim, o sistema será suplementado com uma quantidade limitada de solução de nutrientes até se atingir a uma determinada umidade desejada (Raimbault, 1998).

A escolha da matriz sólida apresenta forte dependência com o microrganismo escolhido, produto de interesse e da disponibilidade de recursos para o processo fermentativo. Partículas inertes oferecem a vantagem de se obter um sistema com um maior controle das propriedades físico-químicas e geométricas, melhorando a aderência dos microrganismos ao suporte, bem como as taxas de transferência de temperatura e massa (Ooijkaas et al., 2000). Em contrapartida, suportes usados como substratos, como é o caso de subprodutos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, sabugo de milho, e entre outros) oferecem um ambiente mais nutritivo, eliminando em muitos casos a necessidade de suplementação nutricional, além do fato de seres economicamente atrativos (Krishna, 2005).

De fato, há inúmeros estudos com diversas estratégias e, a comparação entre eles é desafiadora devido a especificidade de cada caso estudado. No entanto, existem diversos artigos de revisão que podem ser consultados para melhor entendimento (Ooijkaas et al., 2000; Rodríguez et al., 2021). Independente do tipo, alguns parâmetros das matrizes desempenham função importante no sistema, os quais podem ser definidos por: composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água (Krishna, 2005).

Dito os efeitos da matriz, é preciso entender mais sobre a dinâmica dos fatores biológicos, físico-químicos e ambientais que afetam a FES. Como em todo processo fermentativo, existem variáveis que regulam o metabolismo microbiano, levando em consideração o uso de fungos, o tipo de inóculo utilizado afeta diretamente a velocidade de crescimento, tempo de fermentação e tipo de produto obtido. É vantajoso se utilizar esporos

como inóculo devido sua maior resistência, conveniência, maior flexibilidade na estocagem e facilidade de manuseio (Gowthaman et al., 2001).

Umidade e atividade de água (A_w) são parâmetros físico-químicos que estão correlacionados e desempenham função fundamental na taxa de crescimento microbiano e síntese de metabolitos. Basicamente, A_w é uma relação de equilíbrio entre a proporção de vapor da água na fase gasosa e na mistura com o substrato. É corriqueiro simplificar este parâmetro medindo simplesmente a umidade do sistema, entretanto A_w é dependente do tipo de substrato utilizado, bem como sua capacidade de absorver e reter água internamente (Raimbault, 1998). Normalmente, fungos conseguem sobreviver entre uma faixa de umidade de 20-70%, já bactérias necessitam umidades maiores que 70%, fato que torna o processo mais atrativo para fungos uma vez que manter umidade em sistemas de FES é desafiador devido as taxas de evaporação provenientes do aumento de temperatura (Krishna, 2005).

Indiferentemente, em FES, pH e temperatura estabelecem efeitos adversos traduzidos tanto por impactos positivos ou negativos. Os fungos possuem uma faixa ótima flexível de pH variando entre 2 – 7, no entanto, existem metabólitos específicos que são sintetizados em faixas restritas de pH. Neste caso, é necessário proceder com uma suplementação de soluções tampão para prevenir a queda do pH. Apesar de parecer simples, a medição do pH em meios sólidos é de difícil acesso e equipamentos apropriados para esses tipos de sistema são pouco desenvolvidos (Lonsane et al., 1992). Portanto, estabelecer estratégias de prevenção para eventuais problemas associados a queda de pH são soluções mais viáveis do ponto de vista técnico.

No que diz respeito sobre temperatura, é preciso ser cauteloso, pois é um dos parâmetros que mais influenciam o sistema e extremamente difícil de ser controlado. Variações de temperatura e a ausência de um sistema eficiente de trocas térmicas pode levar a diminuição de produtividade e até morte do microrganismo em casos de aumento abrupto de temperatura (Pandey et al., 2001). Além disso, a presença de umidade e propriedade heterogênea do substrato leva a formação de gradientes térmicos ao longo do volume do recipiente utilizado (Krishna, 2005). A fim de mitigar esses problemas correlacionados, um bom sistema de trocas convectivas e condutivas de temperatura deve ser montado. Para isso, utiliza-se aeração forçada para aumentar o coeficiente de convecção, levando a uma maior transferência de calor. No entanto, sistemas como esse podem também acarretar a perda de umidade por evaporação, portanto é importante definir, preliminarmente, o fluxo e umidade do ar, bem como ter um sistema de controle adequado para garantir precisão nos valores determinados (Gowthaman et al., 2001).

Agitação e aeração estão intimamente conectados e são variáveis que podem ser manipuladas a fim de se obter um sistema mais homogêneo em termos de composição nutricional e disponibilidade de oxigênio, o qual é determinante em processos aeróbicos. Além disso, aeração favorece a exaustão de gás carbônico e troca de temperatura, promovendo um aumento da atividade metabólica (Pandey et al., 2001). Contudo, a agitação contínua, modo normalmente conduzido em fermentações submersas, pode resultar em efeitos negativos em FES. De fato, agitação pode romper e danificar a formação dos micélios e a geometria do suporte sólido, o que gera efeitos adversos no quesito da transferência de massa global do sistema (Lonsane et al., 1992). Ainda assim, agitação intermitente pode ter respostas positivas no metabolismo microbiano, fortalecendo seu crescimento e homogeneizando as partículas e os aspectos abióticos no recipiente utilizado (Krishna, 2005).

Desta forma, é importante ressaltar que, apesar de FES ser uma técnica mais robusta que fermentações submersas, as condições de processo exercem, embora em magnitude distintas, influência similar em ambos os sistemas. A FES onde as variáveis de processo são devidamente controladas é consideravelmente atrativo de um ponto de vista industrial, entretanto, escalas maiores demandam operações precisas de controle devido a necessidade da alta transferência de massa e oxigênio. Diante disso, nota-se ainda, apesar do desenvolvimento de reatores promissores (Ashok et al., 2017), uma grande carência em sistemas de FES, fator que mitiga sua implementação industrial, atrasando a mudança para um sistema sustentável de produção de biomoléculas. Além disso, grande parte das biomassas utilizadas são de origem lignocelulósica e pré-tratamentos devem ser conduzidos visando aumentar a acessibilidade às moléculas fermentescíveis.

2.3.2.2 *Biomassa Agroindustrial como Substrato em FES*

Os subprodutos do processamento de diferentes alimentos e produtos agroindustriais são fontes ricas em macro e micronutrientes e podem ser reaproveitados em FES por apresentarem, estado material sólido. De fato, inúmeros estudos são conduzidos explorando matéria-prima renovável com foco na produção de biomoléculas de maior valor agregado como, enzimas, biopigmentos, ácidos orgânicos, biossurfactantes e entre outros (Soccol et al., 2017; Rodríguez et al., 2021). No entanto, subprodutos agrícolas carregam uma definição ampla do que necessariamente se encaixa nessa categoria.

Neste sentido, dentro da categoria de biomassa vegetal, encontra-se os materiais lignocelulósicos. A implementação dos mesmos em processos que gerem produtos de maior valor agregado é, altamente, atrativa devido a sua abundancia no mercado e uma vez que representam um material renovável e ambientalmente ecológico (Zabed et al., 2017). Biomassa lignocelulósica possui uma estrutura química complexa, apresenta alta composição de carboidratos e polissacarídeos e podem ser usados como fonte primaria de carbono para o crescimento celular de microrganismos em FES (Abu-Yazid et al., 2017).

Precisamente, lignocelulose é um material semicristalino com regiões amorfas (desordenadas) e cristalinas (ordenadas), é composta por três componentes principais celulose (40-50%), hemicelulose (20-40%) e lignina (20-30%), os quais são polímeros formados majoritariamente por monômeros de glicose (conectados via β -1,4 ligações glicosídicas), pentoses e acetatos, e lignina representando uma macromolécula composta por anéis polifenólicos e terpenoides (Chandra et al., 2007; Agbor et al., 2011). A lignina possui um mecanismo de proteção do tecido das plantas, inibem a invasão de patógenos e conferem resistência para a fibra. Portanto, apresenta também características recalcitrantes para o metabolismo microbiano e as enzimas associadas (Agbor et al., 2011).

Desta forma, para que a biomassa seja eficientemente utilizada por microrganismos, pré-tratamentos que visam a remoção da lignina são necessários, prioritariamente a condução de processos fermentativos. Conforme ocorre a deslignificação, outros efeitos adversos também são gerados; a ruptura das fibras e abertura de poros no material facilita a penetração de enzimas responsáveis pela degradação dos polissacarídeos remanescentes, neste caso, complexos enzimáticos de celulase (Agbor et al., 2011); entretanto, frações, por mais que menores, de celulose e hemicelulose também estão suscetíveis a degradação durante os pré-tratamentos. Portanto, o objetivo deve ser minimizar as perdas de material fermentescível e maximizar a redução do conteúdo de lignina.

Brevemente, os pré-tratamentos podem ser classificados em químicos, físico-químicos, físicos, biológicos e combinados. Todavia, variam de acordo com sua viabilidade tecno-econômica, aspectos ecológicos adjunto aos seus inerentes impactos ambientais e são altamente específicos no quesito funcional. Em outras palavras, são selecionados dependendo da molécula alvo de remoção ou destino final da biomassa. Por exemplo, pré-tratamentos químicos como hidrólise alcalina são utilizados para a remoção de lignina e reduzir o grau de polimerização do material. Nesses métodos, bases fortes como NaOH (hidróxido de sódio), KOH (hidróxido de potássio) e Ca(OH)_2 (hidróxido de cálcio) são

usados para romper as ligações químicas entre os complexos macromoleculares existentes entre os componentes da biomassa.

A reatividade dos carboidratos remanescentes aumenta conforme lignina é removida, uma vez que se tornam mais disponíveis na matriz heterogênea do material (Chandra et al., 2007). Na Figura 13, um esquema ilustrativo dos efeitos do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica pode ser encontrado. Outros métodos físico-químicos, como cavitação hidrodinâmica, utilizam fundamentos fluidodinâmicos para criar um ambiente de alta turbulência e gradientes de pressão que auxiliam na remoção da lignina, amenizando as perdas de matéria-prima e dispensando altas concentrações dos reagentes químicos (Terán-Hilares et al., 2018). Um resumo da diversidade de pré-tratamentos e suas respectivas características podem ser encontradas na Tabela 2.

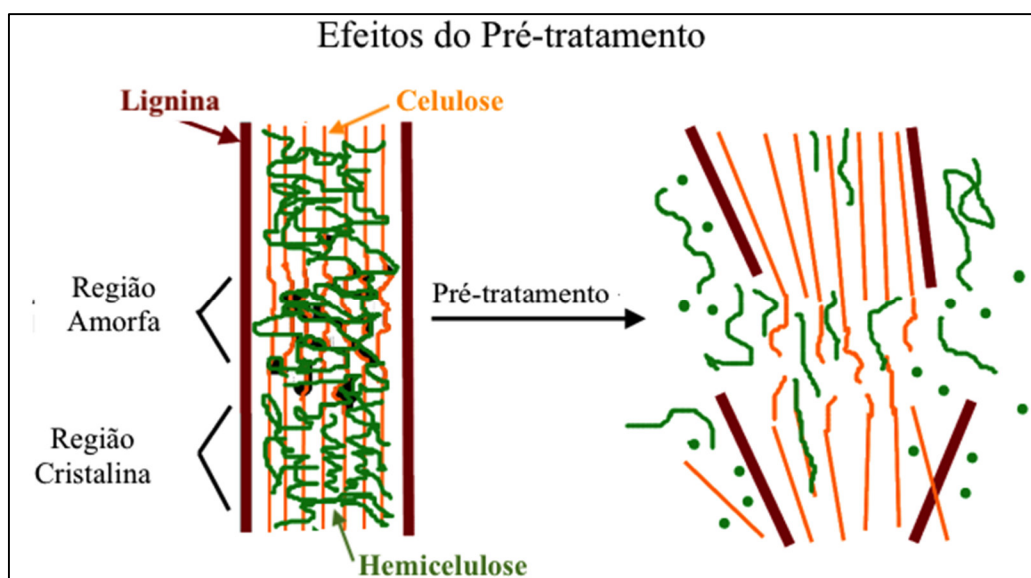


Figura 13. Representação do processo de pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica. Adaptado de Ji et al. (2011).

Tabela 2. Diferentes pré-tratamentos aplicados às biomassas lignocelulósicas. Adaptado de Zabed et al. (2017); Prado et al. (2021)

Categoria	Método	Efeitos	Atratividade Tecno-económica-ambiental
Físico	Moinho Mecânico	<ul style="list-style-type: none"> • Quebra da estrutura lignocelulósica • Redução da cristalinidade da celulose 	**
	Irradiação	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da área superficial da biomassa • Melhora na liberação de glicose 	*
Químico	Ácido diluído	<ul style="list-style-type: none"> • Melhoramento da hidrólise de celulose • Alta taxa reacional e conversão 	**
	Alcalino	<ul style="list-style-type: none"> • Alta remoção de lignina • Alta taxa reacional 	**
Físico-químico	Explosão de CO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Efetiva remoção de lignina • Baixa degradação de açúcares 	***
	Cavitação hidrodinâmica	<ul style="list-style-type: none"> • Alto índice de sacarificação enzimática • Efetiva remoção de lignina e hemicelulose • Possibilidade de trabalho em regime contínuo 	**
Biológico	Degradação microbiana (fungos)	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do grau de cristalinidade da celulose e hemicelulose • Condições brandas de processo 	**

Sendo que - *: baixa atratividade; **: média atratividade; *: alta atratividade**

Portanto, implementar materiais lignocelulósicos em FES pode não ser tão simples, é preciso avaliar os impactos ambientais gerados a partir dos pré-tratamentos bem como dos processos de purificação após o período fermentativo. Afora, a viabilidade tecno-económica do processo estará parcialmente associada à sua produtividade, neste sentido, avaliar, criteriosamente, as variáveis que podem ser manipuladas a fim de se obter uma operação mais rentável e unificando a necessidade de um desenvolvimento sustentável é de extrema importância para a difusão da tecnologia de FES no mercado agroindustrial.

2.4 Insumos Agrícolas a Base de Compostos Bioativos

O desenvolvimento de produtos cujas aplicações estejam pautadas em auxiliar a implementação de uma agricultura sustentável e orgânica não é apenas impreterível ao Brasil, mas também se concretiza como uma pauta mundial e alinhada aos objetivos da ONU para a Agenda de 2030. De fato, pelos motivos já proferidos no início desta tese, o Brasil mais do que muitos países, necessita de tecnologias nacionais para suprir a demanda por insumos agrícolas e garantir a disponibilidade e soberania alimentícia nacional.

Este tópico, tem como foco, cadenciar o racional sobre o caminho epistemológico estruturado para, sobretudo, sistematizar os conceitos e inovações tecnológicas e, por meio destas hipotetizar o potencial da tecnologia presente que se encontra em estado de maturação e, por fim, examinar alguns dos possíveis efeitos de uma formulação agrícola a base de biossurfactantes produzido pela levedura *Starmerella bombicola* e biofertilizante produzido pelo fungo entomopatogênico *Trichoderma harzianum*.

2.4.1 Formulações a Base de Biossurfactantes: Estratégias e Aplicações

As patentes desenvolvidas que se mostram relevantes e fazem uso dos soforolipídeos com foco em formulações de proteção biológica e antimicrobiana, podem ser encontradas na Tabela 3.

É notório, de fato, que os soforolipídeos apresentam alta capacidade antimicrobiana (Tabela 3), desta forma, sua utilização integrada à formulações, nas quais estejam aderidos biofertilizantes provenientes de fungos filamentosos se torna contra-intuitiva e específica à espécie de fungo implementada. De fato, de acordo com o que foi atestado por Gross e Shah (2005) através da patente US20050164955A1 e, também por Schofield, Thavasi e Gross (2013) através da patente US20130085067A1, o uso dos soforolipídeos tanto naturais quanto estruturalmente modificados podem ser utilizados para o controle biológico de fungos como *Candida albicans*, *Candida antarctica*, *Candida tropicalis*, *Fusarium asiaticum*, *Botrytis cinerea*, *Ustilago maydis*, *Penicillium chrysogenum*, *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*, entre muitos outros. Na realidade, os trabalhos apontam que a mistura de diversos soforolipídeos potencializa o efeito de controle biológico com respeito aos ensaios com soforolipídeos purificados.

Tabela 3. Principais patentes envolvendo o uso e produção de soforolipídeos para aplicação na agricultura.

N° Patente	Aplicação	Empresa/ Instituição	País	Referência
DE102014209346A1	Agricultura	Evonik Operations GmbH	Alemanha	Ewald Sieverding (2014)
US20140024816A1	Agente antimicrobiano	SyntheZyme LLC	Estados Unidos da América	Gross e Schofield (2013)
US20120220464A1	Adjuvante Pesticida	Evonik Operations GmbH	Estados Unidos da América	Giessler-Blank et al. (2016)
EP2951311A1	Agente antimicrobiano	SyntheZyme LLC	Patente Europeia	Gross e Thavasi (2013)
US20050164955A1	Agente antifungico	SyntheZyme LLC	Estados Unidos da América	Gross e Shah (2005)
EP2718411B1	Agricultura	Ecover Co Ordination Center NV	Patente Europeia	Develter e Renkin (2011)
US20130085067A1	Agente antimicrobiano	Polytechnic Institute of NYC	Estados Unidos da América	Schofield; Thavasi; Gross (2013)

Além disso, ao melhor de nosso conhecimento, não foi encontrado nenhum trabalho ou estudo mostrando a compatibilidade de biossurfactantes e fungos filamentosos para compor os princípios ativos de fertilização e bioproteção. Isto implica que, diante do microrganismo ideal, método de cultivo e estratégia de formulação, a integração entre biossurfactantes e fungos promotores do crescimento de plantas se apresenta como alternativa altamente promissora no campo da agricultura.

É nesta instância, que este trabalho, de forma pioneira, desenvolveu formulações para aplicação na agricultura à base de *Trichoderma harzianum* e soforolipídeos provenientes da levedura *S. bombicola* Y-6419, utilizando adjuvantes secagem renováveis à base de material lignocelulósico no processo de liofilização dos soforolipídeos, bem como no processo de secagem de esporos. Devido a estes quesitos, e à aplicação de matéria-prima renovável lignocelulósica e amilácea para a produção das biomoléculas em questão, este trabalho se difere dos diversos outros encontrados em patentes e em literatura científica.

2.4.2 *Formulações a Base de Fungos Entomopatogênicos: Estratégias e Aplicações*

Devido aos múltiplos benefícios encontrados nos fungos entomopatogênicos, especificamente, em espécies de *Trichoderma*, as patentes relacionadas com a produção de biofertilizantes e biopesticidas à base dos mesmos e suas respectivas aplicações em diferentes cultivares são numerosas. Contemplam-se, neste aspecto, trabalhos e produtos desenvolvidos que corroboram a utilização do fungo, a partir de biomassa residual fermentada, contra doenças originárias do solo derivadas de, por exemplo, patógenos de *Fusarium* e *Sclerotial* (Patente - WO2011099026A1); formulações destinadas à melhoria da composição nutricional e biótica do solo compostas de diversas espécies de *Trichoderma* sp. (Patente - WO2018215925A1) e, muitos outros exemplos que podem ser encontrados na Tabela 4.

As patentes envolvendo o uso de *Trichoderma* sp. em formulações biopesticidas e fertilizantes baseiam-se nos conceitos metodológicos de fermentação em estado sólido, majoritariamente. Dentre elas, muitas utilizam resíduos não convencionais, como biomassas provenientes de cultivos de tabaco, uva, pecuária, grãos, entre outros. Neste sentido, não é, precisamente, um assunto pioneiro a sua utilização em fermentação em estado sólido utilizando biomassa vegetal como substrato e superto sólido. No entanto, poucos trabalhos focam em aprimorar os efeitos de fertilização provenientes dos fungos por meio da adição de aditivos e bioestimulantes.

De fato, a adição de bioestimulantes pode ser um caminho para melhorar excreção, estabilização e o efeito catalisador de enzimas. Como foi mencionado anteriormente, os biossurfactantes conferem tais efeitos quando integrados aos organismos associados, sejam eles, plantas ou microrganismos. Deste modo, o desenvolvimento de formulações com as quais sejam apresentadas propostas de integração de bioativos se mostra como fundamental necessidade para potencializar os efeitos dos inoculantes e enzimas presentes nas formulações.

Tabela 4. Principais patentes envolvendo o uso do fungo *Trichoderma* sp. como agente de controle biológico e unidade ativa de biofertilização.

N° Patente	Aplicação	Empresa/ Instituição	País	Referência
WO2011099026A1	Biofungicida	-	França	Patel (2011)
WO2018215925A1	Fertilizante	-	França	Aggarwal et al. (2018)
US20060292124A1	Agente de controle biológico	Aligarh Muslim University - Department of Biotechnology	Estados Unidos da América	Khan et al. (2006)
CN104446895A	Fertilizante	-	China	张常书 (2017)
CN102040403A	Fertilizante	Research Center for Eco Environmental Sciences of CAS	China	白志辉 et al. (2011)
US8598083B2	Indutor de crescimento	University of Saskatchewan University of Washington	Estados Unidos da América	Kaminskyj et al. (2013)
CN102925366A	Agente de controle biológico	Ningguo Bai Lide Biological Technology Co. Ltd.	China	牛贍光 et al. (2013)

Há recentes suposições de alternativas que poderiam ser procedidas a fim de se obter produtos robustos de proteção biológica e promotores de crescimento de plantas, as quais são mencionadas em patentes recentemente desenvolvidas, uma delas envolvendo o controle de pragas pela utilização de fungos Entomopatogênicos (WO 2019/165413 A1) e, outra no contexto do desenvolvimento de um produto de característica efervescente, englobando diversos bioestimulantes, nutrientes e pesticidas (US 2022/ 0272987 A1). Salienta-se também, que apesar de os mais recentes trabalhos envolverem fungos entomopatogênicos e moléculas bioestimulantes, podendo classificar os BSs como sendo um dos tipos destas, é evidente observar que a combinação de soforolipídeos e *Trichoderma harzianum* é apresentado como uma novidade de grande potencial.

3 OBJETIVOS

3.1 Desenho Conceitual da Tecnologia

Este estudo em questão tem como o principal objetivo desenvolver uma formulação cujas principais funções compreendem indução do crescimento de plantas e proteção biológica a eventuais pragas e fitopatógenos. De fato, o caminho para o melhoramento de produtos, com os quais seja possível desenvolver um sistema de cultivo intensivo na agricultura sem ou atenuando a utilização de defensivos agrícolas sintéticos e fertilizantes químicos, comporta diversos problemas que podem estar associados tanto ao processo de geração quanto ao manuseio e eficácia do produto.

Deste modo, a escolha da integração entre os benefícios envolvidos no uso de fungos entomopatogênicos (controle de pragas e fitopatógenos) e fungos promotores do crescimento de plantas, assim como no uso de biossurfactante para compor as unidades ativas da formulação é justificável por seus atributos físico-químico e, sobretudo, biológico. No entanto, o caráter antimicrobiano (e.g fungicida e antibiótico) e propriedades físicas dos biossurfactantes produzidos como alta viscosidade, baixa cristalinidade e, sua baixa solubilidade, de um modo geral, poderiam se apresentar como empecilhos diante da possibilidade da ação conjunta com o fungo e, de sua manipulação pelos usuários do produto.

Neste contexto, primeiramente, analisar a biocompatibilidade entre os biossurfactantes produzidos pela levedura *S. bombicola* UFMG-CM-Y6419 e o fungo *T. harzianum* CCT 2160, foi de extrema importância para demonstrar pela primeira vez que o fungo foi capaz de crescer e realizar suas atividades metabólicas mesmo em altas concentrações dos biossurfactantes. Em uma segunda instância, não menos importante, visando facilitar o manuseio dos bioprodutos para os agricultores e usuários, destaca-se a estratégia utilizada, ineditamente, a qual consiste na implementação de uma composição de biomassas lignocelulósicas e amiláceas como adjuvantes no processo de secagem dos biossurfactantes, tornando-os um produto em pó e, favorecendo uma melhor manipulação quando aplicados aos cultivares.

Com isso, o desenvolvimento de um bioinsumo formulado à base de biossurfactantes e um fungo se mostra como alternativa promissora de caráter inovador, promovendo uma agricultura orgânica voltada à agroecologia e, incentivando a criação de tecnologias nacionais, das quais se pode autonomizar o mercado brasileiro no que diz respeito aos produtos agrícolas.

3.1 Objetivos Gerais

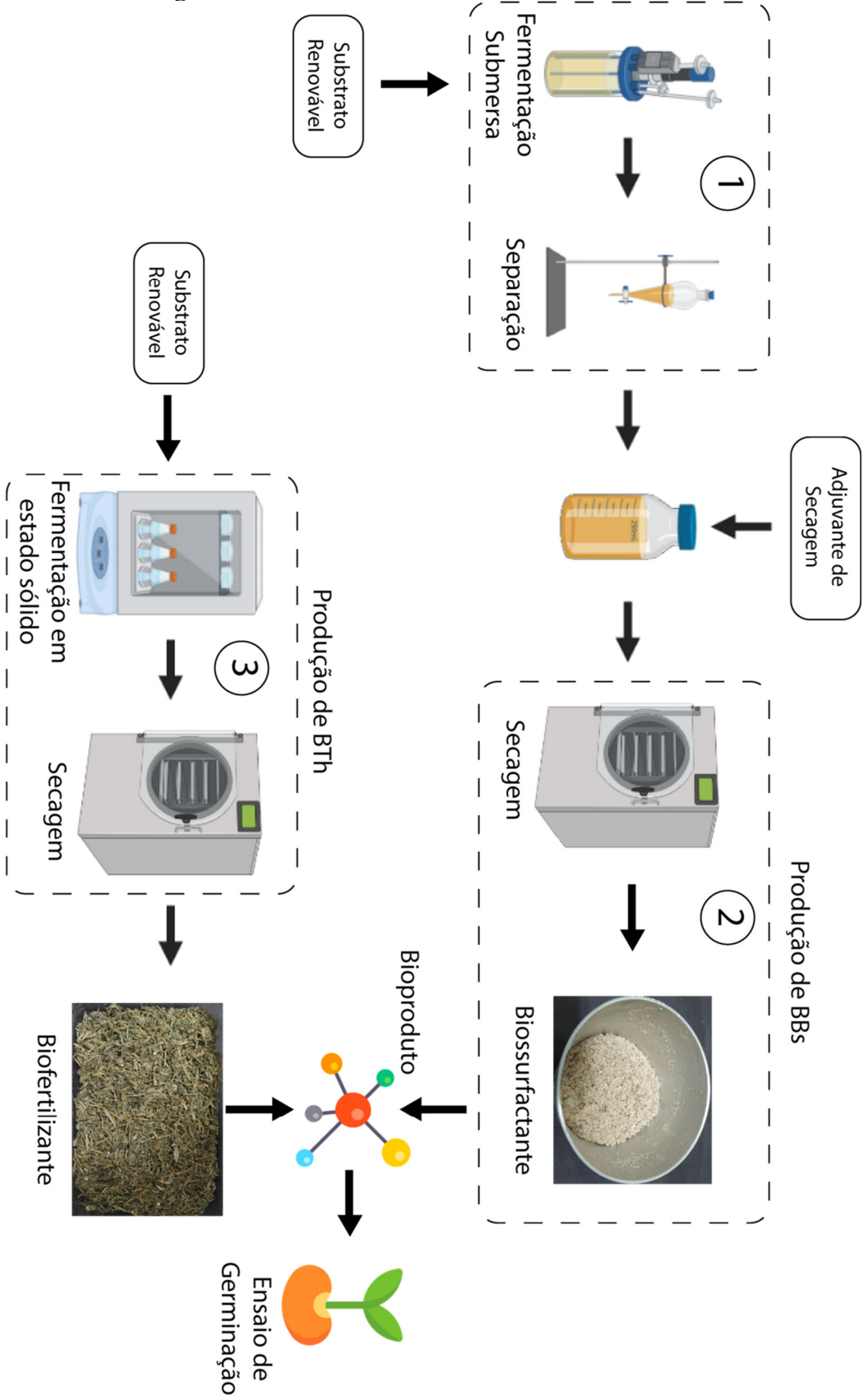
- Estabelecer o processo de biossíntese de: biossurfactantes pela levedura *S. bombicola* UFMG-CM-Y6419 e biofertilizante à base de *T. harzianum* CCT 2160, utilizando substratos renováveis;
- Investigar os efeitos da aplicação de biossurfactantes derivados da levedura *S. bombicola* UFMG-CM-Y6419, esporos e metabólitos secundários do fungo filamentososo *T. harzianum* CCT 2160 no crescimento de plantas.

3.2 Objetivos Específicos

- Produção de BSs pela levedura *S. bombicola* UFMG-CM-Y6419 por meio da utilização de matérias-primas renováveis;
- Produção de biofertilizante à base do fungo entomopatogênico *T. harzianum* CCT 2160;
- Caracterização dos bioprodutos obtidos;
- Avaliar a biocompatibilidade entre os BSs produzidos e o fungo *T. harzianum*;
- Avaliar o efeito individual e conjunto dos bioprodutos obtidos sobre o crescimento de plantas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de Trabalho



- Descrição do Processo:

(1) Nesta unidade operacional conduziu-se os cultivos aeróbicos submersos para a produção e separação dos compostos bioativos provenientes do metabolismo de uma levedura nativa brasileira da espécie *Starmerella bombicola*. Como matéria-prima para a síntese dos biossurfactantes, utilizou-se fontes de carbono e nitrogênio renováveis como óleo de cozinha residual e farelo de arroz, respectivamente. Salienta-se que as fontes alternativas de nitrogênio e carbono são múltiplas, e não é necessário limitar-se a apenas as fontes mencionadas. De fato, outros subprodutos agroindustriais como farelo de trigo, soja, sorgo, milho e outros também são fontes enriquecidas em carboidratos, proteínas, lipídeos e micronutrientes, o que amplia as possibilidades de utilização de fontes renováveis, adequando-se a disponibilidade de cada região. Afora, destaca-se também a possibilidade de uso de outras fontes de carbono residuais como subprodutos de indústria de alimentos, óleos e glicerol residual provenientes de biorefinarias de biodiesel, lipídeos intracelulares de microalgas e entre outros. Sobretudo, leveduras nativas isoladas de ecossistemas dinâmicos apresentam alta versatilidade quanto ao potencial de assimilação de fontes alternativas de nutrientes, suscitando em desempenhos diferenciados e possibilidade de adequação do processo aos objetivos sustentáveis estabelecidos para a próxima década.

A separação dos biossurfactantes foi realizada a partir de métodos químicos, utilizando solventes de baixa toxicidade. Por outro lado, há outras possibilidades para esta operação como separação mecânica ou precipitação. Nestes dois últimos, o método consiste em separar tanto por diferença de densidade ou por solubilidade e em ambos os casos nota-se o caráter ecológico e sustentável do processo por permitir a não utilização de solventes orgânicos.

(2) Ressalta-se nesta unidade operacional a originalidade e pioneirismo do processo de secagem desenvolvido por meio da utilização de adjuvantes de secagem renováveis. Neste caso, foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz como veículos de adsorção do biossurfactante em sua superfície. Outras biomassas também se apresentam como alternativas ou até mesmo a própria lignina, a qual apresenta propriedades ligantes intensificadas devido ao seu aspecto química estrutural. Ao final, os biossurfactantes que por um lado em temperatura ambiente apresentam aspecto oleaginoso e viscoso, após o processo de secagem, obteve-se um produto em pó adsorvido pela

biomassa. O processo de dessorção é simples e demanda apenas um meio aquoso para ressolubilizar o bioativo.

(3) A fermentação em estado sólido foi conduzida por meio da utilização de biomassas lignocelulósicas e amiláceas como fontes de carbono e suporte para o crescimento do fungo *Trichoderma harzianum* CCT 2160. Neste processo, é válido ressaltar a multifuncionalidade do produto sintetizado, cujas principais características residem em sua capacidade de promover o crescimento vegetal ao mesmo tempo em que realizada a proteção biológica contra eventuais fitos patógenos. Neste contexto, enzimas, metabólitos e esporos são produzidos via fermentação e excretados ao meio extracelular. Após a secagem deste biofertilizante, permanece-se aderido ao substrato sólido a grande maioria dos compostos bioativos mencionados, os quais são responsáveis por conferir o caráter benéfico de sua utilização na agricultura. Quanto ao tipo de biomassa utilizada, salienta-se também que outros subprodutos também podem ser usados, dependendo apenas de sua disponibilidade na região avaliada. Logo, mostra-se um produto versátil e de alta facilidade reprodutiva tanto pelo processo quanto pela matéria-prima empregada. Assim, é possível personalizar o biofertilizante por meio da diversificação do substrato, o qual irá direcionar a excreção de diferentes enzimas e síntese de outros metabólitos dependendo em qual cultivar deseja-se aplicá-los.

4.2 Manutenção de Microrganismos

4.2.1 Isolados de *S. bombicola*

Linhagens de *S. bombicola* de codificação UFMG-CM-Y6419, UFMG-CM-Y6663, UFMG-CM-Y5458, UFMG-CM-Y5447, UFMG-CM-Y5479, UFMG-CM-Y5439 foram fornecidas pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A manutenção das linhagens foi realizada a cada 20 dias em meio YMA (*Yeast Malt Agar*) à 30°C em estufa microbiológica estufa microbiológica (Quimis Q31M04) e estocadas em refrigeração à 4°C após 2 dias de crescimento no meio sólido.

4.2.2 *Linhagem Trichoderma harzianum*

A cepa de *Trichoderma harzianum* CCT 2160 foi obtido através da compra e fornecimento pela Fundação André Tosello (FAT). A manutenção do fungo foi realizada a cada 30 dias em meio ágar de aveia (OA) à 25°C em estufa microbiológica estufa microbiológica (Quimis Q31M04) e estocado em refrigeração à 4°C após 5 – 7 dias de crescimento no meio sólido.

4.3 **Matéria-Prima**

4.3.1 *Subprodutos Agroindustriais utilizados como matéria-prima*

Bagaço de cana de açúcar (BCA) foi fornecido e coletado na usina Ipiranga, Descalvado-SP. Casca de Arroz (CA) e Farelo de Arroz (FA) foram adquiridos e coletados no centro de beneficiamento de arroz Irmãos Zangrandi Comércio de Arroz Ltda. da cidade de Guaratinguetá-SP.

Diferentes óleos de cozinha residuais (OCR) de origem vegetal foram coletados em domicílios locais da cidade de Guaratinguetá, estado de São Paulo.

4.3.2 *Pré-tratamentos*

4.3.2.1 *Pré-tratamento Alcalino (PTA) das Biomassas Lignocelulósicas*

Em cada ensaio, em Erlenmeyer de 6L aproximadamente 7,5% (m/v) de biomassa lignocelulósica (BCA e CA) foram inseridas com um volume de trabalho de 3 L de uma solução 0,16 g NaOH/g biomassa. Os recipientes foram vedados e submetidos ao aquecimento à 121°C e 1 atm em autoclave por 20 minutos. Após o término, as biomassas foram lavadas com água destilada até que o aspecto seboso e coloração amarronzada desaparecesse e o pH neutralizado; foram secadas em estufa à 60°C por 48 horas e reservadas em refrigeração à 4°C para suas posteriores utilizações.

4.3.2.2 *Pré-tratamento Físico*

Filtrou-se 6L de OCR utilizando um funil preenchido por palha de aço, sendo a fração retida sólidos particulados; o líquido permeado (fração de interesse) foi misturado com água

em proporção de volume (1:1) em um tanque e submetido a agitação a fim de remover os sais hidrossolúveis. As duas fases resultantes foram separadas por gravitação, sendo a fase aquosa removida pelo fundo do tanque, enquanto OCR foi recuperado e reservado à 4°C para posterior utilização.

4.3.2.3 *Obtenção do Extrato de FA*

Pesou-se 200 g de FA e colocou-os em 2 L Erlenmeyer, adicionando uma quantidade de 1 L de água destilada. O meio foi propriamente homogeneizado, vedado e submetido à 121°C e 1 atm em autoclave por 20 minutos. O produto obtido, denominado composto pelo Extrato do farelo de Arroz (EFA) e particulado sólido foi filtrado; a fração permeada foi centrifugada à 4000 rpm em uma centrifuga de bancada (Hitachi-Himac CF16RN) por 10 minutos, separando o sólido particulado fino do sobrenadante rico em EFA. Por fim, o EFA foi autoclavado à 121°C e 1 atm por 15 minutos para garantir esterilidade e estocado em freezer à -5°C.

4.3.3 *Caracterização Química*

4.3.3.1 *Biomassa Lignocelulósica*

A caracterização das frações de carboidrato, lignina, extrativos e cinzas de BCA e CA foi realizada a partir do método estabelecido e padronizado por Sluiter et al. (2011). As concentrações dos açúcares foram quantificadas a partir de uma análise por cromatografia líquida de alta performance (CLAP) através de um cromatógrafo (Agilent Technologies 1200 series). Composição química do EFA foi determinada por análise colorimétrica em um espectrofotômetro (Eppendorf BioSpectrometer), sendo avaliado as concentrações de proteínas totais, fenólicos, açúcares totais e lipídios totais, enquanto para açúcares redutores a mesma análise por CLAP foi conduzida.

4.3.3.2 *Óleo de Cozinha Residual*

As frações de ácidos graxos presentes em OCR foram caracterizados a partir do método estabelecido pela Sociedade de Químicos Americanos de Óleos (AOCS), método 16. Este método consiste na derivatização metanólica dos respectivos ácidos graxos

presentes no OCR. Para isto, 100 – 200 mg de OCR foram dissolvidos em 5 mL do reagente e catalisador $\text{CH}_3\text{OH}/\text{BF}_3$ (Fluoreto de Boro em metanol 15%) e inseridos em um balão de destilação de 50 mL. O sistema foi inserido em um recipiente contendo glicerol a 60°C e acoplado a um condensador arrefecido com água a 6°C através da camisa de resfriamento para evitar a perda por evaporação. Após 15 minutos de reação, adicionou-se 40 mL de solução saturada de NaCl e, por fim, a fase orgânica foi coletada e reservada para análise. A identificação dos ácidos graxos contidos em OCR foi realizada por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (CG-EM) equipado com uma coluna RTX-5 (Restek) de diâmetro 0,25 mm a uma temperatura de injeção de 275°C , temperatura inicial 65°C até que se atingisse 320°C por uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. O índice de peróxidos (meq/Kg) foi determinado através do método IT POV 035 desenvolvido pelo Laboratório Nacional Agropecuário em Goiás/Lanagro-GO.

4.4 Ensaios Fermentativos

4.4.1 *Produção de Biossurfactantes pela Levedura S. bombicola através de Fermentação Submersa*

4.4.1.1 *Seleção dos Isolados de S. bombicola (Screening)*

Os ensaios para seleção da linhagem mais adaptada ao uso de OCR foram procedidos da seguinte forma; inóculos dos isolados de *S. bombicola* foram primeiramente cultivados em frascos Erlenmeyer de 50 mL em meio de Lang modificado Glicose (100 g/L); extrato de levedura (4 g/L); NH_4Cl (1,5 g/L); KH_2PO_4 (1 g/L); K_2HPO_4 (0.16 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.7 g/L); NaCl (0.5 g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.27 g/L) por 48 horas em agitador rotacional, New Brunswick Scientific Excella E24; em seguida, transferiu-se 0,5 mL de células para novos frascos contendo novamente meio de Lang modificado suplementado com 4% (v/v) de OCR e conduzidos por 168 horas de fermentação. Os ensaios foram submetidos à 30°C , 200 rpm e pH 5,7. Amostras foram coletadas em 168 horas para medição de índice de emulsificação (E_{24}), redução da tensão superficial (TS) e quantificação de biossurfactante (g/L). Os ensaios foram conduzidos em triplicatas.

4.4.1.2 *Avaliação da Substituição da Fonte de Nitrogênio e Dosagem da concentração de OCR*

A avaliação da substituição da fonte de nitrogênio pelo extrato de farelo de arroz (EFA) e dosagem de OCR foi verificada a partir de um desenho experimental do tipo fatorial 2^2 com três pontos centrais. Neste desenho, as variáveis manipuladas: EFA (% v/v) e OCR (g/L) foram examinadas implementando os limites mínimos e máximos para cada uma delas; como variável de saída tem-se concentração de BS (g/L). Os ensaios foram conduzidos em agitador rotacional, New Brunswick Scientific Excella E24, por um período de 168 horas, no final das quais BS foi extraído e quantificado em espectrofotômetro, Biospectrometer Eppendorf, com comprimento de onda 490 nm (Dubois et al., 1956). A Tabela 3 apresenta os limites mínimos e máximos de cada variável inserida no software Statistica (StaSoft, Inc., OK, USA), montando desta forma combinações entre cada variável a ser analisada. Os resultados são reportados em termos de análise de variância (ANOVA).

Tabela 5. Disposição das Corridas Experimentais Montadas a Partir do Software Statistica (StaSoft, Inc., OK, USA)

Ensaios	EFA(% v/v)	OCR (g/L)
1	0(-)	32(-)
2	50(+)	32(-)
3	0(-)	100(+)
4	50(+)	100(+)
5	25(0)	66(0)
6	25(0)	66(0)
7	25(0)	66(0)

4.4.2 *Produção de Esporos pelo Fungo *T. harzianum* através de Fermentação em Estado Sólido (FES)*

4.4.2.1 *Estudo da Composição do Meio de Cultivo e Tamanho de Partícula*

Farelo de Arroz (FA), CA e BCA foram separados e trituradas até atingirem o diâmetro de partícula (ϕ) necessário para cada ensaio. Em um reator de múltiplas divisões (Figura 14), aproximadamente 3 g de biomassa seca, apresentando ϕ entre 125 μm – 1180 μm , foram pesadas e colocadas em cada quadrante, variando entre diferentes proporções de FA/CA/BCA (% m/m/m). O meio foi umidificado com 50% (base molhada – g total/ g líquido + g biomassa seca) com água 100% (v/v), ajustando para pH 7,0 quando necessário.

Uma alíquota de 500 µL (10% v/v) de uma solução pré-estabelecida de 10^6 esporos/mL foi inoculada. O cultivo foi conduzido à temperatura de 25°C em estufa microbiológica, Quimis Q31M04, equilibrando a umidade relativa do ar entre 50 – 80% para diminuir a perda de umidade de dentro do recipiente por transferência de massa. Ao final de 12 dias, os esporos foram extraídos da biomassa fermentada e quantificados em câmara Neubauer.

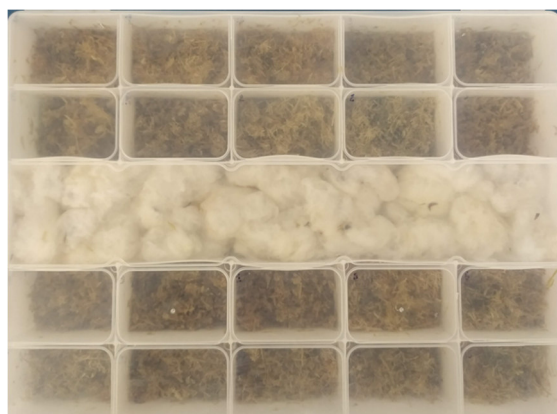


Figura 14. Reator Para FES.

4.4.2.2 *FES em Embalagens de Polietileno*

Embalagens de Polietileno foram preenchidas com 10 g de 2 meios de cultivo: meio M1 composto por 70/15/15 % (FA/BCA/CA – m/m); meio M2 composto por 50/25/25 % (FA/BCA/CA – m/m). As embalagens foram autoclavadas e o meio umedecido até atingir 60 % (base úmida – massa de água/ massa de água + massa substrato) de umidade relativa. A partir de uma solução de esporos de *T. harzianum* com concentração de $8,5 \times 10^6$ esporos/mL, uma alíquota de 1,5 mL foi inoculada e incubada à uma temperatura de 25°C em estufa microbiológica, Quimis Q31M04, por um período de 12 dias. Ao final do período fermentativo, esporos foram extraídos e contabilizados.

4.4.2.3 *Avaliação da biocompatibilidade dos BSs Produzidos no*

Crescimento de T. harzianum

- Meio de cultivo líquido (Fermentação submersa):

O teste de biocompatibilidade entre os biossurfactantes produzidos pela levedura *S. bombicola* Y-6419 e o crescimento do fungo *T. harzianum* CCT 2160 foi realizado,

primeiramente, em meio de cultivo líquido preparado com uma relação Carbono:Nitrogênio (C:N) de 10:1, sendo glicose (36 g/L) e peptona (3,6 g/L) como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente; com respeito ao biossurfactante, o mesmo foi suplementado ao meio de cultivo em uma faixa de concentração de 0,4 g/L - 2 g/L. O cultivo foi realizado a 27°C, 200 rpm durante um período de 4 dias (96 horas). Como resposta, foi analisado o efeito do biossurfactante na biomassa celular final do fungo *T. harzianum* CCT 2160. O controle (meio de cultivo + biomassa celular) foi utilizado como padrão para a comparação do crescimento do fungo perante a aplicação dos biossurfactantes e os resultados foram reportados em biomassa e inibição normalizados, os quais se referenciam nos valores obtidos a partir do controle.

- Meio de cultivo em estado sólido:

Para avaliar o efeito da suplementação de biossurfactantes na produção de esporos do fungo *T. harzianum* CCT 2160, foi realizado um ensaio experimental simples de cultivo em estado sólido de mesma composição (50-70/15-25/15-25 - farelo de arroz/bagaço de cana-de-açúcar/casca de arroz) do meio desenvolvido baseado em biomassas lignocelulósicas e amilácea. As condições de umidade, temperatura, teor de sólidos e concentração de inóculo se mantiveram as mesmas exceto pela umidificação do meio sólido realizada com uma solução de biossurfactantes (0,150 g/L). Ao final, a contagem de esporos foi realizada em uma câmara de Neubauer e comparada ao controle (meio umidificado com água destilada estéril).

4.5 Ensaios de Germinação

Os ensaios de germinação foram realizados com sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e seguiram as etapas baseadas e adaptadas da metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura (2009). Desta forma, as sementes foram retiradas da câmara fria (4°C) 48 horas antes do início dos ensaios; separou-se 100 sementes em estado viável (não danificadas) para cada condição de ensaio aplicada; lavou-se as sementes com uma solução de etanol 70% (v/v) e posteriormente foram enxaguadas com água destilada estéril; logo, foram inoculadas em placas Petri de 150 mm de diâmetro com papéis filtro (celulose) de mesmo tamanho e umedecidas com 20 mL de solução das formulações obtidas a partir dos SLs e do biofertilizante a base de *T. harzianum* (BTh) e por fim, incubadas por 10 dias com

fotoperíodos de 12 horas em uma incubadora BOD. Para cada produto aplicado, bem como para o produto final, o qual contempla a integração dos BBs e BTh, variou-se as suas concentrações aplicadas.

As concentrações equivalentes de esporos e biossurfactante para cada bioproduto foram tomadas como referências no momento de cada diluição dos bioativos, desta forma, os biossurfactantes variaram na faixa de 0,15 - 1 g/L enquanto para os esporos as concentrações variaram entre 5×10^4 - 5×10^6 esporos/mL. A condição otimizada para aplicação de biossurfactantes foi utilizada para se formular o produto final completo (SLs + BTh).

- Análise dos parâmetros cinéticos e morfológicos:

A quantidade de sementes germinadas foi contabilizada a cada 24 horas e os resultados reportados em porcentagem de germinação (%) com respeito ao número total de sementes para cada tratamento. Ao final dos 10 dias de ensaio, os tamanhos de caule e raiz foram medidos com o auxílio de um paquímetro e a quantidade de raízes foi contabilizada para cada tratamento realizado com as formulações. A colonização das raízes pelo fungo *T. harzianum* CCT 2160 e; a influência dos biossurfactantes na geração de raízes secundárias foi verificada a partir de microscopias com um microscópio digital.

4.6 Formulações

Preparo das soluções de esporos (BTh):

Segue os passos para a preparação das soluções de esporos do fungo *T. harzianum* CCT 2160 que foram aplicadas nos ensaios de germinação:

1. Em 100 mL de água destilada estéril colocou-se 10 g de biomassa fermentada a o sistema foi submetido a agitação;
2. Filtrou-se a solução resultante para remover os resíduos sólidos remanescentes;
3. Quantificou-se os esporos em dispersão e se necessário a solução foi diluída para atingir as concentrações de esporos requeridas para cada ensaio germinativo.

Preparo das soluções de biossurfactantes (SLs):

As soluções de biossurfactantes foram preparadas da seguinte forma:

1. Após extração e semi-purificação dos biossurfactantes descrito anteriormente, os mesmos foram secados em uma capela exaustora para a remoção dos solventes utilizados;
2. O extrato cru de biossurfactantes foi ressuspendido em 250 mL de água destilada estéril e sua concentração resultante foi medida a partir do método colorimétrico estabelecido por Madikkieri et al. (2012);
3. As soluções contendo biossurfactantes foram diluídas caso necessário até atingir as concentrações específicas de cada formulação.

Preparo do bioinsumo (SLs + BTh):

O bioinsumo proposto nesta tecnologia pode ser preparado de diversas maneiras. A forma mais intuitiva e direta consiste na seguinte metodologia:

1. Preparar uma solução de 2 a 4 g/L de biossurfactantes;
2. Adicionar a esta solução 10 a 20 gramas do biofertilizantes a base de *T. harzianum*;
3. Liofilizar o sistema resultante a -65°C por 24 – 48 horas, preferencialmente 48 horas.

4.7.1 Preparo do bioativo à base de biossurfactantes (BBs) por meio da utilização de biomassa lignocelulósica como adjuvante de secagem

- Preparo dos BBs:

Com base no ideal de facilitar o manuseio dos biossurfactantes e por conseguinte do produto formulado, foi utilizado de maneira inédita diferentes adjuvantes renováveis de secagem à base de BCA, CA e FA, cuja função é proporcionar uma superfície de contato que servirá como suporte sólido para o bioproduto. Neste sentido, a metodologia de secagem utilizando materiais sólidos foi baseada no artigo de Barcelos et al. (2014).

Deste modo, o processo para secagem dos biossurfactantes consistiu em adicionar 100 g/L de sólidos de uma mistura de diferentes proporções mássicas (% m/m) entre as biomassas vegetais mencionadas em uma solução previamente preparada de biossurfactantes de concentração entre 2,0 – 3,0 g/L. Homogeneizou-se os sólidos em suspensão para formar uma dispersão uniforme do sistema particulado; estas suspensões foram congeladas em um *Ultrafreezer* a -80 °C e por fim, submetidas à liofilização a vácuo em um liofilizador sob

controle de temperatura de -60°C por 24 horas. Posteriormente, avaliou-se o potencial de redução da tensão superficial a partir da ressuspensão dos BBs produzidos a fim de examinar a dessorção do biossurfactante da superfície das partículas.

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 *Quantificação Celular*

4.7.1.1 *Biomassa de S. bombicola*

Concentração de células de *S. bombicola* foi determinada por gravimetria a partir de uma curva analítica feita relacionando a absorbância medida em um espectrofotômetro (Eppendorf BioSpectrometer) com a concentração de biomassa seca. A leitura foi realizada em um comprimento de onda de 590 nm após 48 horas de pré-cultivo em diferentes diluições. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 5 mL de cada diluição para cadinhos pré-pesados que foram submetidos à secagem a 100°C por 48 horas em estufa de peso seco (SolidSteel 7Lab). Após a secagem, pesa-se novamente os cadinhos e quantifica-se biomassa seca.

4.7.1.2 *Esporos de T. harzianum*

Os esporos foram extraídos de placas e das biomassas após as fermentações com uma solução de 0,1% (v/v) Tween 80, 0,9% (m/v) NaCl e propriamente diluídas quando necessário. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 100 µL de suspensão de esporos para câmara de Neubauer, a qual foi submetida a visualização por microscópio. No caso da extração de biomassa lignocelulósica, o mesmo procedimento foi realizado com exceção da secagem da biomassa após extração. Os resultados foram reportados em n° esporos/g biomassa seca segundo a Equação 5.

$$C_e = \frac{N^{\circ} \text{esporos}}{VN} \cdot VE \cdot FD \cdot \frac{1}{BL_s} \quad (5)$$

Onde C_e (n° esporos/g biomassa seca) representa concentração de esporos por biomassa seca, BL_s (g) biomassa lignocelulósica seca, VE (mL) volume de extração, FD (-) fator de diluição, VN (mL) volume câmara de Neubauer.

4.7.2 *Análise do Biossurfactante*

4.7.2.1 *Tensão Superficial*

A análise da tensão superficial das amostras contendo biossurfactante foi realizada através de um tensiômetro digital, Sensadyne, utilizando o método da pressão máxima de bolha (DALTIM, 2011). O equipamento foi operado à 28°C e 50 psi com aproximadamente uma vazão de bolha 1,0 bolhas/s. O resultado é expresso em [mN/m].

4.7.2.2 *Índice de Emulsificação (E₂₄)*

O índice de emulsificação foi avaliado a partir do método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Em um tubo de ensaio, um substrato hidrofóbico (e.g. óleo de soja, azeite de oliva, entre outros) foi adicionada ao meio fermentado livre de células respeitando a proporção 1:1 (v/v) e levado à agitação em um *vortex* (ION VX-38) por dois minutos. A altura de emulsão foi aferida através da camada de espuma formada entre a fase aquosa e oleaginosa após 24 horas, assim, E₂₄ é calculado de acordo com a Equação (6):

$$E_{24} = \frac{h_e}{h_t} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde, h_e é a altura de emulsão e h_t é a altura total do líquido dentro do tubo, o resultado é expresso em porcentagem.

4.7.2.3 *Extração e Quantificação*

A extração do BS foi realizada a partir do método descrito por McGenity et al. (2016). Acetato de Etila foi misturado na proporção 1:1 (v:v) com o caldo fermentado, submetido a agitação vigorosa, em seguida centrifugado por 10 minutos à rotação de 4000 rpm e 4°C. O sobrenadante (fase orgânica) enriquecido em BS foi removido e separado em outro recipiente. Repetiu-se o processo até que não houvesse coloração na fase orgânica. Evaporou-se o solvente em capela de exaustão e, se necessário, removeu-se o excesso de lipídios residuais com Hexano em proporção 1:1 (v:v). O BS semi-purificado foi ressuspenso em Clorofórmio com uma alíquota de volume igual ao volume de

fermentação. Esta solução foi estocada para futuras análises estruturais químicas e quantificação pelo método colorimétrico Fenol Sulfúrico (Dubois et al., 1956).

4.7.2.4 *Cromatografia de Camada Delgada (CCD)*

A análise foi realizada seguindo protocolo descrito por Asmer et al. (1988). Uma alíquota de 100 μ L de BS dissolvido em clorofórmio foi diluído em proporção (1:10) e reservado em refrigeração. Para a análise de CCD, duas soluções foram preparadas separadamente, sendo a primeira responsável pela fase móvel do sistema e a segunda utilizada como solução reveladora. Para fase móvel, misturou-se Clorofórmio/Metanol/Água em proporção 65/15/2 (v/v/v). A solução reveladora foi preparada a partir do solvente etanol (EtOH) com 25% (v/v) de ácido sulfúrico anidro (H_2SO_4).

4.7.2.5 *Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG-EM)*

A fração hidrofóbica do BS pode ser identificada a partir de CG, baseado no método descrito por Cavaleiro et al. (2003). Para isso, 30-50 mg de BS foi dissolvido em 2 mL utilizando metanol (MetOH) na presença de 0,1 mol/L HCl e, submetido a hidrólise seguido da metilação da parcela lipídica hidrolisada, formando ésteres metílicos. A reação foi conduzida à 100°C por 40 minutos. Em seguida, a parcela lipídica foi extraída e concentrada com hexano. O extrato lipídico foi por fim injetado em um CG-EM equipado com uma coluna RTX-5 (Restek) de diâmetro 0,25 mm a uma temperatura de injeção de 275°C, temperatura inicial 65°C até que se atingisse 320°C por uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

4.7.2.6 *Cromatografia Líquida de Alta Performance Acoplada em Espectrometria de Massa (CLAP-EM)*

A análise estrutural do BS isolado foi averiguada a partir de cromatografia líquida acoplada em espectrometria de massa. Desta forma, utilizou-se a metodologia descrita por McGenity et al. (2016). Em CLAP com uma coluna C_{18} Gemini (Phenomenex) (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), utilizando um gradiente de solventes de 50% água e 50% acetonitrila, aumentando para 70% acetonitrila após 50 minutos, os BSs foram eluídos e separados a

partir do tempo de eluição de cada homólogo. Em seguida, foram injetados em um espectrômetro Amazon com energia de colisão de íons definida em 35 eV. Os resultados foram analisados a partir das bandas obtidas através do eletrograma de íons e, comparados com valores padronizados respectivos para cada estrutura de SLs encontradas em literatura.

4.7.3 *Gel de Proteínas*

A identificação de proteínas extracelulares foi aferida pelo método de gel de proteínas SDS-PAGE seguindo o protocolo estabelecido por Shapiro et al. (1967)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização e Pré-tratamento de Matéria-Prima

5.1.1 *Material Lignocelulósico*

5.1.1.1 *Caracterização BCA e CA*

Antes e após a etapa de pre-tratamento, a fração total de carboidratos e lignina foi determinada de acordo com o método descrito por Sluiter et al. (2011). Frente a isto, as biomassas de BCA e CA foram caracterizadas, os ensaios foram conduzidos em triplicata e podem ser encontrados na Tabela 6 e Figura 15.

Tabela 6. Composição estrutural química das biomassas lignocelulósicas *in natura* (BCA; CA) e após PTA (BCA_{PTA}; CA_{PTA}). Os valores representados são as médias obtidas e foram denotados em % (m/m) ± δ , onde δ representa o desvio padrão da amostragem.

Biomassa	Lignina	Glucana	Xilana	Arabinosil	Acetil	Extrativos	Cinzas
BCA	22,2±0,5	46,1±0,1	25,5±0,1	2,9±0,1	3,5±0,4	4,11±0,3	0,6±0,04
BCA_{PTA}	8,5±0,05	63,3±0,8	32,0±0,3	3,9±0,04	0,1±0,1	-	-
CA	33,1±1,4	40,5±0,2	16,7±0,1	2,8±0,3	1,5±0,3	3,3±0,4	15,2±0,2
CA_{PTA}	18,0±3,8	55,6±1,9	22,8±0,8	3,9±0,2	0,05±0,1	-	-

A glucana representa a fração homopolimérica composta por monômeros de hexoses, D-glicose, conectados em estrutura linear por ligações glicosídicas do tipo β ,1-4; a xilana representa a fração hemicelulósica, a qual consiste em uma cadeia heteropolimérica ramificada composta por monômeros pentoses, D-xilose, D-arabinose; hexoses, D-glucose,

e outros açúcares em menores quantidades em suas ramificações (e.g. D-galactose, D-manose, L-raminose); os grupos arabinosil e acetil são derivados da própria cadeia ramificada de xilana; extrativos são moléculas menos polares e em menores quantidades, são removidos mediante a aplicação de solventes ou através de pré-tratamentos; por ultimo, as cinzas são compostas, no geral, por resíduos metálicos (Akhtar et al., 2016).

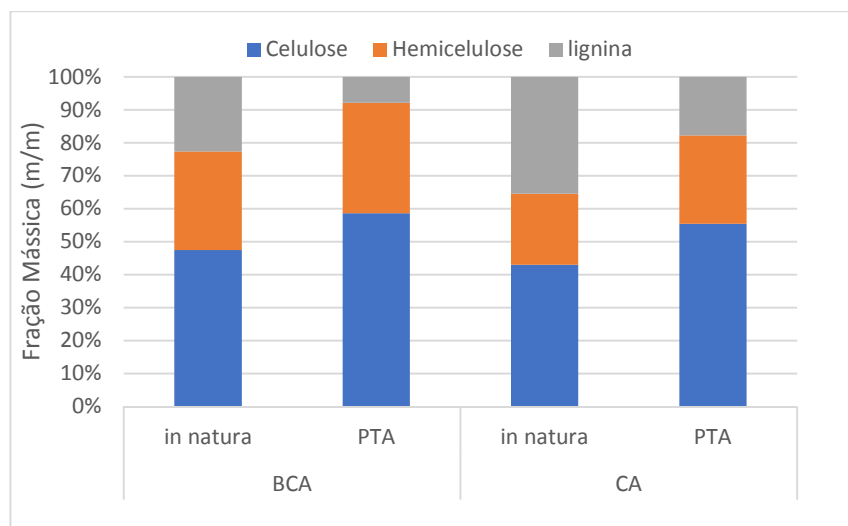


Figura 15. Composição mássica (% m/m) das biomassas BCA e CA antes (*in natura*) e após pré-tratamento alcalino (PTA).

Nota-se que, *in natura* (Figura 15), as proporções de carboidratos e lignina para ambas as biomassas estão dentro das faixas de valores esperados pela literatura (Chandra et al., 2007). Entretanto, é válido ressaltar que, provavelmente, a fração de sílica presente na CA tenha sido contabilizada, redundantemente, nas frações de lignina insolúvel ($31,6 \pm 1,2$ % m/m) e cinzas ($15,2 \pm 0,2$ % m/m), resultando em uma superestimação dos valores obtidos (Della et al., 2006).

À critérios comparativos, diversos autores contabilizaram valores similares para a quantidade de cinzas desde 14 – 20 % (m/m) (Paula et al., 2011; Martínez-Angel et al., 2009). Enquanto para lignina insolúvel, nota-se valores abaixo do obtido neste estudo, variando entre 11 – 23 % (m/m) (Lamb et al., 2018; Vegas et al., 2004); hemicelulose entre 12 – 25 % (m/m) e por fim, celulose entre 32 – 51 % (m/m) (Saha e Cotta, 2008; Reddy e Agrawal, 2012; Karimi et al., 2006; de Oliveira et al., 2017).

Com respeito ao BCA, nota-se que os valores encontrados respectivos à sua composição mássica estão similares com outros estudos apresentados (Oliveira, 2012; Canilha et al., 2007). Em contrapartida, observa-se uma pequena variação na composição de

lignina total, que se apresenta entre 22 – 28 % (m/m). A ocorrência das variações mássicas nas composições de biomassa pode estar relacionada às condições distintas de solo, clima, espécie e/ou linhagem e técnicas de cultivo implementadas para cada cultura (Zeng et al., 2014).

Após o PTA aplicado, aproximadamente 76 % e 63 % de lignina foram removidos de BCA e CA, respectivamente. Em relação às frações celulósicas e hemicelulósicas, apesar que haver um aumento de suas proporções (Tabela 6), ocorreu-se também a remoção das mesmas em ambas as biomassas, porém de maneira menos acentuada.

Isto ocorre devido à capacidade hidrolítica e de deformação da base (NaOH) empregada em conjunto com condições altas de temperatura e pressão, fazendo com que haja a degradação de outros carboidratos que estão intimamente ligados à lignina. Desta forma, é inevitável que nestes processos haja a remoção de compostos de interesse, por exemplo, é esperado que haja a solubilização parcial de hemicelulose durante hidrolises alcalinas, bem como a decristalização de celulose o que pode ocasionar em reduções em sua respectiva composição mássica (Mcintosh e Vancov, 2010). Portanto, é preciso que esta perda seja minimizada e que suas viabilidades permaneçam alta. De fato, apesar das perdas ocorridas, houve um aumento de 37 % no conteúdo de celulose, enquanto um aumento de 12 % e 36 % na fração hemicelulósica foi identificado para BCA e CA, respectivamente.

Outros autores, após uma otimização no processo de PTA, reportaram uma redução de 19 % (m/m) à 12 % (m/m) de lignina, ou seja, uma redução de 37 % da lignina total em CA, acarretando em um aumento no conteúdo total de celulose de 30 % (Nikzad et al., 2015). Além disso, outros estudos realizaram PTA com BCA visando a produção de biossurfactantes pela levedura *Aureobasidium pullulans*. Mediante a adição de 0,18 g NaOH/g biomassa seca, submetendo o material à 121°C, 1 atm durante 60 minutos pode-se observar uma remoção de 75 % no conteúdo total de lignina (Carneiro, 2019). Diante disso, é possível aferir que as condições de PTA aplicadas neste estudo foram adequadas e podem ser implementadas em uma maior escala.

5.1.2 Material Lipídico

5.1.2.1 Caracterização dos Substratos Lipofílicos

Os perfis de ácidos graxos de cada óleo utilizado neste estudo foi identificado através de cromatografia gasosa acoplado a um detector de massas (CG-EM) e, os mesmos podem

ser encontrados na Tabela 7. Além disso, como há até determinada extensão, uma propensão de óleos residuais apresentarem índice de peróxidos elevado, determinou-se o mesmo e o comparou com um índice de um óleo comercial, que neste caso foi utilizado óleo de soja como padrão.

Nota-se a partir dos dados obtidos pelo CG-EM que os óleos diferem minimamente entre si tanto em composição quanto em proporção mássica em relação as estruturas dos ácidos graxos contidos em suas formulações naturais, salvo a composição de OS e AO que apresentaram alguns ácidos graxos distintos como por exemplo o ácido heptadecanóico (C17:4) no caso de OS e, o ácido esqualeno (C30:6) no caso de AO. Afora, os ácidos hexadecanóico e octadecanóico em diferentes graus de insaturação foram unânimes em todos eles. Outros compostos também foram identificados em todos os óleos, porém, em uma proporção baixa e, desta forma, negligenciou-se suas influências perante a composição final. Já os índices de peróxidos apresentaram uma pequena diferente entre si, enquanto OCR apresentou maior índice por volta de 21,4 meq/Kg, o que era esperado devido à sua origem residual, OS apresentou um índice de 15,4 meq/Kg.

Tabela 7. Perfil de ácidos graxos dos respectivos óleos utilizados como fontes de carbono lipofílico no cultivo da levedura *S. bombicola* Y-6419 para a produção de biossurfactantes.

Óleos	Composição	Proporção Mássica (% m/m)	Índice de Peróxidos (meq/Kg)
OCR	C16:0; C18:2; C18:1; C18:0	9; 52; 33; 4	21,4
Óleo de Girassol (OG)	C16:0; C18:2; C18:1; C18:0	4; 56; 33; 2	-
Óleo de Soja (OS)	C16:0; C18:2; C17:4; C18:1; C18:0	9; 55; 10; 23; 3	15,4
Azeite de Oliva (AO)	C16:0; C18:2; C18:1; C30:6	12; 11; 58; 10	-

5.2 Biosurfactante: Produção, Caracterização e Análises Físico-químicas

5.2.1 *Screening de linhagens de S. bombicola produtoras de BSs*

Óleos de cozinha residuais são fontes complexas que podem dificultar a capacidade dos microrganismos de desempenharem seu metabolismo de forma mais adequada. Em outras palavras, nem sempre as enzimas constituintes em seu código genético possibilitam a especificidade necessária para decompor tais fontes de carbono e sintetizar moléculas de interesse. Óleos residuais possuem moléculas de ácido graxo de cadeias menores que são geradas a partir do processo de cozimento, além disso, grandes quantidades de moléculas oxidantes como peróxido de hidrogênio também são formadas durante este processo. Na literatura são encontrados trabalhos que mostram a especificidade enzimática de cada etapa no processo de produção de surfactantes pela levedura, como relatado anteriormente. Frente a isto, nota-se uma alta seletividade para ácidos graxos de cadeia carbônica entre 16 – 18 carbonos.

Portanto, apesar da levedura *S. bombicola* apresentar alta capacidade de assimilação de fontes hidrofóbicas de carbono, é preciso considerar estes fatores apresentados para que se obtenha melhor eficiência durante o processo fermentativo. Em busca da linhagem mais adaptada, foi realizado a seleção entre 6 cepas distintas de *S. bombicola*, buscando quantificar o BS produzido ao final da fermentação, bem como analisar o comportamento do meio fermentado frente aos testes de redução de tensão superficial e índice de emulsificação (E_{24}).

Observa-se a partir da Figura 16A que a redução da tensão superficial variou na faixa de 36 – 41 mN/m a respeito das linhagens utilizadas. Amostras foram coletadas periodicamente para a medição, sendo que após as primeiras 48 horas de cultivo, todas as cepas já apresentavam reduções superficiais máximas, indicando que a concentração de BS se encontrava acima de sua CMC. Dentre as que apresentaram maiores reduções da tensão superficial, destacaram-se as cepas Y-6419 e Y-6663 com tensões de 36,9 e 36,2 mN/m, respectivamente. Com respeito aos valores encontrados, é válido mencionar que estão de acordo com a redução superficial máxima causada por SLs em solução aquosa, a qual se apresenta entre 30 – 40 mN/m (Hirata et al., 2009) e se mantém estável em diversas concentrações salinas, até mesmo em uma faixa ampla de temperatura (Nguyen et al., 2010). Essas reduções superficiais são ainda comparáveis à surfactantes sintéticos como Tween 20 e Tween 80, os quais permitem uma redução de até aproximadamente 40 mN/m.

Os dados obtidos foram reafirmados através dos índices de emulsificação (E_{24}) realizados utilizando óleo de girassol e querosene como fase hidrofóbica. Neste ensaio, o meio fermentado livre de células foi misturado em mesma proporção volumétrica (1:1) com um substrato hidrofóbico, agitado vigorosamente e após 24 horas a camada emulsificada foi medida. Os resultados mostraram que apenas os ensaios com óleo de girassol surtiram efeitos mensuráveis, uma vez que querosene se mostrou muito apolar. Assim, emulsificações entre 30 – 35 % foram encontradas misturando-se óleo de girassol e meio fermentado. Apesar dos baixos valores obtidos, é válido ressaltar que ainda houve parcialmente a emulsificação do meio. Diferentemente dos ensaios de tenso-atividade, as cepas que apresentaram maiores índices de emulsificação foram Y-6663 e Y-5458 com 35 % e 34 %, respectivamente.

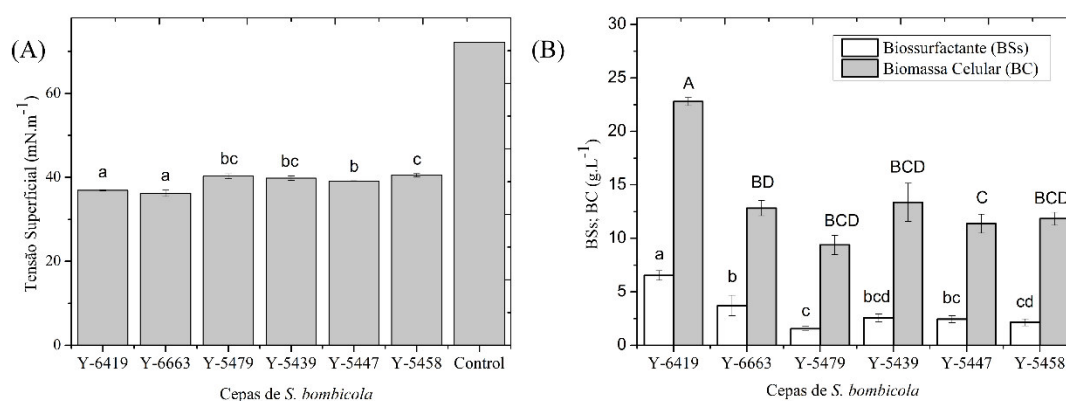


Figura 16. Seleção da cepa de *S. bombicola* por meio de análise da redução da tensão superficial (A) e ensaios fermentativos utilizando OCR como fonte hidrofóbica de carbono (B). Análise Tukey de significância ($p < 0,05$) está representada pelas letras indicadas acima das barras.

À critérios comparativos, é possível afirmar que há poucos trabalhos envolvendo *S. bombicola* e produção de SLs nos quais índices de emulsificação são realizados. Alguns estudos realizaram atividade de emulsão obtendo resultados satisfatórios quanto a identificação do potencial biorremediador dos SLs em áreas poluídas com compostos lipofílicos (Ma et al., 2012). No entanto, neste estudo, embora o baixo potencial emulsificante, os BSs apresentaram alta propriedade tenso-ativa o que os tornam viáveis para uma série de aplicações, como cosméticos, farmacêutica, agricultura e entre outras.

Ao final de 7 dias de fermentação, o caldo fermentado contendo células foi submetido ao processo de separação e purificação do BS de interesse a partir de solventes orgânicos. Nesta etapa os BSs obtidos são separados do meio aquoso devido à sua afinidade

por fases de polaridade intermediária, havendo, portanto, a migração para dos BSs para a fase orgânica de acetato de etila. Óleo residual não consumido do meio de cultivo é parcialmente arrastado junto na fase orgânica, frente a isto, uma segunda etapa de semi-purificação é exigida para que o excesso de óleo seja removido e a quantidade de BS produzido não seja superestimada. Feito isso, biomassa celular seca e quantidade final de BS para todas as linhagens podem ser encontradas na Figura 16B.

Nota-se que em relação à biomassa seca, a cepa Y-6419 apresentou, consideravelmente, maior biomassa celular com respeito as outras cepas, atingindo concentração de $22,78 \pm 0,31$ g/L, enquanto que o segundo maior crescimento celular foi atingido pela cepa Y-6663 com concentração de $12,83 \pm 0,58$ g/L (Fig. 13B). Analogamente, Y-6419 apresentou maior produção de BS com $6,64 \pm 0,41$ g/L seguida da Y-6663 com produção de $3,71 \pm 0,79$ g/L. As cepas Y-5439, Y-5447 e Y-5458 apresentaram produções similares por volta de 2 g/L, enquanto Y-5479 obteve a menor produção com $1,54 \pm 0,17$ g/L (Fig. 13B). Aplicando teste de Tukey ($p < 0,05$) para avaliar a significância da diferença dos resultados, notou-se, de fato, que a cepa Y-6419 apresentou diferença significativa na produção de biossurfactantes e crescimento celular em relação as outras cepas examinadas (Fig. 13B).

Complementar a estes resultados, notou-se uma diminuição considerável do pH para todas as linhagens, sendo que o pH inicial se encontrava em torno de 5,6 enquanto ao final da fermentação aproximou-se de valores altamente ácidos como 1,8. A diminuição do pH pode estar relacionada com uma série de fatores envolvendo o metabolismo microbiano, inclusive a excreção de ácidos orgânicos voláteis como produtos de fermentação. Entretanto, outros autores também revelaram uma diminuição brusca de pH em processos fermentativos utilizando diferentes linhagens de *S. bombicola*. De fato, Kurtzman et al. (2010) em um estudo avaliativo de produção de SLs com espécies de mesma origem filogenética de *Starmerella*, foi constatado uma queda do pH de 4,5 para 1,8 durante a fermentação. Frente a isto, presume-se que a queda do pH seja, possivelmente, uma consequência do metabolismo conservado de SLs entre as espécies de *Starmerella*.

A queda do pH também pode estar relacionada com a própria resposta do microrganismo frente a um pH inicial fora de sua faixa ótima. A medida com que a fermentação avança o pH tende a continuar decrescendo (Roelants et al., 2016). Isto pode afetar negativamente a atividade metabólica da produção de SLs, em outras palavras, desviando a faixa de pH ótima para o funcionamento do complexo enzimático responsável pela síntese de SLs. Neste contexto, Gobbert et al. (1984) realizaram um dos primeiros

estudos sobre ajuste de pH para melhorar a produção de SLs pela *S. bombicola* e, de fato, notou-se que o constante ajuste de pH para 3,5 induziu a continua síntese de SLs durante o período de fermentação.

A confirmação da produção de SLs pelas linhagens de *S. bombicola* foi, preliminarmente, realizada a partir de análises por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando o padrão de SL-Lactônico di-acetilado (Sigma-Aldrich). Os resultados podem ser vistos na Figura 17. Frente a isto, pode ser observado que, de fato, as leveduras produziram SL-Lactônico di-acetilado durante a fermentação o que foi confirmado pela marcação superior ($R_f = 0,66$), além disso, é possível notar que outros homólogos também foram sintetizados concomitantemente, um exemplo disso é a aparição de marcações nas alturas R_f 0,55 e R_f 0,47, as quais também estão de acordo com as obtidas a partir do padrão SL-Lactônico. É esperado que isso ocorra devido a heterogeneidade da fonte hidrofóbica utilizada. Neste sentido, outros autores também avaliaram a produção de SL por CCD e encontraram resultados similares aos obtidos neste estudo.

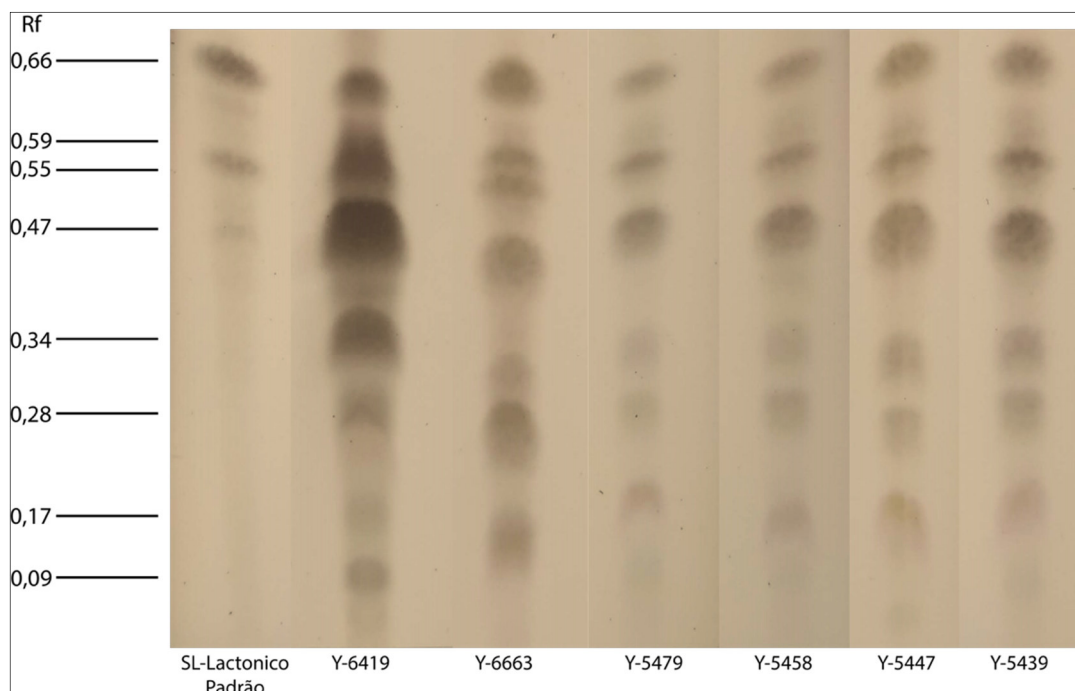


Figura 17. Cromatografia de camada delgada dos diferentes SLs obtidos em ensaio fermentativo pelas linhagens de *S. bombicola*. Padrão utilizado de SL-Lactônico di-acetilado.

Asmer et al. (1988) identificaram, por CCD, os SLs produzidos pela levedura *S. bombicola* a partir de diferentes combinações de fontes de carbono e constatou semelhantes valores de R_f para os diferentes homólogos, inclusive SL-Lactônico, o qual foi identificado

na altura Rf 0,60, além disso, outras configurações de SL-Lactônicos foram identificados entre os valores de Rf 0,27 – 0,47. Ainda neste trabalho, de acordo com os autores, as marcações menos apolares, obtidas em alturas menores, estão relacionados com a produção de SL-acídicos (SLA) entre os valores de Rf 0,08 – 0,13. Portanto, ao comparar os resultados posteriores de Asmer et al. (1988) com respeito a este estudo, nota-se que há potenciais similaridades entre as análises de CCD.

De fato, o padrão de SL-Lactônico di-acetilado utilizado como referencia comparativa demonstrou marcações entre os valores Rf 0,47 – 0,66, o que mostra as características posições de estruturas lactônicas, em acréscimo, é possível observar as marcações mais baixas (Rf 0,09 – 0,17) respectivas de configurações mais polares endereçadas às configurações acídicas. Os valores Rf 0,34, Rf 0,28 podem estar relacionados com SL-Lactônicos não acetilados e com ligações éster em diferentes posições (Asmer et al., 1988). Por fim, nota-se que a cepa Y-6419 possui marcações mais fortes e demarcadas, indicio que revela a maior concentração de SLs como mostrado anteriormente. Diante disto, é importante mencionar que os ensaios realizados nesta etapa condizem com as marcações de SL obtidas através da CCD utilizando SL comercial como padrão.

Em contrapartida, Wadekar et al. (2012) também realizaram CCD para análise de SLs a partir de fermentações submersas utilizando óleo de cozinha residual como fonte hidrofóbica de carbono e obteve diferentes alturas para SL-Lactônico (Rf = 0,48). Enquanto SL-acídicos foram obtidos entre Rf 0,03 – 0,17. Estas discrepâncias são esperadas devido as diferenças nas técnicas analíticas de cada ensaio, por exemplo, mudança das concentrações da fase móvel utilizada na CCD, bem como também diferenças no padrão de SL de referência. Ao comparar os SLs obtidos por Wadekar et al. (2012) com respeito aos encontrados neste trabalho, nota-se uma grande diferença dos homólogos predominantes, os quais neste estudo foram majoritariamente lactônicos enquanto para os outros autores maior predominância de SL-acídico foi observada. Uma das possíveis causas para essas divergências pode estar relacionada a heterogeneidade dos substratos utilizados. É importante mencionar que neste trabalho, a confirmação estrutural dos SLs foi realizada a partir de CLAP.

Evidentemente, CCD se demonstra útil para análises preliminares se baseando em trabalhos anteriores e obtendo evidências que podem guiar a continuidade dos experimentos. No entanto, caracterizações mais precisas e sensíveis como espectrometria de massa ou CG sejam necessárias para se afirmar, confidentemente, quais as estruturas e tipos de SLs produzidos. Por fim, a cepa codificada por Y-6419, neste caso, foi escolhida para suceder

como a levedura que foi conduzida pelo resto deste trabalho devido ao seu melhor potencial em tolerar fontes heterogêneas de carbono hidrofóbico e sintetizar SLs a partir do mesmo.

5.2.2 *Avaliação da produção de BSs utilizando a combinação de EFA e OCR*

Após a seleção da linhagem mais adaptada, objetivou-se aumentar a produção de soforolipídeos (SLs) por meio da suplementação do meio de cultivo com uma fonte complexa de nutrientes, minerais e principalmente uma fonte alternativa de nitrogênio (e.g. proteínas e aminoácidos) devido ao alto custo do extrato de levedura até então utilizado como única fonte nitrogenada. Neste sentido, visando compelir uma maior utilização de subprodutos agroindustriais, o farelo de arroz foi escolhido como uma alternativa ecológica e não competitiva com a indústria alimentícia.

Assim, com o intuito de avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com o extrato aquoso de farelo de arroz (EFA) na produção de SLs e no metabolismo da levedura *S. bombicola* Y-6419, foi implementado um desenho experimental do tipo 2² fatorial. As variáveis manipuladas foram OCR (g/L) e EFA (% v/v), sendo que a produção de SLs (g/L) foi utilizada como variável resposta do desenho experimental conforme descrito na Tabela 8. Foi escolhido a concentração de OCR como segunda variável manipulada devido sua alta influência na produção de SLs como fonte de carbono hidrofóbico.

Em relação aos resultados, observou-se que a maior produção de SLs foi obtida a partir do ensaio 3, cujo efeito da combinação das variáveis manipuladas OCR a uma concentração de 32 g/L e EFA em 50% (v/v) resultou em 30,8 g/L de SLs ao final da fermentação (Tabela 8). Acerca dos outros ensaios, verifica-se, notavelmente, uma diminuição da síntese de SLs nos ensaios que não foram suplementados com EFA, por exemplo, nos ensaios 1 e 2 onde a concentração volumétrica de EFA é nula, encontra-se uma produção de 12,7 e 12 g/L de SLs, respectivamente, fato o qual infere uma alta influência do mesmo perante a produção de biossurfactantes. De fato, a Tabela 9 corrobora essas observações realizadas demonstrando que por meio de uma análise de variância (ANOVA) a variável EFA apresentou um valor p de 0,0077 ($p < 0,05$), indicando sua alta influência perante a variável resposta (SLs – g/L) analisada.

Analisando os ensaios 3 e 4 e comparando-os (Tabela 8) foi demonstrado que a concentração de OCR na faixa analisada de 32 a 100 g/L não interferiu na produção de SLs uma vez que não houve aumento significativo da concentração final do bioproduto. Nesta instância, é válido mencionar que caso esses resultados fossem interpretados apenas

numericamente, seria conclusivo atestar que não há necessidade da utilização de fontes de carbono hidrofóbica para a produção de biossurfactantes pela levedura *S. bombicola*. No entanto, conforme testes preliminares conduzidos por outros autores e o pelo laboratório de bioprocessos e produtos sustentáveis (LBIOs), onde este trabalho foi desenvolvido, é possível afirmar que a fonte hidrofóbica se mostra como um indutor e precursor de SLs e que sua ausência interfere de maneira negativa o metabolismo de SLs (de Graeve et al., 2018).

Ainda assim, no que diz respeito a concordância e factilidade dos resultados, também foi possível corroborar essas observações por meio da análise ANOVA que apontou um valor p de 0,281 ($p > 0,05$) para a variável OCR, indicando sua baixa influência no modelo experimental adquirido. Sobre este, a designação de um modelo quadrático expressado pela Equação (7), a qual representa quantitativamente a influência individual e também a interação quadrática entre as variáveis manipuladas (OCR, EFA), apresentou um valor p de 0,0224 ($p < 0,05$) e um R^2 de 0,985, indicando a significância dos testes realizados perante a produção de SLs e, também, da utilização de resíduos agroindustriais como fontes de substrato para a produção em biorrefinarias de biomoléculas de alto valor agregado como os biossurfactantes. O modelo foi confirmado conduzindo triplicatas de ensaios fermentativos independentes do desenho experimental, as quais resultaram em uma média de produção de SLs de 38 g/L. Desta forma, o modelo pode ser utilizado para estimar e predizer os valores de SLs na região parametrizada.

$$SL(EFA, OCR) = 0.39 \cdot EFA - 0.01 \cdot OCR - 8.44 \cdot 10^{-4} \cdot (OCR \cdot EFA) + 13.10 \quad Eq.(7)$$

Tabela 8. Planejamento experimental referente ao estudo da suplementação do meio de cultivo de *S. bombicola* Y-6419 com extrato de farelo de arroz (EFA) e óleo de cozinha residual (OCR) e seus respectivos resultados em relação à produção de SLs.

Ensaio	OCR (g/L)	EFA (% v/v)	SL (g/L)
1	32	0	12,76
2	100	0	12,04
3	32	50	30,89
4	100	50	27,3
5 (C)	66	25	27,39
6 (C)	66	25	26,85
7 (C)	66	25	24,61

Tabela 9. Resultados da análise ANOVA a respeito dos resultados obtidos a partir do planejamento experimental factorial 2² implementado na produção de SLs pela levedura *S. bombicola* Y-6419.

Fonte	Soma dos quadrados	Diferença	Média Quadrática	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	285,4263	3	95,14209	43,78509	0.0224
A-OCR	4,644025	1	4,644025	2,137215	0.2813
B-EFA	278,723	1	278,723	128,2704	0.0077
AB	2,059225	1	2,059225	0,947671	0.4330
Curvatura	52,53506	1	52,53506	24,17702	0.0390
Erro	4,345867	2	2,172933		
Total	342,3072	6			
R ²	0,985				

Dos motivos para que o extrato de farelo de arroz (EFA) tenha desempenhado um papel de suma importância na produção de SLs, destaca-se o potencial de biomassas vegetais, como por exemplo os farelos, em prover diversas moléculas de alto valor nutricional e biológico para o metabolismo de microrganismos. Esses subprodutos agroindustriais apresentam em sua composição química moléculas como cofatores enzimáticos, aminoácidos, lipídeos, proteínas, carboidratos, compostos fenólicos e outros micronutrientes que induzem e regulam a produção e excreção de bioprodutos, especificamente, neste caso, os SLs. Estudos apontam, sobretudo, a capacidade antioxidante e captura de radicais livres dos compostos fenólicos presentes no farelo de arroz (Moongngarm et al., 2012).

A fim de entender em mais detalhes o potencial do EFA obtido neste estudo, quantificou-se alguns compostos químicos presentes no extrato. Dentre eles, foi possível obter um total de 34 g/L, 7,8 g/L, 0,1 g/L, 0,6 g/L e 0,5 g/L de carboidratos totais, proteínas, aminoácidos e compostos fenólicos, respectivamente. Juntamente, avaliou-se também a quantidade de proteínas totais presente no meio de cultivo após o final da fermentação. Desta forma, notou-se que a concentração de proteínas se manteve a mesma, sendo esta 3,2 g/L devido a diluição 1:2 realizada na composição do meio de cultivo. Evidentemente, essa quantificação de proteínas não discrimina os tipos de proteínas e tampouco as identifica, porém, hipotetiza-se que parte dessas proteínas tenha sido consumida e outra parte foi excretada pela própria levedura, resultando desta forma, em concentrações similares aos valores obtidos inicialmente.

Todavia, a quantidade de aminoácidos no meio foi totalmente consumida pela levedura durante a fermentação. Em resposta, a quantidade de SLs excretado foi aumentado

em até 6 vezes em relação aos ensaios conduzidos com meio de cultivo definido (6,5 g/L de SLs). Além disso, a relação C/N variou entre 34 e 600, e nesta mesma faixa, no limite inferior, foi obtido o melhor resultado referente ao ensaio 2 (30,8 g/L de SLs).

À critérios comparativos, diversos trabalhos e estudos já foram realizados com a utilização subprodutos e resíduos agroindustriais, visando a produção de biossurfactantes. Por exemplo, Almeida et al. (2017) estudaram a influência do licor de milho, óleo de cozinha residual e melaço de cana-de-açúcar na produção de biossurfactantes pela levedura *Candida tropicalis*. Diante disso, foi encontrado uma correlação positiva entre a suplementação do meio de cultivo com o licor de milho como fonte alternativa e sustentável de nitrogênio e a produção de biossurfactantes. Wadekar et al. (2012) também empregaram óleo de cozinha residual na produção de SLs pela levedura *S. bombicola* e, após a otimização dos parâmetros de cultivo foi obtido uma concentração final de SLs de 35 g/L. Também utilizando óleo de cozinha residual e a levedura *S. bombicola*, Maddikeri et al. (2015) obtiveram uma concentração final de SLs de 21,5 g/L sem otimização.

Sobre a utilização de substratos provenientes de biomassas vegetal, salienta-se a importância da formulação de meios de cultivo compostos por mais de uma fonte alternativa de nutrientes e que possivelmente, a combinação de fontes complexas de carbono e nitrogênio possui um papel proeminente na produção de SLs pela levedura *S. bombicola* Y-6419. Neste sentido, Samad et al. (2017) combinaram o hidrolisado de bagaço de sorgo e sabugo de milho com gordura residual visando a produção de SLs, a qual após otimização rendeu os melhores resultados a partir da combinação entre hidrolisado de sorgo e gordura residual obtendo uma concentração final de SLs de 52 g/L. Outro trabalho com o qual é possível corroborar a utilização de biomassas vegetais como bioestimulantes na produção de SLs pode ser encontrado no estudo de Imura et al. (2013). Neste estudo, a utilização de farelos de arroz e trigo combinados com óleo de jatrofa renderam maiores produções de SLs pela levedura *S. bombicola* NBRC 10243 quando comparados com meios formulados unicamente com extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Na realidade, esta tese em questão demonstrou que o uso de EFA foi responsável em favorecer o fluxo metabólico da levedura *S. bombicola* Y-6419 e propiciar a síntese SLs. A via metabólica de SLs é fortemente modulada pela via do ácido cítrico, onde Acetil-CoA além de se mostrar precursor dos intermediários do ciclo de Krebs, também desempenha papel como precursor dos SLs (Yang et al., 2019). Ao passo que o ciclo de Krebs é intensificado, parte do ácido cítrico é consumido pelas células durante a respiração celular, enquanto uma parte é transportada ao citoplasma onde, por meio da enzima citrato liase,

pode ser tanto clivado à oxaloacetato e Acetil-CoA, favorecendo a produção de SLs ou excretado extracelularmente (Albrecht et al., 1996). Isto, de fato foi confirmado por Yang et al. (2019), que suplementaram o cultivo de *S. bombicola* com ácido cítrico e foi verificado através de ensaios metabolômicos um aumento na produção de SLs bem como também um aumento no fluxo metabólico da via do ácido cítrico. Neste contexto, a suplementação do meio de cultivo com aminoácidos de biomassas vegetais complexas pode ter favorecido a produção de SLs uma vez que estes mesmos aminoácidos entram na via do ácido cítrico como precursores de reações anapleróticas sendo convertidos à ácido cítrico eventualmente (Bowtell e Bruce, 2002).

5.2.2.1 *Superfície de Resposta da Produção de SLs em Relação aos Parâmetros estudados*

O modelo matemático, obtido no tópico anterior, do comportamento da produção de SLs em relação a suplementação do meio de cultivo de *S. bombicola* Y-6419 com EFA e OCR foi representado por uma superfície de resposta parametrizada e contida na Figura 18.

Suas coordenadas (Fig. 18) contêm as variações de ambas as variáveis manipuladas (EFA, OCR) e suas respectivas respostas na produção de SLs. Acerca da superfície de resposta, observa-se de fato, que ao aumentar a concentração de EFA, aumenta-se proporcionalmente a produção de SLs, o que está de acordo com a análise ANOVA. Enquanto que o aumento da concentração de OCR não surtiu um efeito proeminente. Nota-se, desta forma, que variações no eixo OCR resultou em alterações negligenciáveis na concentração de SLs. Visualmente, isso é observado pela não alteração da cor de intensidade, sendo que as cores quentes representam maiores concentrações, enquanto cores frias, concentrações baixas.

Ressalta-se, no entanto, as regiões 1 (50% EFA; 32 g/L OCR) e 2 (50% EFA; 100 g/L) circunscritas na superfície de resposta, comportamentos intrigantes, que delas são provenientes, em relação ao estado físico-químico dos SLs obtidos nessas condições. Referindo-se a região 1, após a centrifugação do meio fermentado, foi observado a decantação dos SLs encontrado em uma camada amarronzada sedimentada ao fundo do recipiente. Em contrapartida, na região2, os SLs foram encontrados com colaração mais alaranjada e em uma camada superficial do líquido fermentado, após sua centrifugação.

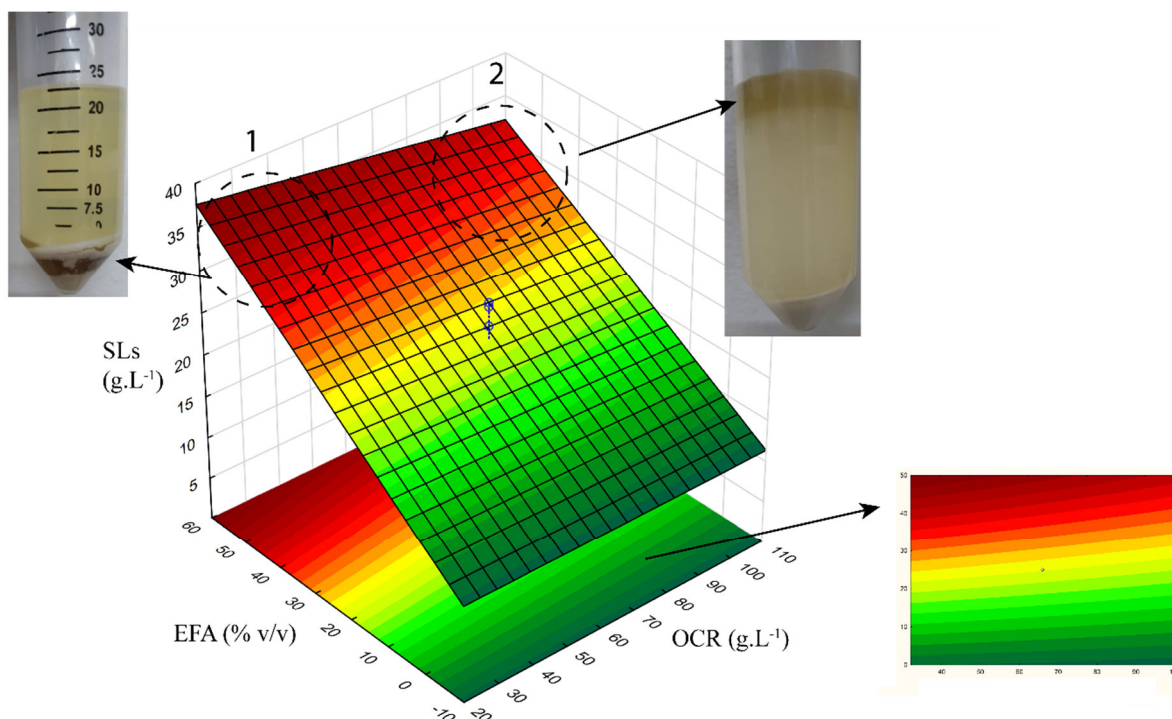


Figura 18. Superfície de resposta parametrizada de acordo com os dados empíricos obtidos da produção de SLs em relação à variação das concentrações de EFA (% v/v) e OCR (g/L). Na superfície encontra-se uma região onde pode-se obter SLs de maior densidade em relação ao meio (1) e outra região onde houve a produção de SLs de menor densidade (2).

Diante disso, foi hipotetizado que no primeiro caso (região 1) os SLs sintetizados apresentaram propriedades físico-químicas distintas da região 2, como uma maior densidade em relação ao meio fermentado e interações intermoleculares mais fortes, das quais propiciaram uma maior agregação das moléculas e por fim, a sedimentação das mesmas. Subsequentemente, ao se analisar o segundo caso (região 2), a mistura de SLs apresentou menor densidade em relação ao meio de cultivo e, possivelmente, uma maior afinidade ao OCR restante ao final da fermentação, o que levou as moléculas do biossurfactante a se aderirem à interface água/óleo.

Em um contexto de biorrefinaria, a possibilidade de se obter duas formas distintas de SLs é, de certa forma, vantajado devido à versatilidade do processo, da qual lhe confere flexibilidade nas operações e, portanto, também ao produto desejado. Existem alguns trabalhos que empregaram estratégias de separação *in situ* dos SLs e, de suas conclusões majoritárias, apontou-se que o tipo de técnica utilizada ou método de operação é governado pelo estado físico de agregação das moléculas de SLs. Por exemplo, Zhang et al. (2018) conduziram seus experimentos por meio da implementação de separação física que consistiu

em coletar o caldo fermentado e submetê-lo a duas unidades de separação em série, adquirindo ao final, uma pureza de SLs de aproximadamente 74%. Neste mesmo sistema, o óleo de soja remanescente é recirculado aos tanques de separação a fim de se adequar as condições físico-químicas do meio, provocando a precipitação dos SLs. Comparativamente, Liu et al. (2019) desenvolveram uma unidade de separação eficiente, similar ao trabalho previamente mencionado, entretanto, os SLs obtidos neste caso foram de menor densidade o que levou ao desenho conceitual de uma operação de configuração distinta. De fato, os SLs eram coletados pela corrente superior do reator e conduzidos à unidade de separação enquanto o caldo fermentado foi recirculado ao fermentador pela corrente inferior.

Embora ambos os autores mencionados tenham conduzido fermentações em batelada alimentado, Liu et al. (2019) suplementaram seu meio de cultivo com fonte hidrofóbica de carbono, sendo óleo de colza e, intermitentemente, com glicose, de forma que fosse mantida uma concentração residual de 1 – 5 g/L e 20 – 60 g/L, respectivamente. Acerca disso, é válido apontar que a correlação carbono hidrofílico/lipofílico (CH/CL) atinge um valor de aproximadamente 20, o qual traduz-se em uma produção de uma mistura de SLs de baixa densidade. Por outro lado, Zhang et al. (2018) alimentaram o bioreactor com ambas fontes de carbono (ácido oleico e glicose) continuamente a fim de se assegurar uma correlação CH/CL entre 1 – 1,5 durante a fermentação e, supostamente, devido a este fato foi obtido uma mistura de SLs de alta densidade. Neste sentido, elucida-se que a correlação CH/CL dos trabalhos analisados são evidentemente distinguíveis, o que pode ter impactado o estado físico de agregação final dos SLs.

A fim de desvelar os mecanismos implícitos neste fenômeno, estudos conduzidos por Dolman et al. (2017) endereçaram este problema à concentração de glicose no meio de cultivo. Enquanto concentrações acima de 50 g/L levou ao aumento da densidade do meio e também à obtenção de SLs separados na camada superior do meio, ensaios que a concentração de glicose foi mantida abaixo de 50 g/L levou a precipitação dos SLs no fundo do recipiente. No entanto, é, de fato, incerto que isto seja o único motivo, ou força motriz, que implicara na precipitação ou floculação dos SLs e de seu estado físico. Na realidade, nesta tese atual, em ambas as regiões localizadas (Fig. 18) a correlação CH/CL de valor entre 1 a 3 foi mantida apenas no princípio do processo fermentativo e, ainda assim, dois comportamentos diferentes foram obtidos. Portanto, ainda há outros mecanismos, tanto bioquímicos quanto físicos que devem ser elucidados para que haja uma maior assertividade acerca de como se pode controlar de fato o tipo de SL secretado pela levedura.

5.2.3 Utilização de diferentes fontes hidrofóbicas como substrato para a produção de BSs

A influencia de diferentes substratos lipofílicos como fonte de carbono no crescimento celular e produção de SLs pela levedura *S. bombicola* Y-6419 foi estudada por meio de ensaios fermentativos utilizando as condições de meio de cultivo otimizadas e composta por EFA (50% m/m). Os óleos utilizados para realizar os experimentos foram óleo de girassol (OG), óleo de soja (OS), azeite de oliva (AO) e como ferramenta comparativa foi utilizado também OCR, mantendo sempre a concentração otimizada (32 g/L). Os resultados podem ser encontrados na Figura 19.

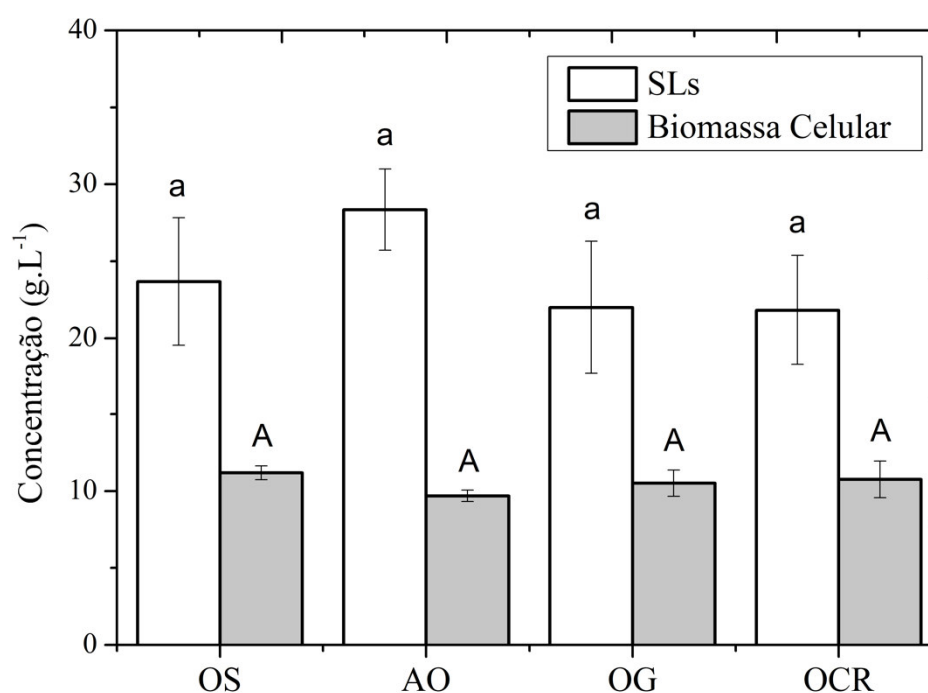


Figura 19. Resultados obtidos a partir da fermentação da levedura *S. bombicola* Y-6419 para a produção de SLs utilizando diferentes fontes de carbono lipofílico.

Acerca, as análises Tukey ($p < 0,05$) mostraram que não houve diferença significativa entre os óleos utilizados na produção tanto de biomassa celular quanto na produção de SLs. Afora, a máxima produção de biomassa celular obtida foi de 12 g/L após um período de incubação de 168 horas. Outro estudo apontou uma produção máxima de biomassa celular de 3,9 g/L utilizando OS como fonte de carbono lipofílica (Ribeiro et al., 2013). Seguindo o mesmo racional, Ogawa e Ota (2000) avaliaram a utilização de OS e AO em uma concentração de 10,5 % (v/v) no crescimento celular, apresentando resultados similares entre os óleos e obtendo uma concentração de 25 g/L após um período de 192

horas. À critérios comparativos, nota-se que diferentes concentrações de biomassa celular foram obtidas em ambos os trabalhos avaliados, inclusive perante à presente tese em questão. Presume-se que isto se deve ao fato dos diferentes perfis de ácidos graxos, bem como também, as linhagens de leveduras utilizadas nos trabalhos comparados.

Analogamente, a produção de SLs pela levedura também não foi influenciada pela utilização dos diferentes óleos, e com isso, atingindo a maior concentração em torno de 30 g/L o que está de acordo com o desenho experimental realizado no tópico 5.2.2. Nesta mesma linha, Shah et al. (2007) avaliaram a produção de SLs a partir da suplementação do meio de cultivo com OCR em concentração de 40 g/L. Os resultados mostraram uma produção de 30 g/L de SLs após um período de incubação de 240 horas.

É evidente notar potencial industrial da levedura nativa brasileira utilizada neste atual trabalho (*S. bombicola* Y-6419) uma vez que apresentou atividades metabólicas semelhantes independente do óleo suplementado em seu meio de cultivo. Diversos trabalhos nos quais foi avaliado diferentes substratos lipofílicos para a produção de SLs pela levedura *S. bombicola*, em sua vasta maioria, indicaram diferenças significativas na concentração final de SLs, de modo que demonstraram a dependência e preferência enzimática do metabolismo da levedura perante ao tipo de óleo suplementado nos meios de cultivo (de Graeve et al., 2018).

Por exemplo, Van Bogaert et al. (2010) avaliaram o efeito de diferentes ácidos graxos na atividade enzimática do grupo de enzimas responsáveis pelas etapas do metabolismo de soforolipídeos. Neste mesmo estudo, os autores encontraram que a levedura possuía preferência na assimilação de ácidos graxos de cadeia carbônica entre C16 – C18 carbonos, aferindo que nesta faixa a produção *de novo* de SLs é conservada. Por outro lado, ácidos graxos de cadeia média como os C12 afetaram negativamente o metabolismo da linhagem de *S. bombicola* utilizada e, a respeito disso, foi hipotetizado que pela falta de transportadores específicos de membrana celular, esses ácidos se acumularam na superfície celular causando mudanças no balanço iônico, permeabilidade e fluidez de membrana.

Como estimativa de iniciar uma breve avaliação e evidenciar se houve de fato mudanças metabólicas adversas no funcionamento de transporte e excreção de enzimas pela levedura *S. bombicola* Y-6419 foi realizado um gel de proteínas, ilustrado pela Figura 20, no qual foi possível avaliar as bandas de proteínas excretadas durante o processo fermentativo da produção de SLs.

Acerca do gel, é notório a presença de proteínas ou enzimas de mesmo peso molecular para os meios compostos pelos óleos OG, OCR, OS e AO, mais especificamente

entre as faixas de peso de 45 kDa a 66 kDa, onde possivelmente representam marcações provenientes do próprio metabolismo microbiano devido à ausência destas marcações nas bandas identificadas do EFA. Além disso, também há marcações em peso molecular maior que 97 kDa, podendo também representar uma banda proveniente da excreção de proteínas da levedura.

No entanto, este ensaio apesar de visual, se apresenta como resultados especulativos e qualitativos, necessitando, ademais, futuros sequenciamentos proteômicos que possam confirmar as estruturas das proteínas e examinar possíveis e minuciosas diferenças, se houver, entre as proteínas identificadas. Apesar disso, a presença de bandas de mesmo peso molecular, em certa perspectiva metabólica, podem representar proteínas multifuncionais uma vez que os diferentes óleos possuem perfis de ácidos graxos distintos, fato o qual corrobora, até certa extensão, a versatilidade metabólica de assimilação de diferentes substratos lipofílicos da levedura Y-6419.

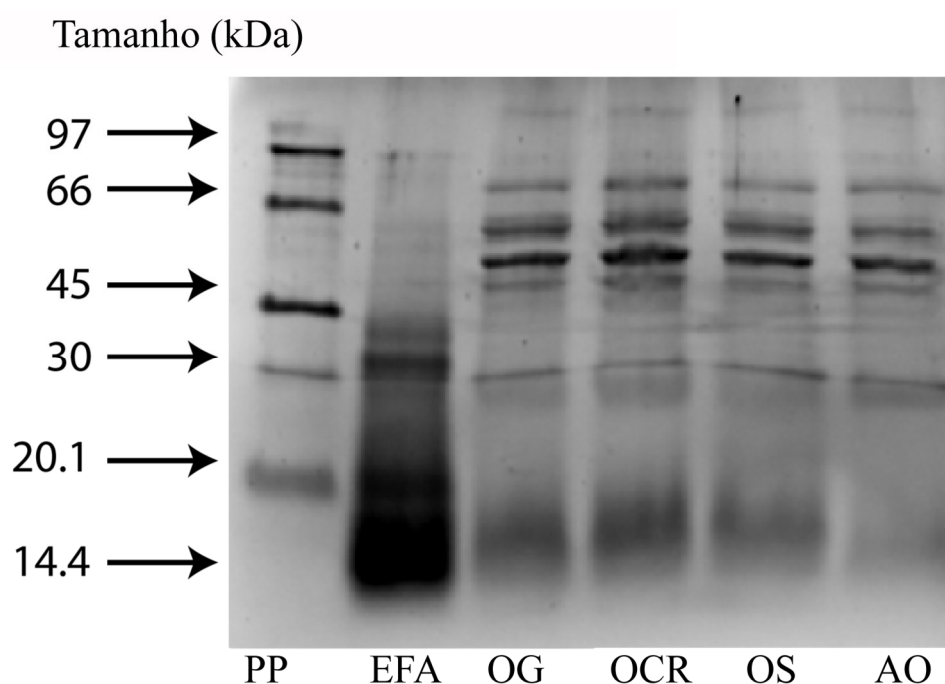


Figura 20. Gel de proteínas SDS-PAGE dos caldos fermentados pela levedura *S. bombicola* Y-6419 suplementados com diferentes tipos de óleos. Como controle e controle positivo, extrato do farelo de arroz (EFA) e um padrão de proteínas (PP) foram utilizados, respectivamente.

À critérios comparativos, Ciesielska et al. (2016) realizaram uma análise das proteínas extracelulares de *S. bombicola*. Em sua caracterização, notou-se a presença de uma enzima a qual foi classificada como uma esterase, cuja função reside na esterificação ou lactonização de soforolípídeos ácidos. Seu peso molecular aferido foi de 75 kDa que

coincide ou está próximo das bandas localizadas no ensaio desta tese. Ademais, estudos mais sofisticados são necessários para se obter uma maior resolução do panorama bioquímico durante o processo fermentativo da levedura.

5.2.4 Cinética de Produção dos BSs

Com o intuito de desvelar o comportamento fermentativo ao longo do tempo, foi realizado uma cinética de consumo de substratos e produção em um período de incubação de 9 dias. Os resultados podem ser encontrados na Figura 21, 22 e 23. Optou-se por dividir os dados cinéticos em três figuras a fim de elucidar diferentes pontos que serão abordados ao longo deste tópico.

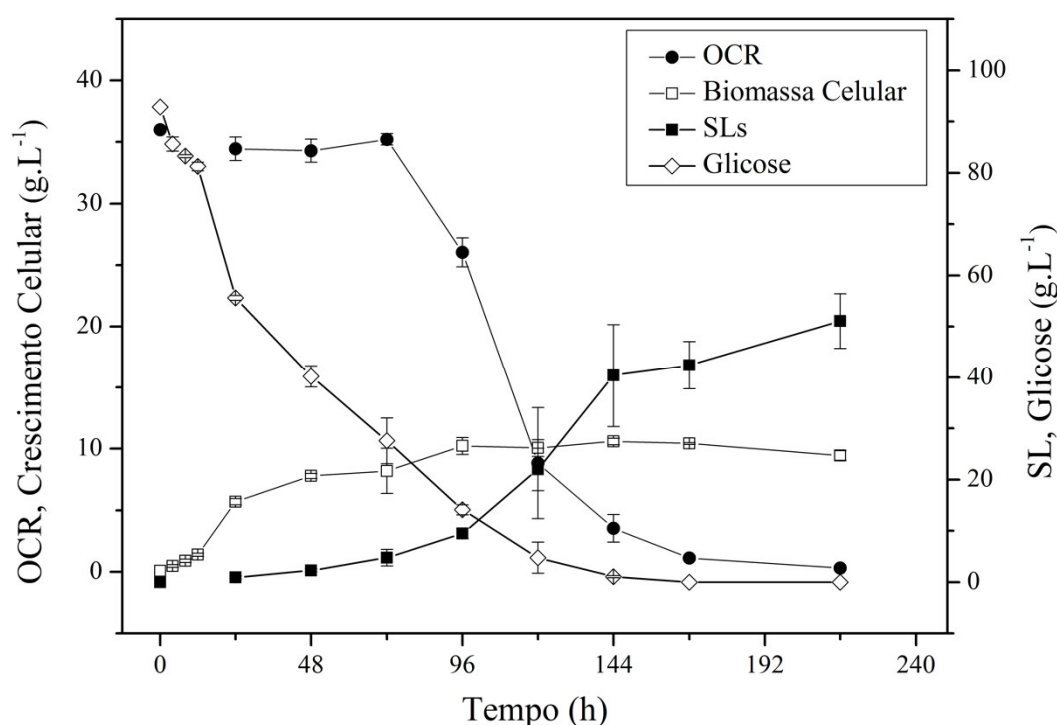


Figura 21. Cinética de Fermentação de Soforolipídeos pela levedura *S. bombicola* Y-6419. As diferentes formas geométricas representam as variações dos diferentes substratos e produtos obtidos ao longo de 9 dias (216 horas) de fermentação.

Acerca da Figura 21, a fase estacionária celular foi atingida após 48 horas de cultivo. Paralelamente, neste momento iniciou-se a síntese de SLs e, também, o consumo de OCR. Apesar da concentração de glicose, neste momento, fosse de 40 g/L, presume-se que a assimilação de OCR propiciou uma produção acelerada de SLs devido ao potencial da fonte carbônica de providenciar precursores diretos, como ácidos graxos, que foram utilizados

para compor a parte apolar dos SLs sintetizados. Neste sentido, a produção de SLs pela levedura Y-6419 está, possivelmente, desassociada ao crescimento celular e, portanto, a indução da reprodução celular pela adição do EFA desempenhou um fator fundamental, fornecendo proteínas, cofatores enzimáticos e micronutrientes para que a densidade celular se elevasse ao longo do cultivo. Na realidade, outros estudos acerca da produção de SLs apontam à importância de se acessar alta densidade celular de modo que seja também atingido altas produtividades volumétricas, por exemplo, em trabalhos onde foi possível obter produtividades de até 3,7 g de SLs/L.h em um cultivo de 80 g/L de células de *S. bombicola* (Gao et al., 2013).

Adiante, glicose e OCR foram totalmente depletados em aproximadamente 144 horas de cultivo, durante a fase estacionária. Enquanto a produção de SLs foi continuamente mantida atingindo seu pico máximo em concentração de 51 g/L após 216 horas de cultivo. A partir destes dados, foi possível calcular os parâmetros cinéticos de rendimento ($Y_{P/S}$ – g de SLs/g de substrato) e produtividade (Q_p – g de SLs/L.h) para este estudo, os quais se encontram na Tabela 10 em comparação com outros estudos que implementaram estratégias fermentativas similares e distintas.

Como pode ser observado, a implementação de uma estratégia de fermentação em batelada para a produção de SLs, comparativamente, apresentam $Y_{P/S}$ e Q_p similares, sendo compreendidos dentro da faixa de 0,1 – 0,4 g/g e 0,16 – 0,31 g/L.h, respectivamente. Além disso, salienta-se também que o rendimento obtido neste estudo (0,40 g/g) se encontra, relativamente, entre os maiores obtidos, o que enfatiza o potencial em utilizar subprodutos agroindustriais em processos fermentativos como fontes alternativas de nutrientes como facilitadores e indutores do metabolismo de biomoléculas mais complexas e reguladas por diversos fatores como as relações de C/N e CH/CL.

De fato, apesar da falta de modelos bioquímicos padronizados para a estimativa de máximas conversões de substrato em biomassa celular e SLs, este estudo apresentou rendimentos de 0,07 g/g para a crescimento celular e 0,40 g/g na produção de SLs, indicando que as condições empregadas (e.g. concentração de substrato, pH, agitação, razão C/N e CH/CL) favoreceram a síntese do bioproduto em detrimento da produção de biomassa.

Por outro lado, embora a produtividade volumétrica obtida foi de 0,24 g/L.h, a mesma pode ser melhorada a partir da implementação de diferentes técnicas fermentativas como batelada alimentada, o que facilita o desenvolvimento do bioprocessamento ao longo dos próximos estudos. Ainda, outros estudos que implementaram a estratégia mencionada obtiveram resultados próximos aos deste estudo, por exemplo, os trabalhos de Samad et al.

(2017) e Bajaj e Annapure (2015) dos quais nota-se uma produtividade de 0,31 g/L.h e 0,21 g/L.h, respectivamente.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos em relação ao processo fermentativo da levedura *S. bombicola* Y-6419 e outros trabalhos nos quais também foi utilizado linhagens diferentes de *S. bombicola* com estratégias fermentativas similares e distintas ao presente trabalho.

Substrato	Estratégia Fermentativa	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	SLs (g/L)	Referência
OCR, glicose e EFA	Batelada	0.40	0.24	51	<u>Este estudo</u>
Palha de milho hidrolisada, OCR	Batelada alimentada	0.05	0.31	52	Samad et al. (2017)
Óleo de Tapis, Melita e Ratawi	Batelada	0.13	0.22	26	Shah et al. (2017)
combinado com glicose		0.11	0.18	21	
		0.10	0.16	19	
Gordura de Frango, glicose	Batelada	0.26	0.33	40	Minucelli et al. (2017)
Óleo de Castor, glicerol	Batelada alimentada	0.11	0.21	40	Bajaj and Annapure (2015)
Melaço de Cana	Batelada	0.10	0.19	23	Takahashi et al. (2011)
Whey deproteinado, glicose e ácido oleico	Batelada	0.17	0.18	34	Daverey e Pakshirajan (2010)

Acerca da Figura 22, é possível observar uma queda abrupta do pH ao longo das primeiras 48 horas de fermentação e, desta forma, atingindo um pH final de 3.3 enquanto a redução máxima da tensão superficial de 33 mN/m foi atingida após 96 horas de fermentação. Interessantemente, após as primeiras 96 horas, houve um aumento repentino da tensão superficial, fato o qual foi inesperado uma vez que a concentração de SLs aumentou continuamente. Logo, conforme elaborado em outros tópicos, após atingir a máxima redução da tensão superficial, sendo esta dependente da concentração de surfactantes/biossurfactantes, caso não haja degradação nem o consumo dos mesmos, a

tensão superficial deverá se manter constante. Neste sentido, hipotetizou-se que como houve a síntese de grandes quantidades de SLs, também houve a agregação do mesmo em micelas e, consecutivamente, sua precipitação, o que fez com que a concentração de SLs solúvel no meio diminuísse. Assim, a tensão superficial tornou a se elevar. Adiante, após aproximadamente as 144 primeiras horas de fermentação retomou-se a síntese de SLs fazendo com que a tensão superficial, novamente, diminuísse, porém, ainda assim, não atingiu os valores mínimos obtidos nas primeiras 96 horas de fermentação.

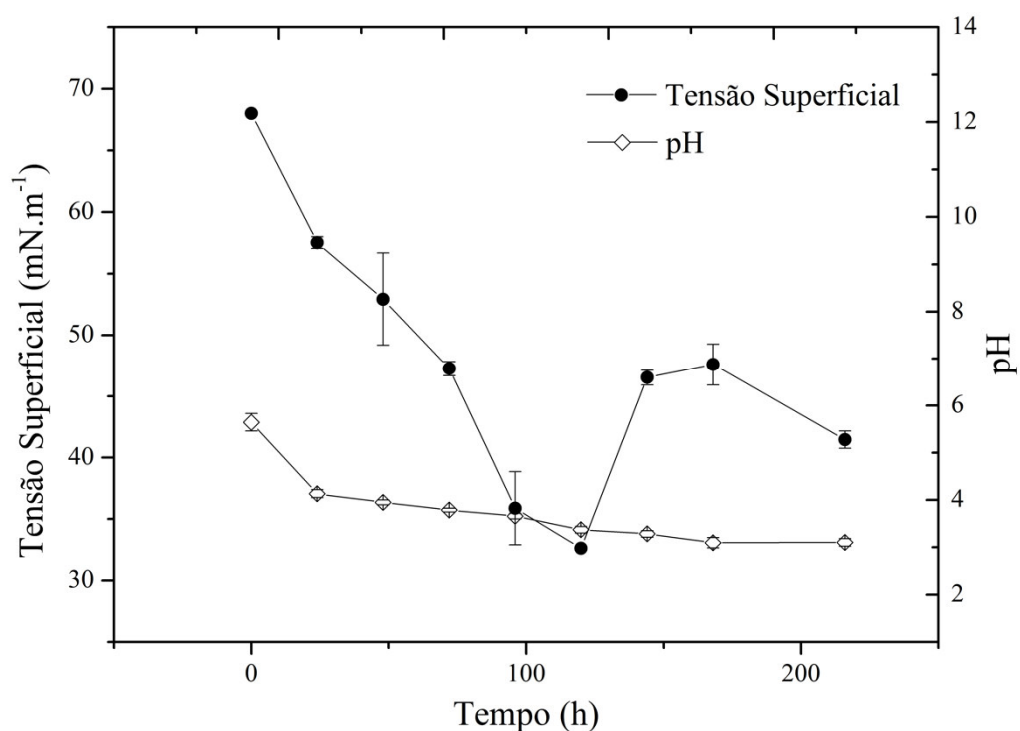


Figura 22. Variação de pH e tensão superficial ao longo do tempo durante o processo fermentativo de produção de SLs pela levedura *S. bombicola* Y-6419.

Outro comportamento fora do esperado como a produção de SLs após a depleção dos substratos tanto lipofílico quanto hidrofílico também foi observado. E, portanto, outras análises foram feitas através de CLAP, dispostas na Figura 23 e, notou-se um aumento da concentração de glicerol que atingiu aproximadamente 18 g/L até às 100 horas de cultivo. No que tange estes resultados, presumiu-se que, em duas perspectivas diferentes, o glicerol gerado fora derivado do próprio metabolismo da levedura sob determinados estresses como a presença de peróxidos no OCR e, desta forma, glicerol foi sintetizado como uma alternativa à respiração celular sob a prerrogativa de recuperar cofatores enzimáticos reduzidos e evitar a oxidação celular (Yang et al., 2019).

Em uma outra perspectiva que também se apresenta plausível, o glicerol derivara da degradação de glicerídeos provenientes do OCR e, isso explicaria seu crescente aumento até atingir seu ponto máximo em aproximadamente 100 horas, momento no qual o máximo consumo e depleção de OCR coincidem também. Ademais, ressalta-se a partir das 144 horas até 216 horas houve o consumo do glicerol como fonte de carbono hidrofílica e, evidentemente, a observação deste fenômeno não foi denotada anteriormente pelo provável motivo de que a glicose ainda estava presente no meio. Esta que é mais facilmente assimilada por células microbianas devido aos mecanismos inatos e inerentes do metabolismo celular como de transporte e catabolismo.

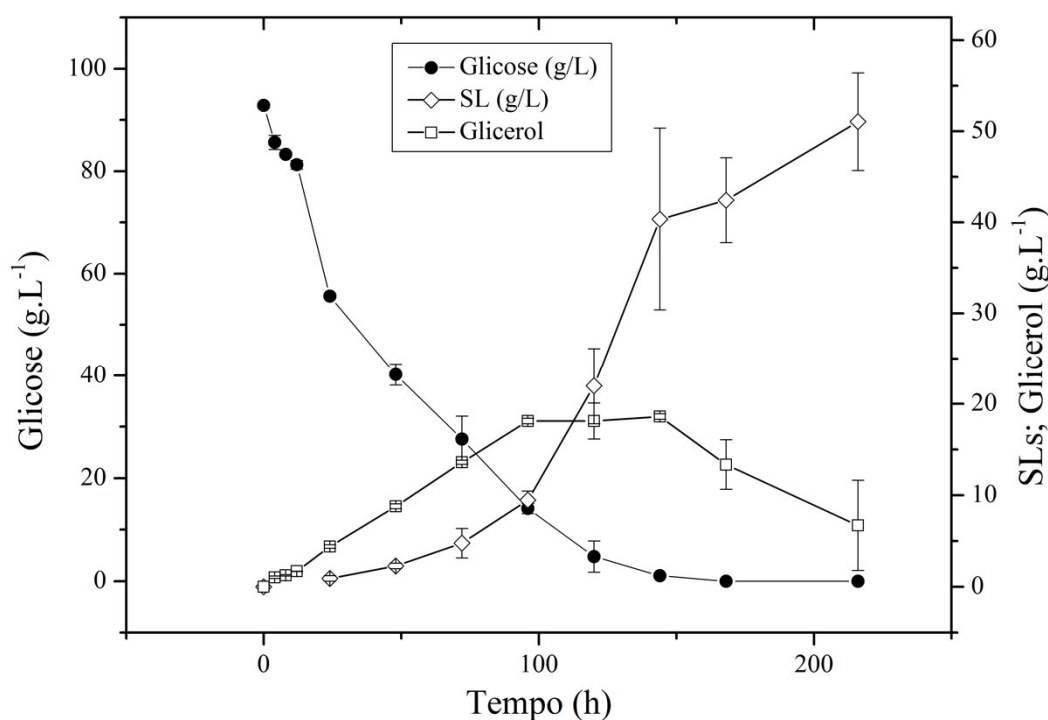


Figura 23. Análise da produção e consumo de glicerol alinhado a produção de SLs ao longo do cultivo da levedura *S. bombicola* Y-6419.

Concomitante ao consumo de glicerol, houve também um aumento da síntese de SLs pela levedura, partindo de 40 g/L em 144 horas até atingir uma concentração de 51 g/L em 216 horas, enquanto glicerol foi reduzido de 18 g/L até 7,3 g/L no mesmo intervalo de tempo. Isto demonstra que o glicerol também é uma potencial fonte de carbono para a produção de SLs. Fato este que aponta para o desenvolvimento de bioprocessos que possam utilizar glicerol residual como os derivados de reações de transesterificação em biorrefinarias de biodiesel. De fato, encontra-se na literatura múltiplos trabalhos acerca da utilização de glicerol como fonte de carbono para a produção de SLs pela levedura *S. bombicola* (Ma et al., 2020; Roelants et al., 2019; Wang et al., 2020)

Dito isto, o uso de diferentes técnicas para produzir, especificamente, SLs é imperativo ao favorecimento da comercialização dessas biomoléculas e, também, ao aumento de seu custo-benefício a fim de torná-los mais competitivos em relação aos seus homólogos surfactantes sintetizados por vias químicas, que ainda encontram-se avantajados em termos tecno-econômicos. Os próximos passos focarão em outras estratégias como batelada alimentada e fermentação e separação semi-contínua, bem como também a integral substituição de substratos não renováveis por subprodutos a fim de atenuar o custo associado à matéria-prima.

5.2.5 Extração e Separação dos SLs

5.2.5.1 Processamento de Downstream: Opções Convencionais de Separação e Formulação

Os SLs produzidos, em condições normais de temperatura possuem uma característica física viscosa e pegajosa, transparecendo comportamento similar ao mel. Sua cor pode variar entre laranja, marrom e amarelo. Diferentes métodos foram utilizados para extraí-los, dentre eles, separação física por centrifugação, liofilização e extração utilizando acetato de etila. Na Figura 24 encontra-se disponível fotografias dos diferentes estados dos SLs obtidos a partir dos métodos mencionados.

A separação por centrifugação possui a vantagem por ser um método livre da utilização de reagentes. Em contrapartida, desvantagens do método residem em sua dificuldade de escalonamento devido ao gasto energético. A extração conduzida por solventes, embora utilize moléculas orgânicas tóxicas exigindo protocolos de recuperação e de maior segurança no manuseio, o método mostra-se eficiente em se obter SLs mais puros e íntegros. Diante disto, também é válido mencionar que ao comparar a separação por gravitação e por solventes, notou-se uma diferença negligenciável na quantidade final de SLs recuperado. Em outras palavras, é possível que haja uma alta perda de produto com a utilização de solventes.

De fato, Zulkifli et al. (2019) em um estudo conduzido pela separação e purificação de SLs por dois diferentes métodos, sendo eles solvatação e precipitação através de dialise ácida, observaram uma recuperação de SLs significativamente maior nos ensaios conduzidos por precipitação ácida, a qual rendeu 98 g/L de SLs enquanto para o método por solventes apenas 13 g/L. Portanto, nota-se que a utilização de solventes faz com que parte dos SLs

produzidos se percam em outras fases, inclusive na fase aquosa, ou necessitem de diversas repetições para se extrair a totalidade produzida no meio de cultivo.

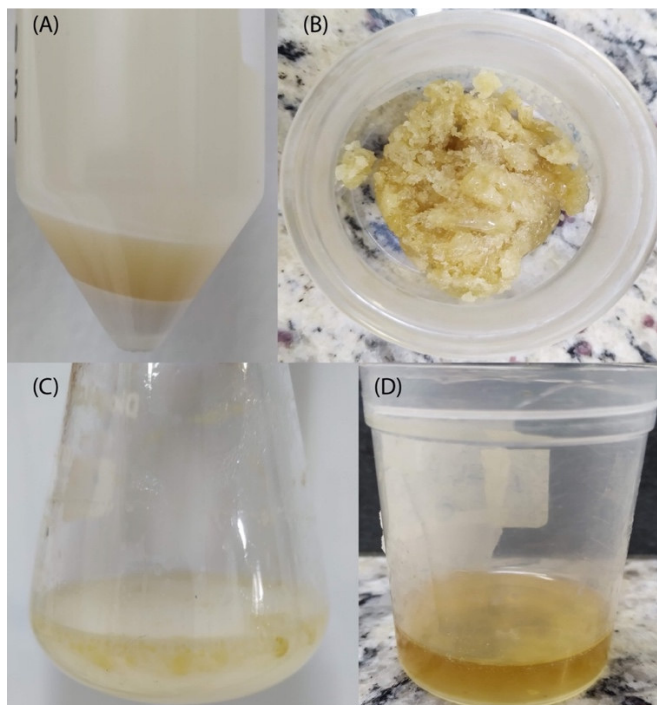


Figura 24. Diferentes estados físicos dos SLs obtidos. (A): Forma precipitada após centrifugação à 4000 rpm x 20 min (4°C); (B): Estado sólido rígido após liofilização por 48 h junto ao meio de cultivo; (C) Estado parcialmente solubilizado em meio de cultivo; (D) SLs em forma líquida, viscosa, de aspecto gomoso após extração por solvatação, seguido de evaporação.

Os SL-lactônicos e acídicos, apesar de possuírem cadeias lipídicas longas, possuem solubilidade parcial em água por volta de 7 g/L. Desta forma, sua afinidade por ambas as fases polares e apolares faz com que a migração das moléculas para alguma fase em específico seja pouco seletiva e de difícil controle dependendo do solvente utilizado.

Tentativas prematuras de se obter os SLs em forma sólida foram realizadas a partir de liofilização tanto dos SLs separados por gravitação quanto do próprio caldo fermentado contendo SL, células e substratos residuais. No primeiro caso, após a liofilização o produto não alterou seu estado oleaginoso e viscoso, devido possivelmente ao alto teor de sólidos (Figura 24D). No último caso, foi possível obter um produto sólido rígido (Figura 24B), porém sem sucesso em um estado granulado. Desta forma, presume-se que a mistura de diferentes SLs dificulte o processo de cristalização devido as diversas interações intermoleculares ocorrentes entre os biossurfactantes, e a consequente formação de regiões com empacotamento amorfo de moléculas, conferindo desordem e desalinhamento das

cadeias carbônicas, principalmente quando há presença de insaturações ao longo da cadeia lipídica.

Futuras análises da possível influência da concentração de SL na eficiência de secagem devem ser conduzidas a fim de confirmar as hipóteses levantadas. Outras estratégias devem ser conduzidas visando a cristalização dos SLs, como por exemplo a adição de auxiliares secantes à solução. Deste modo, a adição de amido ou derivados vegetais glicoproteicos podem ser potenciais opções inertes no uso da secagem de SLs.

5.2.5.2 *Utilização de Adjuvantes de Secagem Renováveis: Uma Estratégia Alternativa de Bioformulações*

No contexto de biorrefinarias, a profusão de subprodutos agrícolas trás diversas possibilidades de revalorização das mesmas, seja como forma de matéria-prima para a geração de outros produtos de maior valor agregado como é o caso dos das biomoléculas derivadas do metabolismo microbiano por meio de processos fermentativos, utilização dessas biomassas vegetais para a cogeração de energia elétrica que é redirecionada aos processos corriqueiros da indústria e entre outras aplicações.

Sabendo disso e, considerando que as biomassas lignocelulósicas e amiláceas, estas que são derivadas de farelos e aquelas do processamento, no caso brasileiro, da cana-de-açúcar para a geração de etanol, nota-se determinadas propriedades vantajadas desses materiais a respeito de seus efeitos físicos de adsorção devido às suas matrizes compostas por lignina e derivados fenólicos (Yang et al., 2019). No caso de farelos, há a ocorrência de glicoproteínas, proteínas e lipoproteínas que podem realizar um efeito tanto de conservação, como é o caso da lectina presente, por exemplo, em farelos de arroz como também um potencial quelante o qual pode conferir propriedades envolvidas no processo de proteção e mobilização de moléculas (Ewart et al., 1999; Lehr et al., 1992; Lavanya et al., 2017).

Biomassas vegetais podem servir como matéria orgânica no solo e melhorando o ciclo de carbono entre a microbiota presente na rizosfera, portanto, partindo do pressuposto que poderiam também servir como fertilizantes naturais no caso da implementação destes materiais na agricultura e, alinhado a esta ideia tem-se o principal objetivo desta atual tese, que seria a substituição de químicos convencionais utilizados na agricultura por moléculas orgânicas e biodegradáveis. Desta forma, visou-se conciliar as propriedades vantajadas deste tipo de material com as propriedades do próprio bioproduto sintetizado neste trabalho, que seriam os SLs.

Retomando neste momento o tópico anterior 5.2.5.1 cujo objetivo foi demonstrar os diferentes estados físicos obtidos do processamento de *downstream* dos SLs e, partindo da problemática do manuseio dos SLs bem como da intenção de se desenvolver um produto em estado sólido, em uma prerrogativa de ensajar aos SLs uma melhor forma de veiculação, considerou-se a possibilidade de utilizar os materiais lignocelulósicos e amiláceos disponíveis na região como adjuvantes de secagem no desenvolvimento das formulações de SLs. Os resultados no bioproduto final estão ilustrados na Figura 25.



Figura 25. Diferentes adjuvantes de secagem utilizados no processo de formulação dos SLs em estado sólido. (a) Diferentes combinações de subprodutos agrícolas utilizados como adjuvantes de secagem no processo de liofilização de uma solução de SLs a uma concentração de 2,7 g/L, onde BCA: bagaço de cana-de-açúcar; CA: casca de arroz; FA: farelo de arroz. (b) Ilustração em perspectiva aumentada da combinação BCA/CA. O controle foi formulado a partir da secagem da soução de SLs sem a utilização dos adjuvantes.

As biomassas vegetais utilizadas foram bagaço de cana-de-açúcar (BCA), casca de arroz (CA) e farelo de arroz (FA), justamente pela maior disponibilidade na região, no entanto, acredita-se que outras biomassas também podem ser utilizadas, inclusive outros tipos de farelo como de trigo, soja, milho e entre outros. Como é observável na Figura 25, estimava-se que esses materiais poderiam ser potenciais veículos e adjuvantes de secagem e, de fato, nota-se que os ensaios nos quais foram aplicados composições em diferentes

proporções combinadas de BCA, CA e FA foi possível obter uma secagem íntegra de uma solução de SLs a uma concentração de 2,7 g/L.

Em textura, algumas formulações resultaram em um pó mais fino e outras houve a ocorrência de aglomeração das partículas até certa extensão. Todavia, esperava-se certos comportamentos uma vez que os SLs possuem aspecto viscoso. Ainda, o ensaio composto pela combinação BCA/CA (Figura 25B) apresentou melhor aspecto de manuseio comparado aos outros e, no que diz respeito ao controle, os SLs se aderiram à superfície do recipiente de secagem, impossibilitando seu manuseio de maneira facilitada, o que já era esperado devido aos testes anteriores feitos na secagem dos SLs.

Apesar do sucesso em formular um produto em forma particulada com o qual fosse melhorado a forma de manipulação do mesmo, era necessário, ainda, avaliar se o potencial dos SLs fora conservado após o processo de secagem e veiculação. No que tange suas propriedades tensoativas, era preciso examinar se após a ressuspensão destes sólidos, ou dos bioprodutos à base de SLs aderidos às superfícies das partículas de biomassa vegetal, essas mencionadas propriedades seriam conservadas ou até mesmo melhoradas. É evidente que, conforme mencionado durante a revisão bibliográfica que o potencial dos SLs ou dos BSs se estendem além de propriedades físico-químicas, afora, também apresentam propriedades biológicas que devem ser avaliadas em conjunto. No entanto, neste momento, foi avaliado apenas um fragmento de suas habilidades com o objetivo de simplificar o método utilizado. Desta forma, após a ressuspensão das formulações em água destilada, examinou-se a tensão superficial do líquido e comparou-os com o controle utilizando uma mesma solução de SLs de forma que fosse mantida a mesma concentração após a ressuspensão dos sólidos. Os resultados podem ser encontrados na Tabela 11.

Tabela 11. Tensão superficial obtida a partir da dessorção dos SLs veiculados nas diferentes matrizes lignocelulósicas utilizadas como adjuvantes de secagem. O controle foi realizado a partir da tensão superficial obtida da solução de SLs liofilizada e ressuspenida em água destilada.

Composição Vegetal da Formulação em Pó de Biossurfactantes (% m/m)	Tensão Superficial (mN/m)
BCA/CA/FA (30//30/40)	51,1
FA	53,0
BCA/FA (50/50)	51,5
BCA/CA (50/50)	48,6
Controle (Biossurfactante liofilizado)	46,4

Observa-se que ao comparar os ensaios com o controle, a formulação que apresentou melhor dessecamento do bioproduto foi a combinação BCA/CA, da qual após ressuspensão em água destilada exibiu redução da tensão superficial de 48,6 mN/m enquanto o controle, contendo apenas biossurfactantes exibiu uma redução de 46,4 mN/m. Ademais os outros ensaios também, até certa instância, suas propriedades tensoativas embora menos que o ensaio BCA/CA. Isso mostra que as biomassas lignocelulósicas e amiláceas serviram como bons adjuvantes de secagem, conferindo características sustentáveis e biodegradáveis aos bioprodutos devido à sua natureza orgânica e de fácil acesso aos organismos presentes no solo.

É válido salientar, neste ponto, que este estudo se mostra pioneiro a respeito dessa aplicação e, o desenvolvimento do processamento de *downstream* acoplado a esta estratégia de utilização de adjuvantes de secagem à base de materiais lignocelulósicos é promissor e será construído em maiores detalhes em estudos futuros. À critério de esclarecimento sobre o método utilizado, que por certa perspectiva, se apresenta limitado quanto sua abrangência interpretativa, presumiu-se que apesar as respostas biológicas acerca das formulações não fora avaliada, a aderência de microrganismos, sendo eles cooperadores ou patogênicos presentes no solo, será facilitada devido a suas propriedades adsorventes conferidas pela matriz de lignina e moléculas complexas de conjugados glicoproteicos e, portanto, isto também facilitará o contato do bioproduto à rizosfera (região de crescimento de raízes e interação entre a microbiota do solo – maiores detalhes retornar ao tópico 2.1) e sua difusão ao microcosmo presente. Desta forma, pode-se estimar que suas propriedades biológicas se não aumentadas, permanecerão constantes. Além disso, acredita-se que este método também permitirá um maior tempo de prateleira do bioproduto, o que também amenizará perdas econômicas e diminuirá o preço final do mesmo.

Em um outro estudo utilizando adjuvantes de secagem não-renováveis, Barcelos et al. (2014) conduziu a secagem de BSs por meio da implementação de maltodextrina e argila ativada. Neste mesmo estudo, também foi avaliado apenas a redução da tensão superficial após a ressuspensão dos sólidos em água destilada e, foi observado que esta propriedade também foi conservada de maneira análoga a esta tese, obtendo assim uma redução de 32 mN/m. Além disso, aferiu-se que a maltodextrina também surtiu um efeito protetor nos BSs secados de maneira com que os mesmos fossem capazes de resistir ao estresse termal e de umidade aplicado ao longo de diversos meses de estocagem. Fatos estes que permitem corroborar a especulação de que as moléculas presentes nas biomassas lignocelulósicas também sejam capazes de realizar este tipo de proteção. Afora, outros estudos são

necessários para avaliar a liberação prolongada no solo destes bioprodutos quando veiculados aos adjuvantes de secagem e, desta forma, também construir o desenvolvimento de um produto robusto e de baixo custo.

5.2.6 Caracterização Química dos BSs

5.2.6.1 Espectro IVTF

O espectro IVTF dos SLs obtidos em diferentes etapas de desenvolvimento desta tese foram analisados e suas respectivas transmitâncias em função do comprimento de onda podem ser encontradas na Figura 26.

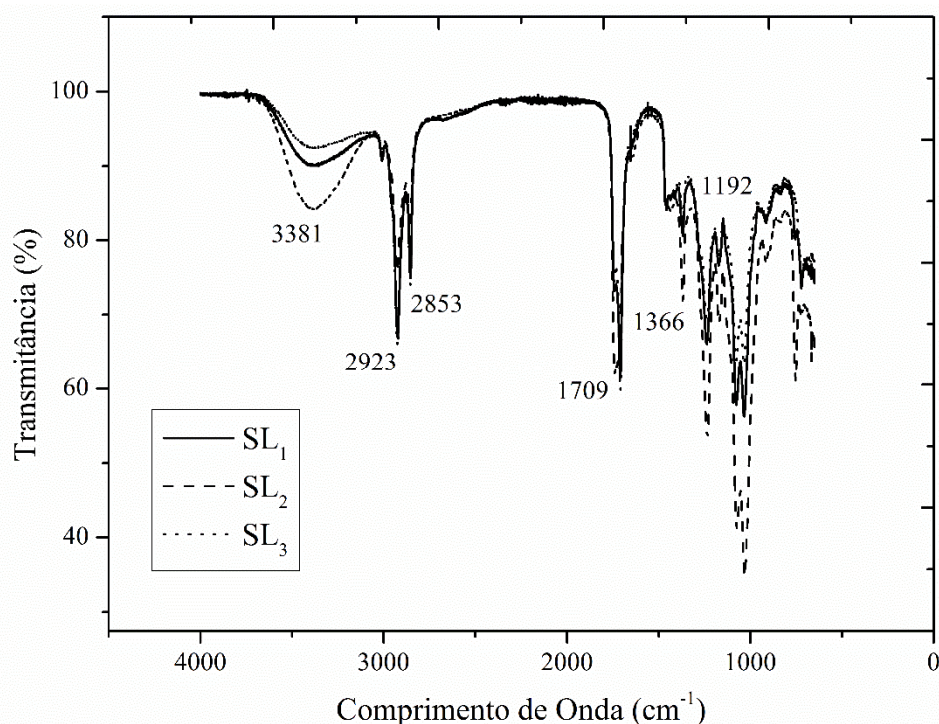


Figura 26. Espectro infravermelho das ligações químicas presentes nos biossurfactantes soforolipídico obtido pela levedura *S. bombicola* Y-6419 utilizando meios sintético (SL₁) e, subprodutos agroindustriais (OCR, EFA) em diferentes concentrações (SL₂, SL₃) como substratos em fermentação submersa.

A respeito desta caracterização, nota-se que os três SLs obtidos em fermentação apresentaram transmitâncias similares entre eles, independente do substrato utilizado como fonte de carbono e nitrogênio. Os espectros apresentaram uma típica banda de grupos alifáticos como os grupos metileno CH₂ observados em 2923 e 2853 cm⁻¹ aproximadamente. É notório também observar que os tipos ácido e lactônico dos SLs

também foram produzidos e, isto é confirmado pelos estiramentos das bandas provocadas pelas carbonilas (C=O) no comprimento de 1709 cm^{-1} , bem como também ligações éster (-COO-) ou, em específico neste caso, lactônicas em 1172 cm^{-1} . Outras bandas características também foram localizadas nos comprimentos de 3381 e 1366 cm^{-1} as quais podem corresponder ao grupo C-O-H no plano de desdobramento de ácidos carboxílicos (-COOH), que são os típicos grupos funcionais dos SLs acídicos.

5.2.6.2 Caracterização de Massas por CLAP-EM

Um sistema de CLAP acoplado a um EM foi utilizado para elucidar e confirmar as estruturas da mistura de SLs sintetizadas pela levedura *S. bombicola* Y-6419. O cromatograma, juntamente com outros dados na literatura, sugerem que uma mistura complexa de SLs com a presença de moléculas diacetilada, monoacetilada, lactônica e acídica. Neste sentido, é cauteloso enfatizar que essas conclusões foram tecidas devido a uma meticulosa comparação na literatura entre outros trabalhos com os quais fora apresentado outros espectros de massa provenientes das estruturas de SLs produzidos pela levedura *S. bombicola*. A tabela 12 trás com mais detalhes os dados da caracterização por CLAP-EM em comparação com os outros trabalhos abordados.

Similarmente, Imura et al. (2013) detectaram a produção de SLs diacetilado e monoacetilado lactônico e, também acídico relevado pelo pico 687 (m/z), ambos produzidos pela levedura *S. bombicola* CGMCC 1576. Em outro estudo, em complemento a CLAP-EM, o perfil de ácidos graxos da estrutura dos SLs sintetizados pela levedura *S. bombicola* NBRC 10243 demonstraram a presença de SLs lactônicos diacetilados com duplas insaturações e cadeia carbônica de C18:2, também, com cadeias C18:1, SLs acídicos diacetilados com insaturações singulares e cadeia carbônica de C12:1, acídicos monoacetilados de C18:0, monoacetilados acídicos de C18:2, monoacetilados acídicos de C20:0 e, entre outros (Li et al., 2016).

De fato, misturas complexas de SLs produzidos por vias biotecnológicas são reportadas em muitos estudos. Por exemplo, Shao et al. (2012) detectaram cerca de 10 estruturas distintas de SLs por uma variante da levedura *Wickerhamiella domercqiae*. Ainda sobre, todas as biomoléculas identificadas foram SLs de cadeia carbônica de C18 e diferiram entre si apenas no grau de acetilação, insaturação e na presença de ligações lactônicas ou acídicas. Também, Morya et al. (2013) obtiveram uma mistura complexa de SLs diacetilados

produzidos pela levedura *S. bombicola* ATCC 22214 em um cultivo composto por óleo de coco e glicose como fontes de carbono.

Tabela 12. Picos de relação massa/carga (m/z) e seus respectivos tempos de retenção do presente trabalho em comparação a outros trabalhos encontrados na literatura.

Presente Estudo		Estudos Comparativos			
TR (min)	Pico (m/z)	TR (min)	Pico (m/z)	Tipo de SL	Referência
15	665.37	11.35	665	SL ácido monoacetilado de cadeia C18:1	Shao et al. (2012)
		8.45	666	SL ácido monoacetilado de cadeia C18:0	Li et al. (2016)
20.0; 24-25; 40; 48	705.31; 707.32; 704.38; 706.46	14.81;	705;	SL ácido diacetilado de cadeia C18:2;	Shao et al. (2012)
		16.64	707		
		-	705.4	SL ácido diacetilado de cadeia C18:1 fatty acid	Jiménez-Peñalver et al. (2020)
20.0	722.37	-	722	SL ácido monoacetilado de cadeia C20:0	Li et al. (2016)
24-25	729.39	-	729	SL ácido diacetilado	Imura et al. (2013)
24-25; 48	689.43; 689.41	31.71	689	SL lactônico diacetilado de cadeia C18:1	Shao et al. (2012)
		33,13;	688;	SL lactônico diacetilado de cadeia C18:1;	Li et al. (2016)
40	687.37	27.85	686	SL lactônico diacetilado de cadeia C18:2	
		26.31;	687;	SL lactônico diacetilado de cadeia C18:2;	Shao et al. (2012)
42	663.37	10.21	663	SL ácido monoacetilado de cadeia C18:2	
		10.60	662	SL ácido monoacetilado de cadeia C18:2	Li et al. (2016)
42	645.55	20.68	647	SL lactônico monoacetilado de cadeia C18:1	Shao et al. (2012)

TR = Tempo de Retenção

Analogamente, Jiménez-Peñalver et al. (2020) observaram, em uma mistura de SLs produzidos por uma linhagem de *S. bombicola* utilizando biomassa residual de girassol, um dominante sinal no espectro de massas de 687,4 (m/z), o qual faz menção a SLs lactônicos diacetilados de cadeia carbônica de C18:1 e, em uma menor proporção SLs lactônicos monoacetilados de cadeia carbônica C18:1.

5.2.6.3 Caracterização dos Ácidos Graxos contidos nos SLs por CG-EM

A parte apolar dos SLs ou mais precisamente, os ácidos graxos contidos nos SLs foram caracterizados por CG-EM e os dados podem ser encontrados na Tabela 13. Acerca, constam apenas os dados obtidos nos tempos de 120 horas e 216 horas, onde esta representa o tempo final de fermentação e, logo, a mistura de SLs completa coletada. Nota-se que há uma notória presença de SLs de cadeia carbônica C18 com diversos graus de insaturação, enquanto que no tempo 120 horas houve a presença de algumas estruturas divergentes do tempo final.

Tabela 13. Relação Composicional e as respectivas proporções mássicas dos ácidos graxos encontrados nos SLs sintetizados pela levedura *S. bombicola* Y-6419 nos tempos 120 horas e 216 horas (final) de seu cultivo fermentativo.

Tempo (h)	Composição	Proporção Mássica (% m/m)
120	C9:0	4
	C16:0	15
	C18:2	9
	C18:1	38
	C18:0	14
	C12:1	4
	C22:0	3
216 (SL Mistura Final)	C16:0	5
	C18:1	36
	C18:2	30
	C18:3	5
	C18:0	8
	C20:2	4
	C22:0	2

Devido ao fato de que a levedura *S. bombicola* possui facilidade na assimilação de compostos lipofílicos como hidrocarbonetos, gorduras e ácidos graxos, não seria de grande estima estipular que há certas interconversões entre os próprios SLs produzidos como mecanismo de alívio de estresse oxidativo proveniente do meio de cultivo fermentado. Neste

sentido, em 120 horas de cultivo apresentou-se SLs de cadeia C9 e C12:1, os quais não estão presentes no tempo de 216 horas. Em contrapartida, unicamente em 216 horas houve a presença de SLs de cadeia C20:2 e C18:3. Ainda há diversas lacunas e gargalos metabólicos na produção de SLs devido à complexidade de biossíntese e regulação do anabolismo destas moléculas, portanto, como mencionado no tópico 5.2.3 houve a excreção de diversas proteínas no meio de cultivo que poderiam realizar múltiplas funções catalíticas, inclusive a oxidação e o transporte de SLs.

Ademais, os SLs mais comumente sintetizados possuem cadeias carbônicas de C18:0, C18:1, C18:2 e C16:0, os quais foram predominantes tanto em 120 e 216 horas. Neste momento, salienta-se a importância de retomar alguns resultados expostos no tópico 5.1.2.1 que diz respeito sobre o perfil de ácidos graxos dos óleos utilizados neste estudo. Acerca, nota-se que as cadeias carbônicas obtidas nos SLs estão de acordo com os ácidos graxos em maiores proporções mássicas obtidos por meio, também, de CG-EM dos óleos, fato o qual indica o possível fenômeno de síntese *de novo* dos SLs pela levedura *S. bombicola* Y-6419. Em outras palavras, há fortes indícios que os ácidos graxos estão servindo como precursores diretos na produção de SLs ao invés de serem assimilados, primeiramente em vias oxidativas como a β -oxidação de lipídeos, na qual é gerado precursores do tipo Acetil-CoA e, por fim, inseridos em reações bioquímicas de adição como as vias de biossíntese de lipídeos. Recomenda-se também neste momento, retornar ao tópico 2.2.3.4 para melhor entendimento da via metabólica de produção de SLs.

Dados a respeito dos SLs produzidos ao longo da fermentação em outros pontos coletados não estão expostos na Tabela 13, no entanto, é válido mencionar que nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas, SLs de cadeia carbônica C12:1 também foram identificados, salvo apenas o tempo 216 horas, no qual houve a ausência deste tipo de estrutura molecular.

5.2.7 Caracterização e Estabilidade Físico-Química dos BSs

Na Tabela 14 encontram-se, resumidos até o momento, alguns dos comportamentos físico-químicos dos SLs isolados, constam também, alguns compostos químicos que também foram extraídos juntos ou de certa forma permaneceram agregados aos SLs por afinidade.

É evidente observar que os soforolipídeos apresentam propriedades altamente atrativas com respeito ao seu comportamento físico-químico. Primeiramente,

destaca-se o seu alto potencial zeta (-33 mV), isto indica que em solução as partículas carregadas estão aderidas ou agregadas à superfície dos soforolipídeos ou em conjunto com suas respectivas micelas. Deste modo, demonstra-se seu potencial de mobilização de partículas do solo como por exemplo, minerais e até mesmo células de outros microrganismos.

Tabela 14. Propriedades tensoativas, composição e características físico-químicas do biossurfactante produzido pela levedura *S. bombicola* Y-6419.

Propriedades Físico-Químicas	Mistura de SLs
Solubilidade aquosa	4 – 6 g/L
Redução tensão superficial máxima	35,5 mN/m
Concentração micelar crítica	189 mg/L
Índice de Emulsificação (E₂₄)	30% em óleo de soja
Potencial Zeta	-33 mV
Condutividade	91,5 µS/cm (26,9°C)
pH	5,5 (em concentração até 4,7 g/L)
Composição Química do Extrato de SLs	
Proteínas	30 mg/g biossurfactante
Aminoácidos	3,3 mg/g biossurfactante
Fenólicos	5 mg/g biossurfactante

Além disso, isto também demonstra sua propensão em modificar o comportamento de superfícies, uma vez que irá alterar o balanço de cargas de uma determinada amostra. Portanto, sua função como bioativo servirá em ambos os casos como um dispersante, biologicamente funcional, uma vez que pode apresentar atividade pesticida e promotora de crescimento em plantas. De fato, o potencial zeta pode ser utilizado como uma medida indireta do comportamento e estabilidade das moléculas em solução e alguns estudos utilizam dessa medida como parâmetro indicativo da estabilidade de atividades enzimática e microbiana (Kaczorek et al., 2012; Kaczorek et al., 2018). Outros estudos a utilizam como parâmetro indicativo do carregamento de cargas eletroquímicas na superfície de membranas celulares. Sobre isso, os BSs podem conferir mudanças de cargas em superfícies, em microrganismos a mudança de cargas nas membranas celulares acarretam alterações em sua permeabilidade, modificando seu metabolismo, suas funções de transporte e aderência em superfícies (Soni et al., 2008; Lin et al., 2017).

Em altas concentrações, seu pH em solução é de aproximadamente 5,5. Isto indica que complicações associadas ao crescimento de plantas serão de baixa probabilidade, uma vez que essas crescem de maneira satisfatória em faixas de pH entre 5,0 e 7,0. Sua baixa concentração micelar crítica indica que há a possibilidade de trabalho com surfactantes em baixas concentrações, e ainda, promovendo todos os mecanismos relacionados às suas propriedades surfactantes, inclusive permeabilização em membranas celulares. Por fim, podem também ser facilitadores no processo de biorremediação do solo devido ao seu alto potencial em redução da tensão superficial (35,5 mN/m) e índice de emulsificação (30% em óleo de soja) tornando acessível aos microrganismos do solo, moléculas que possuam alta viscosidade e baixa solubilidade.

Evidentemente, para que haja interpretações mais conclusivas sobre o real potencial dos SLs produzidos em relação a sua atividade biológica, outros ensaios que possibilitem revelar a hidrofobicidade de superfície celular como espectroscopia, adesão microbiana em hidrocarbonetos (AMH), microscopias eletrônicas, reflexão dinâmica de luz e ângulo de contato devem ser conduzidos em conjunto, otimizando a eficiência da aplicação do produto a base de SL desenvolvido (Hua et al., 2003; Sotirova et al., 2009; Lin et al., 2017; Mohanty mukherji, 2013). Subsequentemente, nos próximos tópicos, encontra-se em mais detalhes outras propriedades obtidas a partir dos SLs produzidos. Elucida-se, desta forma, outros efeitos dos BSs tanto diretos quanto indiretos que derivam de sua atividade quando associado a outros organismos. Também, é importante notar a complexidade que se pode obter de um sistema onde tudo e todos estão sujeitos à estímulos químicos, bioquímicos, físicos. E, sobretudo, compreender se de fato há uma demanda social para o desenvolvimento de tais bioprodutos.

5.2.7.1 *Concentração Micelar Crítica (CMC)*

A análise da CMC é de suma importância para qualquer tipo de aplicação de BSs. De modo geral, este parâmetro nos mostra o comportamento interativo de moléculas tenso-ativas quando interagem entre si e em solução aquosa. A formação de micelas é uma das consequências da forte interação entre as moléculas surfactantes, além disso, o aumento da turbidez do meio aquoso. Essas micelas são complexos moleculares, como vesículas ou lipossomas, e possuem maior reatividade com respeito às propriedades tenso-ativas e emulsificantes dos surfactantes.

De acordo com a estrutura molecular de substâncias surfactantes, a CMC altera-se devido a efeitos eletrostático, causado pela repulsão ou atração de cátions e/ou ânions em sua extremidade polar, bem como efeitos estéricos, governados por interações fracas intermoleculares. O efeito eletrostático causa uma diminuição considerável na CMC comparado ao efeito estérico devido ao fato de que uma menor quantidade de moléculas poderá se agrupar, intimamente, na presença de íons de mesma carga. De fato, surfactantes iônicos apresentam CMCs relativamente menores em relação aos não-iônicos (Daltin, 2011). Com respeito aos SLs, este fenômeno não se diferencia, do contrario, é ainda mais proeminente devido as variações naturais dos tipos de SLs presentes em um mesmo meio de cultivo. Como demonstrado anteriormente, os SLs podem diferenciar-se de três maneiras, em sua cadeia lipídica, no grau de acetilação e nas posições de hidroxilas. Essas variações são suficientes para causar uma mudança em sua CMC.

Portanto, aferir a CMC é de suma importância tanto para o tipo de destino de aplicação do surfactante, quanto para sua caracterização. Neste contexto, realizou-se um ensaio de CMC, o qual dispõe-se na Figura 27.

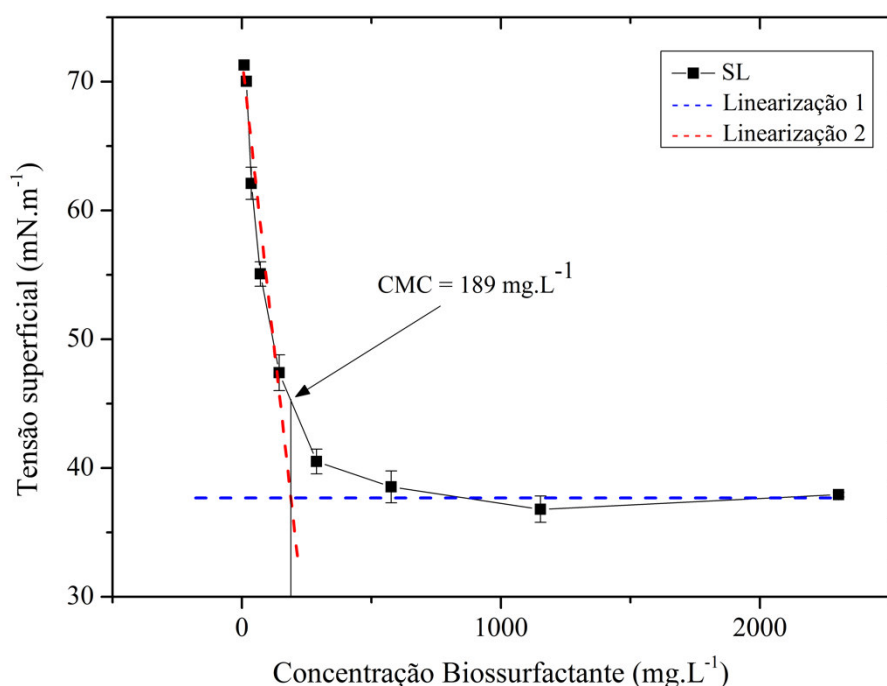


Figura 27. Análise da CMC em solução aquosa dos SLs obtidos através da cepa *S. bombicola* Y-6419. Os arcos orientados para baixo representam o possível intervalo em que pode ser encontrado a CMC.

Sobre seu resultado, nota-se que o ponto de inflexão do gráfico, ou seja, onde é possível averiguar a concentração de SLs que representa sua CMC, se apresenta no ponto em que a tensão superficial é 45,07 (mN/m) correspondendo a uma concentração [SL] de

189 (mg/L) para os soforolipídeos obtidos por meio da suplementação otimizada com EFA e OCR. Acima desta faixa de concentração, as moléculas de SLs irão se agregar em micelas, formando coloides em formato de corpos esféricos com características vesiculares e orientando sua estrutura química de modo que sua porção apolar se localize no interior da esfera, enquanto a sua porção polar apontando para fora, na superfície de sua micela. Este comportamento permite que as micelas formadas sejam capazes de englobar substâncias lipídicas ou apolares em seu interior e ao mesmo tempo interagir com superfícies/interfaces polares.

Interessante mencionar que a faixa mínima tensão superficial entre 33 e 36 (mN/m) foi obtida em concentração [SL] acima de 1150 (mg/L). À critérios comparativos, o mesmo ensaio foi realizado com os SLs obtidos por meio de cultivo com meio sintético, salvo o OCR que foi utilizado como fonte hidrofóbica, e de seus resultados pode-se observar uma CMC de 430 (mg/L), a qual se apresenta com valor relativamente mais elevado. Esses dados podem ser interpretados por duas vias fundamentais. O método de separação e extração utilizado, afinitivamente, proporcionou uma maior extração de um tipo de SL em detrimento aos outros ou, também, os substratos utilizados em cada caso proporcionaram condições suficientemente diferentes para que os tipos de SLs produzidos se disernissem entre si (Roelants et al., 2019).

Diferentes autores reportam CMCs obtidas com respeito aos SLs e, algumas delas podem ser encontradas na Tabela 15.

Tabela 15. Relação entre CMC e estrutura química de SLs biossintetizados a partir de diferentes substratos hidrofóbicos.

Composto	CMC (mg/L)	Referência
SL-Lactônico di-acetilado C18	366	Konishi et al. (2008)
SL-Lactônico não-acetilado C18	95	
SL-Acídico di-acetilado C18	138	
SL-Acídico não-acetilado C18	17	
SL-Lactônico	250	Ashby et al. (2008)
SL mistura	43	Hirata et al. (2009)
SL-Acídico não-acetilado	245	Roelants et al. (2016)
SL mistura (meio sintético)	430	<u>Presente</u>
SL mistura (meio complexo)	186	<u>Presente</u>

Há diversas formas, em uma perspectiva estrutural química, de conferir propriedades físico-químicas específicas, logo, com CMCs de magnitude e comportamento variados. Por exemplo, mudanças na estrutura das moléculas de SLs tanto acídica como lactônica, variando o grau de insaturação e posição dos radicais hidroxila na cadeia lipídica e a quantidade de grupos funcionais acetato ligados aos anéis de glicose são algumas das modificações por vias biológicas que podem ser resultados do próprio metabolismo microbiano (Ashby et al., 2008; Roelants et al., 2016; Zhang et al., 2004).

De fato, Solaiman et al. (2017) obtiveram uma CMC de 140 mg/L com uma mistura de SLs lactônicos compostos majoritariamente por ácidos graxos de C18:1, enquanto Ashby et al. (2008) com uma mistura de SL lactônicos compostos por ácidos graxos de C18:2 e C18:0 obteve uma CMC de 250 mg/L, também, no mesmo trabalho, os meios de cultivo de *S. bombicola* suplementados com unicamente ácido esteárico resultaram na síntese de SLs com CMC de 35 mg/L. Enquanto modificações por vias enzimáticas após o processo de biossíntese microbiana como a esterificação dos soforolipídeos com radicais de hidrocarbonetos também podem resultar em mudanças no comportamento de agregação das micelas (Recke et al., 2013).

Neste sentido, até mesmo pequenas mudanças estruturais nos SLs geram CMCs distintas. Apesar de que os SLs apresentam uma estrutura molecular complexa e, portanto, de cautelosa análise comparativa, de forma generalizada, os resultados de Ashby et al. (2008) indicam que cadeias hidrofóbicas menores e/ou maiores graus de insaturação levam a maiores CMCs. Fato este que condiz com os resultados dos efeitos estéricos presentes nas interações intermoleculares de substâncias surfactantes, ou seja, se há uma menor cadeia lipídica e presença de insaturações as interações fracas irão ser minimizadas devido ao rearranjo das cadeias moleculares, resultando em uma maior concentração de moléculas presente em uma micela. Do contrario, a lactonização e a presença de grupos acetil nos monômeros de glicose dos SLs causam um efeito de redução da CMC, fatos que também condizem com as consequências do efeito eletrostático em surfactantes.

5.2.7.2 *Estabilidade Físico-Química.*

Dos SLs obtidos, objetivando uma aplicação na agricultura, sendo aqueles, uns dos compostos bioativos de formulações de bioinsumos agrícolas, para que haja eficiência em sua implementação, averiguar a estabilidade físico-química destas substâncias em evidencia, se mostra como processo primário de revelar os seus limites de aplicação. Como na prática

agrícola encontra-se solos com diversas características morfológica, mecânica e química, as variações de temperatura, pH e salinidade (potencial iônico) são constantes, desta forma, entende-se que medir e relativizar o potencial dos BSs em resistir à estas possíveis variações é um dos caminhos que indicam as limitações da técnica ou do produto.

Assumindo que alterações no potencial tensoativo dos SLs traduz-se em alterações no potencial de redução das tensões interfacial/superficial das substâncias ou partículas envolvidas, submeteu-se uma solução solução aquosa de SLs de igual concentração a diferentes condições de pH e salinidade (NaCl % m/v) a fim de examinar a estabilidade dessas soluções perante a estes parâmetros. Os resultados podem ser encontrados na Figura 28 e, a respeito destes, nota-se que os SLs obtidos são sofreram alterações em seus potenciais de redução da tensão superficial dentro das faixas estudadas, tanto de pH quanto de salinidade (NaCl % m/v). Sobre isso, é válido ressaltar que estes resultados foram esperados uma vez que o comportamento tensoativo dos biossurfactantes já foram avaliados e, em sua grande maioria, apresentaram maior estabilidade físico-química em comparação aos seus heterólogos sintetizados por via química e petro-química (Kosaric e Sukan, 2014).

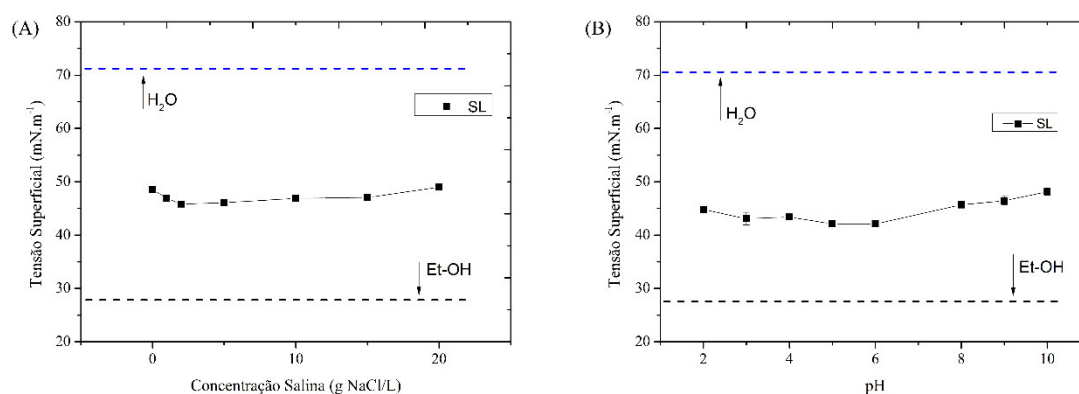


Figura 28. Estabilidade Físico-Química da redução da tensão superficial inerente ao uso do biossurfactante sofrorolipídico obtido pela levedura *S. bombicola* Y-6419 em diferentes concentrações salinas (A) e diferentes pHs (B).

Todavia, haveria levianidade se fosse assumido que apenas apresentar estabilidade tensoativa significaria a absoluta conservação de todos os seus papéis (Tópico [2.2.5](#)) biológico e físico-químico quando aderido às partículas do solo e em associação com a própria rizosfera vegetal. Em outras palavras, é factível que os SLs e seus derivados produtos e formulações estejam mais suscetíveis à biodegradação quando submetidos às influências do conjunto múltiplo de variáveis tanto bióticas quanto abióticas. O ponto questionado nesse

instante, não subverte, no entanto, o fato de que houve boa resposta na redução da tensão superficial nas faixas estudadas e que há uma demanda mercadológica e técnica por produtos biológicos com essas características (Santos et al., 2016).

Salienta-se neste momento, aspectos referentes ao Tópico [2.2.5](#) e retomado nesse momento, que os BSs podem exercer um papel tanto primário quanto secundário em formulações de insumos agrícolas, principalmente quando estão agregados em seu estado micelar. Seu papel primário reside em sua capacidade de atuar no metabolismo dos organismos em contato, e neste sentido, carrega um dos princípios ativos da formulação (Shao et al., 2017). O secundário, implica que os BSs exercem um papel coadjuvante nas formulações, melhorando a interação de um determinado princípio ativo com as plantas e solubilização de nutrientes pelo solo (Adetunji et al., 2021).

Testes envolvendo a interação do bioproduto a base de SLs em solos com diferentes características morfológicas e, analisando desta forma, a percolação de nutrientes, sais, retenção de água até mesmo o controle biológico da microbiota envolvida poderiam ser caminhos com os quais seja possível ter respostas mais assertivas sobre o comportamento dos BSs no solo, e desta forma, desenvolver produtos mais eficientes. Contudo, no que tange este estudo atual, os SLs pela levedura *S. bombicola* Y-6419 apresentaram boa estabilidade físico-química nas condições simuladas.

5.3 Produção de Esporos de *Trichoderma harzianum* via Fermentação em Estado Sólido

5.3.1 *Screening da Composição do Meio de Cultivo Sólido*

Diante do desafio de estabelecer um processo robusto de fermentação em estado sólido (FES), empregando biomassa lignocelulósica pré-tratada como suporte sólido e principal fonte de carbono para o crescimento de *T. harzianum*; realizou-se um estudo no qual diferentes proporções de subprodutos agroindustriais foram misturadas e inoculadas em FES com uma solução de esporos de *T. harzianum*.

Prioritariamente, antes de iniciar os ensaios fermentativos, a fim de garantir a homogeneidade no tamanho das partículas (diâmetro) e avaliar seu respectivo efeito, foi realizado uma análise granulométrica das três biomassas utilizadas: CA, BCA e FA. Os resultados podem ser encontrados na Figura 29.

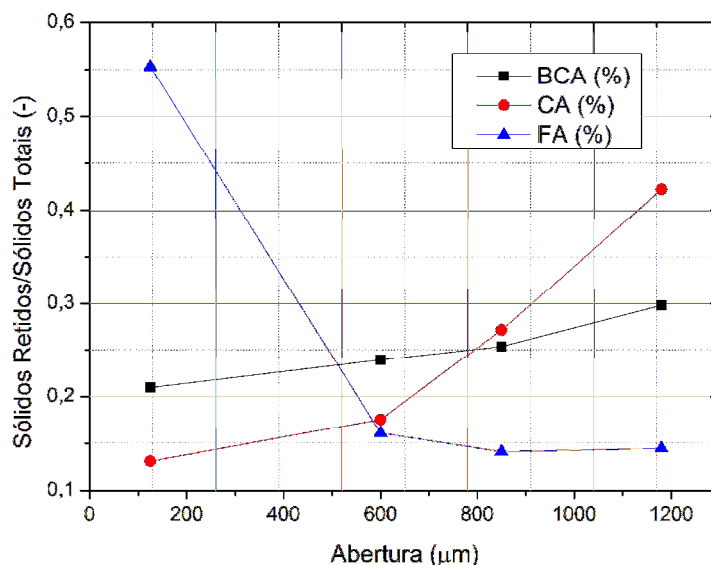


Figura 29. Granulometria de BCA, CA e FA realizado em peneiras MESH de diferentes diâmetros. Os resultados estão discriminados em unidade adimensional [-] em relação ao peso total submetido a separação granulométrica.

Nota-se que a distribuição do diâmetro das partículas com respeito ao FA mostra-se predominante na faixa de 125 µm, enquanto BCA e CA possuem uma distribuição proporcional no tamanho das partículas entre 125 – 1200 µm (Figura 29). Cada distribuição confere um aspecto físico e morfológico para um sistema de FES. Biomassas distintas possuem características intrínsecas e específicas de sua espécie, conferindo ao sistema diferentes densidades relativas, empacotamento, porosidade de partícula e meio, bem como diferentes polaridades de superfície das fibras. Esta última se apresenta como uma propriedade auxiliar à colonização e crescimento do microrganismo escolhido para a fermentação, de modo que, no caso onde haja uma melhor aderência, maior a chance de contato entre o organismo e o substrato. Este efeito se traduz em uma maior eficiência de produção, seja ela biomassa celular ou metabólitos do interesse socioeconômico. As outras características mencionadas são mais direcionadas às influências físico-químicas como transferência de massa e calor. É válido ressaltar neste ponto, que esses efeitos serão discutidos durante o tópico.

Empregando diferentes proporções das biomassas após a etapa de homogeneização, iniciou-se os ensaios fermentativos, gerando os resultados encontrados na Figura 30, de maneira gráfica, e Tabela 16, onde as proporções mássicas (m/m %) e diâmetro médio de partícula (ϕ) foram elucidados.

Tabela 16. Ensaios fermentativos conduzidos a partir de diferentes composições mássicas do meio de cultivo sólido. Nesta tabela se encontra também os resultados da contagem final de esporos. Os experimentos foram realizados em duplicatas e o resultado expresso a partir da média obtida.

Meios	Composição FA/BCA/CA (% m/m)	Ø (µm)	n° esporos/g biomassa
1	50/50/0	596	1,10 x 10 ⁸
2	50/0/50	653	8,75 x 10 ⁷
3	0/50/50	793	9,75 x 10 ⁶
4	50/25/25	624	1,38 x 10 ⁸

De acordo com os dados apresentados (Tabela 16), é notório observar que os meios compostos por FA promoveram uma maior taxa de esporulação, indicando que FA é um componente essencial no meio de cultivo formulado. Ao analisar os dados de granulometria das biomassas utilizadas, presumiu-se que os meios cujas distribuições do tamanho médio de partícula se davam majoritariamente na faixa entre 500 – 650 µm, propiciaram uma maior razão entre área superficial e volume de partícula, aumentando o contato com as hifas do fungo e, desta forma, melhoraram o acesso das enzimas extracelulares e o consequente aumento do crescimento celular (Pandey et al., 2008).

Além disso, o FA é um subproduto agroindustrial de altíssimo valor nutricional, tendo em sua composição carboidratos, proteínas, lipídeos, amino ácidos essenciais e não essenciais, minerais e vitaminas (Tabnut, 2021). Diante do fato de que o fungo *T. harzianum* se classifica como um excelente produtor de proteases, celulasas, glucanases e lipases é possível especular que, apesar da ausência de testes de atividade enzimática, *T. harzianum* foi capaz de crescer e possivelmente, hidrolisar os componentes nutritivos do FA e acessar não somente macronutrientes, como possivelmente minerais e vitaminas que ajudaram no crescimento e reduziram o estresse de um ambiente com baixa troca gasosa e de calor (Rayhane et al., 2019). Caso os nutrientes do FA estejam mais facilmente disponíveis em termos metabólicos, o fungo irá direcionar sintetizar enzimas de vias de crescimento e componentes celulares. No caso de BCA e CA, a síntese de enzimas envolvidas no transporte e na hidrólise de materiais celulósicos precede a etapa de multiplicação celular e esporulação.

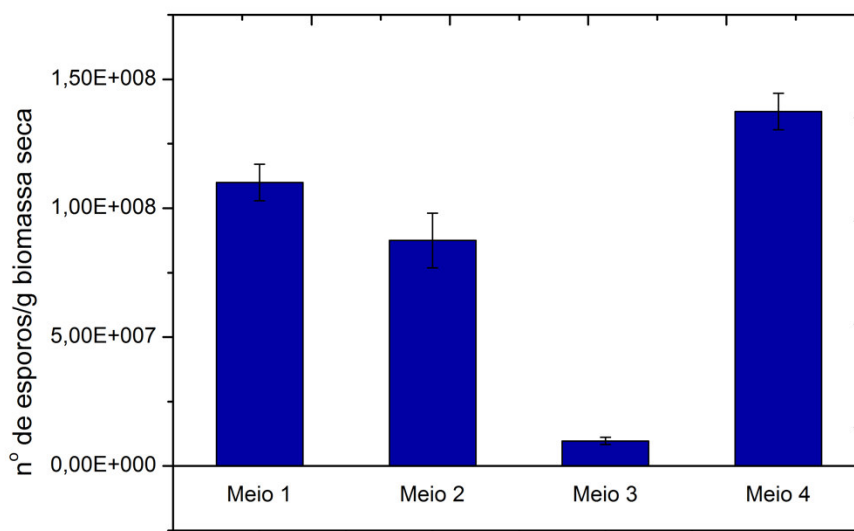


Figura 30. Concentração de esporos de *T. harzianum* em meios de cultivo a base de FA, CA e BCA após 7 dias de FES.

Com respeito ao meio 2, o qual possuía o maior diâmetro médio de partículas, apresentou uma menor quantidade final de esporos de 36 % e 20 % com respeito aos meios 4 e 1, respectivamente (Figura 30; Tabela 16). Esta pequena diferença na quantidade final de esporos pode ser constatada devido à uma possível menor transferência de massa de oxigênio ao meio de cultivo. Partículas maiores induzem a circulação mais efetiva de ar, em contrapartida, podem diminuir o acesso aos nutrientes em sua estrutura devido a uma menor área superficial de contato, causando uma redução da quantidade de esporos produzidas. Interessantemente, ao comparar isoladamente os meios 1 e 2, nota-se que a BCA teve um efeito levemente mais positivo em relação ao CA no quesito produção de esporos. De fato, o BCA possui uma textura menos compacta e sua heterogeneidade em forma torna o meio menos rígido, facilitando a difusão de oxigênio, absorção e assimilação de nutrientes pelos micélios do fungo (Pang et al., 2006).

No entanto, os melhores resultados foram obtidos através do meio 4, no qual as três biomassas foram misturadas em proporção 50/25/25 % (FA/BCA/CA – m/m), resultado este que aponta não apenas a importância do estado físico da superfície sólida e suas propriedades fluidodinâmicas, mas como também mostra a influência do balanço de nutrientes e a razão C/N. Diferentes razões C/N podem direcionar a produção microbiana para determinadas biomoléculas em específico, como também podem proporcionar um maior crescimento celular (Sharma et al., 2002). Diante do fato de que as biomassas lignocelulósicas diferem entre si por sua diversa composição nutricional, é possível que, ao misturar as três biomassas, este balanço nutricional tenha sido alterado, causando um aumento do crescimento e

produção de esporos (Sala et al., 2021b). Entretanto, estudos e análises complementarias ainda são necessárias para que estas suposições sejam confirmadas.

Controversamente, a heterogeneidade de biomassas vegetais pode dificultar o controle do processo uma vez que a quantidade de nitrogênio e carbono contida na biomassa variam de acordo com a espécie, clima e modo de cultivo. Portanto, é imprescindível desenvolver processos em que a produção não seja somente dependente deste parâmetro, mas possa ser controlado por outras variáveis mais acessíveis como aeração, umidade e temperatura (Sala et al., 2021b). No mais, estudos visando observar a viabilidade de diferentes biomassas destinadas a produção de diferentes biomoléculas, baseando-se apenas em sua composição intrínseca, podem gerar resultados valiosos para futuros desenvolvimento de bioprocessos.

Inúmeros estudos são encontrados na literatura com respeito à trabalhos referentes a métodos de otimização, utilizando diversas técnicas. Embora uma série de parâmetros tenham sido avaliados, estudos sobre o efeito da distribuição do tamanho de partículas no crescimento microbiano estão em menor quantidade. O efeito do tamanho das partículas pode ser traduzido na pratica como porosidade ou fração de “vazio” (“*void fraction*”) da cama sólida. Quanto maior a porosidade, maior a circulação de ar no sistema, consequentemente, maior o controle de temperatura e transferência de massa.

Neste contexto, foi observado que o tamanho de partículas influencia diretamente na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelo fungo *T. reesei*. Diferentes tamanhos de sólido levaram a variações nas atividades enzimáticas de glicosidades, celulasas e xilanases, sendo que para celulasas a faixa ideal de tamanho encontrada foi de 200 – 500 (μm), enquanto para xilanases e glicosidades, partículas maiores que $>500 \mu\text{m}$ beneficiaram suas sínteses (Xin e Geng, 2010). Complementarmente, Sala et al. (2021b) analisaram uma série de parâmetros intrínsecos de diferentes subprodutos agroindustriais, inclusive porosidade do sistema e relação C/N, e seus efeitos na produção de esporos por *T. harzianum*. Interessantemente, dentre os melhores resultados obtidos, a porosidade do sistema encontrava-se em uma faixa estreita entre 58 – 65 %. Em contrapartida, a relação C/N divergia-se muito entre uma biomassa e outra. Fato este, que pode ser um indicativo da importância da porosidade do leito em FES, especialmente se utilizado como variável de escalonamento de processo.

Portanto, a combinação de diferentes biomassas pode conferir efeitos sinérgicos quando combinados em proporções ideais. Estes resultados mostram, indiretamente, que meios sólidos compostos por diferentes proporções das biomassas geraram não apenas

diâmetros médios diferentes, mas como também causaram diferentes compactações no meio sólido. Estas compactações podem favorecer o acesso aos nutrientes pelo contato íntimo com a biomassa. Assim, além de trazerem efeitos bioquímicos no quesito nutricional, conferiram também efeitos físico-químicos, realizando uma maior difusão gasosa, melhorando a adesão do fungo no substrato sólido e aumentando a transferência de massa entre os componentes do sistema.

5.3.2 FES em Embalagens de Polietileno

O fungo *T. harzianum* se apresenta como um microrganismo originariamente do solo, colonizador de rizosfera e possui comportamento endofítico. Desta forma, seu processo de esporulação pode ser induzido através da incidência de luz (Meyer et al., 2019). A produção em larga escala de conídios deste fungo, geralmente, é conduzida em salas fermentativas especializadas, nas quais fotoperíodos de 12 horas são programados para mimetizar seu habitat natural. Com o intuito de se aproximar das condições de processos industriais da produção de esporos de *Trichoderma*, foi preparado um suporte adaptativo, encontrado na Figura 31A, no qual lâmpadas LED branca foram instaladas, possibilitando observar o efeito da luz na FES.

A composição do meio de cultivo foi escolhida de acordo com os melhores resultados obtidos através da seleção dos substratos feita no tópico 5.3.1. Desta forma, partindo da composição 50/25/25 % (m/m) (FA/BCA/CA) preparou-se 2 meios distintos definidos por M1 e M2, onde em M1 utilizou-se a proporção 70/15/15 % (m/m) e M2 manteve-se com a proporção mencionada de 50/25/25 % (m/m). Como o FA teve um efeito marcante na colonização do fungo na biomassa, foi escolhido aumentar a proporção de FA a fim de se averiguar qual seria o efeito resultante na produção dos esporos.

O processo foi escalonado para 10 g de biomassa seca, os quais foram inoculados com 1 mL de uma solução de esporos preparada de $8,5 \times 10^6$ esporos/ mL. O recipiente de fermentação escolhido foi embalagens plásticas de Polietileno de Alta Densidade (PEAD). Os resultados obtidos deste ensaio, podem ser encontrados na Figura 32.



Figura 31. Etapas no processo de FES pelo *T. harzianum* conduzida em embalagens plásticas autoclaváveis de Polietileno de alta densidade. (A) Estufa microbiológica + Luzes LED; (B) Meio de cultivo fermentado e pigmentado em verde; (C) Meio de cultivo após a extração dos esporos com uma solução salina de 0,9 % (m/m) NaCl e 0,1 % (v/v) Tween 80.

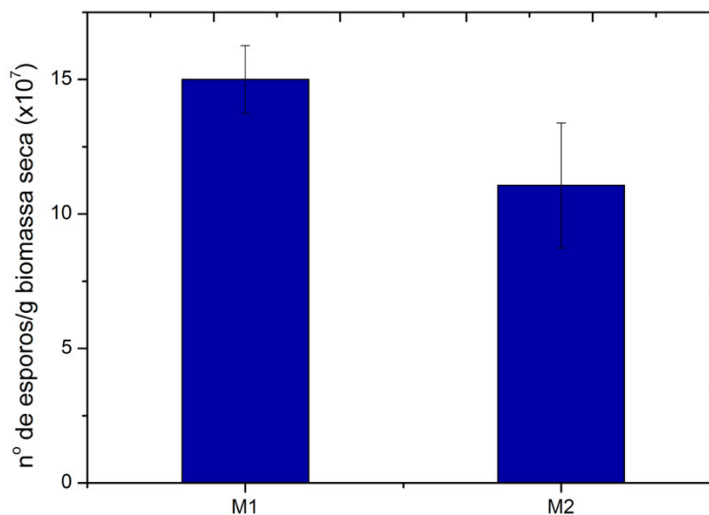


Figura 32. Contagem dos esporos ao final de 7 dias de FES utilizando os meios de cultivo M1 e M2. M1 consiste em 70/15/15 % (m/m) (FA/BCA/CA %) e M2 50/25/25 % (m/m). Os experimentos foram realizados em duplicatas e os resultados expressos a partir da média dos ensaios.

Nota-se que após 7 dias de fermentação o meio de cultivo foi completamente colonizado pelo fungo, o que pode observado pela presença da coloração esverdeada devido à pigmentação presente nos esporos (Figura 31B). Após a extração dos mesmos, o meio M1 rendeu uma quantidade de $1,5 \times 10^8$ esporos/g biomassa seca, enquanto M2 rendeu $1,11 \times 10^8$ esporos/ g biomassa seca. Notou-se um aumento de 30% na quantidade de esporos obtidas através do meio M1 com respeito ao meio M2, evidenciando mais uma vez o papel importante em que FA desempenha durante este processo fermentativo. Para averiguar de maneira mais sistemática os motivos pelos quais o aumento da proporção de FA está induzindo uma maior taxa de esporulação, futuras análises nutricionais de FA serão conduzidas, visando definir, portanto, a relação C/N e os tipos de carboidratos presente em sua biomassa. Com relação ao uso da luz é possível mencionar que os seus respectivos efeitos na indução de esporulação podem ter sido pouco significativos uma vez que os ensaios obtidos em fermentação no escuro resultaram em quantidades de esporos similares.

É possível observar na Figura 31C que parte dos esporos produzidos ficam aderidos a biomassa, dificultando sua recuperação. Os círculos vermelhos (Figura 31C) demarcam alguns locais onde os esporos ficam aderidos e, por fim, não são contabilizados ao final. Diante disto, é válido dizer que a quantificação de esporos está sendo subestimada, podendo, afirmar que $1,5 \times 10^8$ esporos/g de biomassa seca é a quantidade mínima presente na biomassa fermentada.

À critérios comparativos, outros autores também realizaram FES visando a produção de conídios e outros metabólitos. Os seus resultados estão resumidos na Tabela 17.

Além da quantificação de esporos, o *Trichoderma* spp. pode apresentar a síntese de diversos outros metabólitos secundários, como auxina (fito hormônio) e pironas (6pencil- α -pirona/ 6-PP) e, enzimas como proteases, celulasas, glucanases e lipases. Todos estes compostos são de grande interesse da indústria de alimentos, agricultura como promotores de crescimento e controle biológico e de bioprocessos em geral. Evidentemente, as condições ideais para cada metabólito podem variar, portanto, é de grande importância identificar quais são os compostos alvo e como obtê-los através de FES.

Neste sentido, nota-se que uma série de parâmetros e condições de processo foram avaliadas (Tabela 17), dentre elas aeração, umidade, composição nutricional de cultivo, agitação e configuração de biorreator. Rayhane et al. (2019) avaliaram o efeito de diferentes tipos de biorreatores com respeito ao índice de esporulação, produção de enzimas e 6-PP. Notavelmente, os melhores resultados procederam de ensaios conduzidos em embalagens plásticas de polietileno, seguido do desempenho em coluna Raimbault e por fim em frascos.

Uma possível explicação para isso reside no fato de que em embalagens plásticas, as condições ideais para o crescimento e produção de metabolitos pelo fungo, sendo temperatura, umidade e nutrição, foram mais eficientemente controladas, causando um efeito positivo dos resultados. É válido mencionar que, neste mesmo estudo, aeração forçada no sistema mostrou-se significativa com respeito a produção de celulasas e amilases, enquanto para a produção de lipases, oxigenação do sistema teve efeito negligenciável.

Tabela 17. Resumo dos resultados obtidos através de FES para a produção de conídios e metabolitos secundários de *Trichoderma* spp. por diferentes autores.

Espécie	Modo de Operação	Aeração	Substrato	N° de esporos	Referência
<i>T. harzianum</i> CECT 2929	Reator 0,5 L	+	CA	2,0 x 10 ⁹ / g biomassa	Sala et al. (2020)
<i>T. asperellum</i> TF1	Embalagens Plásticas	+	Polpa de Oliva	8,55 x 10 ⁹ / g biomassa	Rayhane et al. (2019)
<i>T. harzianum</i> M1	500 mL Erlenmeyer	-	Grama/Farelo de trigo/FA	5,9 x 10 ⁹ / g biomassa	Ming et al. (2019)
<i>T. lixii</i> TvR1	500 mL Erlenmeyer	-	BCA	2,0 x 10 ⁸ / g biomassa	Sachdev et al. (2018)
<i>T. harzianum</i> CECT 2929	Reator 22 L – Batelada sequencial	+	CA/ Resíduo de cervejaria	2,0 x 10 ⁹ / g biomassa	Sala et al. (2021)
<i>T. harzianum</i> CECT 2929	Reator 0,5 L	+	Diversos subprodutos agroindustriais	5,0 x 10 ⁹ / g biomassa	Sala et al. (2021B)
<i>T. harzianum</i> Ts1	Frascos Erlenmeyer	-	Farelo de trigo/ Palha de Milho	1,49 x 10 ¹⁰	Zhang et al. (2014)
<i>T. harzianum</i> KSNM	Frascos Erlenmeyer	-	Palha/ Farelo/ Grão de Trigo	1,69 x 10 ⁸ / g biomassa	Mishra; Sundari (2017)
<i>T. harzianum</i> IRDT22C	Coluna Raimbault	+	BCA/Farelo de trigo/ Farinha de Batata	8,9 x 10 ⁹ / g biomassa	Cruz-Quiroz et al. (2018)
<i>T. harzianum</i> CCT 2160	Embalagens PEAD	-	FA/BCA/CA	1,5 x 10⁸/ g biomassa	<u>Presente</u>

Em termos comparativos, nos ensaios conduzidos no atual trabalho contabilizou-se uma produção de conídios de 1,55 x 10⁸ (esporos/ g biomassa) sem aplicação de aeração e

controle de umidade, trazendo uma perspectiva de possíveis melhorias para que o processo atinja maiores magnitudes produtivas. Neste sentido, os resultados que mais se aproximaram deste trabalho foram os de Mishra e Sundari (2017), no qual foi obtido uma quantidade final de esporos de $1,69 \times 10^8$ /g biomassa seca. Além disso, ainda é necessário conduzir ensaios para análises qualitativas de enzimas, identificação de metabolitos do interesse agrícola e, posteriormente, escalonar o processo para maiores volumes de processamento sem haver perdas significativas na produtividade.

Outros trabalhos mencionados avaliaram possíveis estratégias para o escalonamento do processo de FES. Nesta instancia, Sala et al. (2021) conduziram um estudo de escalonamento de processo partindo de um biorreator em FES de 10 L para um biorreator de 22 L utilizando uma estratégia de bateladas sequenciais. A estratégia consiste na reutilização de parte da biomassa fermentada em uma consecutiva fermentação em reatores em série. Para isso, foi avaliado o efeito do nível de aeração e diferentes proporções de C/N. A partir da melhor condição obtida, foi observado que a porosidade do sistema influenciou na passagem de ar e transferência de oxigênio para o meio sólido, afetando diretamente o desempenho de crescimento do fungo, sendo, portanto, definida como parâmetro chave para o escalonamento do processo. Outros parâmetros também foram avaliados com respeito aos seus efeitos em FES, no entanto, nenhum se mostrou mais preponderante do que o tipo de empacotamento do sistema.

Estratégias de escalonamento são de fundamental importância para biorrefinarias e, embora FES seja um processo pratico e barato, sua baixa difusão no mercado deve-se por conta da sua dificuldade de ampliação de escala. No caso do fungo *T. harzianum*, há inúmeros metabolitos com potencia interesse de diferentes mercados. Portanto, é possível afirmar que haja um longo caminho a ser percorrido para que processos robustos de produção de esporos e metabolitos sejam consolidados e difundidos em larga escala em biorrefinarias modernas.

5.3.3 Composição Química do Biofertilizante à base de *T. harzianum* (BTh)

O biofertilizante à base de *T. harzianum* (BTh) foi caracterizado quantitativamente em sua composição química de elementos básicos, suas propriedades físico-químicas foram aferidas e o extrato de proteínas secretadas pelo fungo também foi avaliado qualitativamente a partir da metodologia de gel de proteínas SDS-PAGE. Os resultados se encontram na Figura 33 e Tabela 18. Acerca, é possível notar que a biomassa lignocelulósica fermentada

pelo fungo *T. harzianum* apresentou coloração esverdeada devido à presença dos esporos fúngicos pigmentados. Isto é uma característica dos produtos à base de *Trichoderma* spp. Este produto, nomeado de BTh foi produzido e reservado para as análises de crescimento vegetal as quais estão descritas adiante no tópico 5.5.

Tabela 18. Composição Química, biológica e propriedades físico-químicas do biofertilizante BTh

Principais Compostos e Características	Biofertilizante
Proteínas	11 mg/g biomassa vegetal
Aminoácidos	0,136 mg/g biomassa vegetal
Lipídeos	3 mg/g biomassa vegetal
Açúcares Totais	9,7 mg/g biomassa vegetal
Fenólicos	1,76 mg/g biomassa vegetal
Condutividade	1213 μ S/cm (25°C)
pH	6,8
Esporos	1,15 x 10 ⁸ esporos/g biomassa vegetal

Optou-se por manter o bioproduto BTh em sólido a fim de se obter um maior tempo de prateleira, o que é vantajoso em termos tecno-econômicos. Desta forma, mantém-se a integridade dos esporos os quais não sofreram interferência de umidade e poderão se manter ativos por mais tempo. Assim, os esporos foram capazes de germinar mesmo após um período de incubação de 8 meses em refrigerador à 4°C. No entanto, ensaios de viabilidade celular ainda são necessários para confirmar a exata proporção de viabilidade que se obtém ao longo do tempo de estocagem.

Este fungo em questão, como foi mencionado durante o tópico 2.3.1 é conhecido por sua versatilidade enzimática e seu potencial colonizador de rizosfera, isto faz com que seja sempre um grande candidato a ser utilizado em associação com plantas e sua respectiva microbiota. Seus efeitos variam desde, proteção e controle biológico a até mesmo indução do sistema imune e promoção de crescimento a partir da produção e regulação metabólica da produção de fitohormônios por plantas, como é o caso da enzima ACC deaminase excretada pelo fungo (Haran *et al.*, 1996; Rauf *et al.*, 2021).

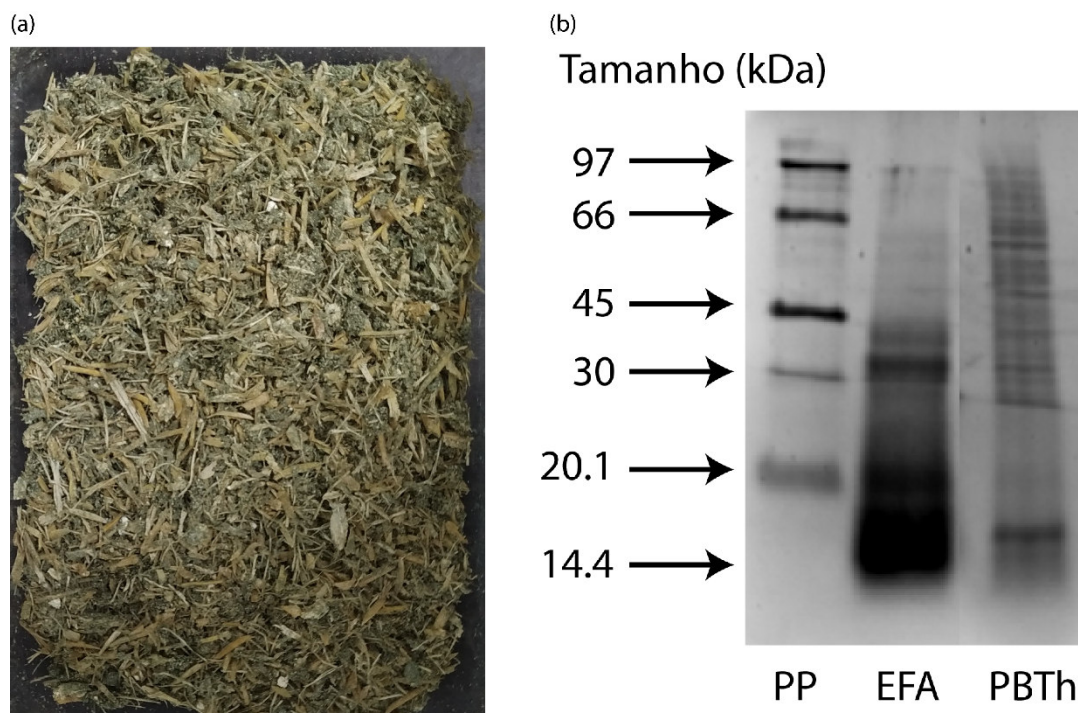


Figura 33. Biofertilizante à base do fungo *T. harzianum*. (a) Meio sólido fermentado pelo fungo *T. harzianum* após cultivo de 10 dias e seco em estufa à 40°C por 48 horas. (b) Gel SDS-PAGE de proteínas excretadas pelo fungo ao longo de seu cultivo em estado sólido, onde PBTh: Proteínas presentes no biofertilizante à base de *T. harzianum*; EFA: proteínas presentes no extrato do farelo de arroz; PP: padrão de proteínas.

As marcações de proteínas extracelulares secretadas pelo fungo *T. harzianum* após um cultivo de 10 dias (Figura 33b) em estado sólido apresentaram uma diversidade considerável de bandas de proteínas as quais podem ser localizadas, majoritariamente entre os tamanhos 30 ao 97 kDa, entre 14 a 30 kDa as bandas localizadas podem estar relacionadas às proteínas do próprio EFA, o qual também apresentou tais bandas em seu espectro no gel. Diversos trabalhos encontrados na literatura reportam a identificação e caracterização de enzimas como por exemplo, quitinases (exoquitinases, endoquitinases e 1,4- β -N-acetilglicosaminidases), β -glucanases, proteases e entre outras. Neste sentido, por meio da mesma metodologia de gel SDS-PAGE implementada neste estudo, outros autores encontraram a presença de quitinases na faixa de 30 – 120 kDa, β -glucanases entre 30 – 80 kDa e, ACC deaminases em 37 kDa, resultados os quais podem variar sob função das condições de cultivo e espécie de *Trichoderma* implementada (Haran et al., 1996; Viterbo et al., 2010).

Salienta-se que outras análises de sequenciamento e de atividades enzimáticas são necessárias para que seja designado as respectivas proteínas ou enzimas em específico foram

secretadas e, desta forma, apontar o maior potencial do fungo em relação aos seus efeitos promotores de crescimento em plantas.

Acerca da Tabela 18, foi possível quantificar algumas classes de moléculas que estão presentes em BTh, dentre elas, destaca-se a quantidade de proteínas em torno de 11 mg/g de biomassa vegetal e, corroborando com o gel de proteínas que mostrou a sua vasta variedade em um espectro de tamanhos diferentes. A presença de grupos fenólicos (1,76 mg/g biomassa vegetal) também pode apresentar um determinado efeito fertilizante uma vez que podem servir como precursores de fitohormônios e sinalizadores de outros processos bioquímicos; estes mesmo grupos de moléculas, são possivelmente, derivados do próprio EFA como também do metabolismo do fungo. Outros tipos de moléculas como os aminoácidos (0,136 mg/g biomassa vegetal), lipídeos (3 mg/g biomassa vegetal) e açúcares totais (9,7 mg/g biomassa vegetal) também podem realizar um efeito de fertilização indireto, fazendo com que outros microrganismos consigam se proliferar no solo e conferindo uma maior troca de nutrientes. Ademais, ressalta-se que estes efeitos também podem ser negativos, possibilitando a colonização de microrganismos fito patogênicos, como mencionados no tópico 2.1.

A condutividade de BTh quando ressuspendido em solução aquosa apresentou um valor de 1213 $\mu\text{S}/\text{cm}$ indicando que, possivelmente, também há a dissociação de íons, fato este, que pode conferir, em determinada extensão, a fertilização de plantas e do solo, disponibilizando íons e eletrólitos livres para o metabolismo vegetal que serão assimilados através de um transporte apoplástico pelas raízes.

O valor obtido de pH também está conforme o esperado para o metabolismo de fungos, que oposto as leveduras e bactérias tendem a aumentar o pH do meio de cultivo suplementado, além disso, também se encontra dentro da faixa ideal para a implementação em cultivos de plantas que, em sua grande maioria, apresentam faixa de crescimento ótimo entre pH 5,5 até 7. Por fim, a quantidade de esporos reside aproximadamente em $1,15 \times 10^8$ esporos/g biomassa vegetal que pode e deve ser diluído antes de ser aplicado no cultivo de plantas. Quantidades altas de esporos podem acarretar efeitos adversos e indesejados, como por exemplo, uma hiper indução do sistema imune em plantas e, em consequência, um baixo crescimento vegetativo.

5.4 Análise de Biocompatibilidade Entre os Soforolipídeos e o Crescimento do Fungo *T. harzianum*

A análise de biocompatibilidade dos bioprodutos sintetizados neste trabalho foi realizada a partir de duas metodologias, sendo que ambas consistiram em cultivar o fungo *T. harzianum* tanto em meios submersos quanto em estado sólido. Escolheu-se metodologias distintas visando avaliar os diferentes efeitos dos SLs perante ao crescimento e produção de esporos do fungo. Neste sentido, o meio submerso foi utilizado com o intuito de avaliar o crescimento de biomassa enquanto que o meio sólido foi implementado para que fosse avaliado a produção de esporos. Este último, por se aproximar mais da realidade do crescimento do fungo, poder-se-ia ter um panorama mais fidedigno ao comportamento metabólico e esporulação do fungo no solo. Além disso, em outra perspectiva, sabendo que os produtos sólidos, ausentes de água livre no sistema, possuem um maior tempo de prateleira, considerou-se pertinente examinar o comportamento em estado sólido na presença de SLs.

Por outro lado, o meio de cultivo submerso possui maior homogeneização e maior transferência de massa, desta forma, os SLs estão mais acessíveis ao metabolismo do fungo e em contato com sua membrana, isso faz com que se obtenha uma resposta mais clara e direta da influência dos SLs no crescimento do fungo. Evidentemente, as mudanças na membrana celular do fungo causadas pelos SLs, que poderiam variar desde modificação de hidrofobicidade, permeabilidade, fluidez (tópico 2.2.5.2) até o aumento da secreção de metabólitos, enzimas e suas respectivas atividades, não podem ser constatadas por meio deste método simplista. Todavia, neste momento, mostrou-se suficiente e eficaz em avaliar a toxicidade e biocompatibilidade dos SLs associados ao fungo. Ademais, os resultados de atuais podem ser encontrados na Tabela 19 e, o cultivo de *T. harzianum* em meio submerso pode ser encontrado na Figura 34.

A partir dos dados obtidos dos ensaios conduzidos em cultivo submerso, é possível perceber que até mesmo concentrações altas de SL não foram capazes de atingir a concentração mínima inibitória (CI₅₀), a qual é atingida a partir de 50% de inibição com respeito às condições ideais de crescimento do fungo. Isto permite mostrar que há biocompatibilidade dos SLs produzidos pela levedura *S. bombicola* Y-6419 no crescimento do fungo *T. harzianum*. Afora, é possível observar na Figura 34 que os frascos suplementados com SLs apresentaram uma divergência de coloração após o cultivo, o que pode estar associado as alterações na superfície de membrana e do metabolismo em si do fungo fazendo

com que outros metabólitos fossem secretados. Ainda, nota-se também a presença das células de coloração branca ao fundo dos frascos.

Tabela 19. Ensaio de biocompatibilidade do crescimento do fungo *T. harzianum* em cultivo submerso suplementado com diferentes concentrações de SLs e cultivo em estado sólido suplementado com 0,15 g/L de SLs

Ensaio	Biomassa celular (g)	Biomassa normalizada (%)	Inibição normalizada (%)
Fermentação			
Submersa			
SL (0,46 g/L)	0,135 ± 0,01 ^{ab}	76	24
SL (1,0 g/L)	0,121 ± 0,02 ^b	68	32
SL (2,0 g/L)	0,122 ± 0,02 ^{ab}	68	31
Controle	0,177 ± 0,02 ^a	100	-
Fermentação em Estado Sólido			
	Índice de Esporulação (x10⁷ esporos/mL)		
SL (0,150 g/L)	7,44±0,81 ^a		
Controle	5,71±0,14 ^b		

^{a,b}- representam os fatores categóricos de significância em teste Tukey com intervalo de confiança de p<0,05

Acerca das concentrações de SLs utilizada, destaca-se que formulações contendo concentrações tão elevadas de SLs não devem ser empregadas em cultivos de plantas (como será visto ao longo do tópico 5.5) e, portanto, elas foram utilizadas neste momento ensejando identificar os limites de concentrações que poderiam ser implementadas em conjunto com o fungo.

Em relação aos ensaios em estado sólido, notou-se que o fungo foi capaz de crescer e esporular, tanto no controle (5,71 ± 0,144 x 10⁷ esporos/mL) quanto no meio suplementado com biossurfactante (7,44 ± 0,81 x 10⁷ esporos/mL), mostrando que o metabolismo reprodutivo do fungo não foi afetado pela presença do SLs (Tabela 19). Não apenas o fungo *T. harzianum* não foi afetado negativamente pela ação do biossurfactante, como a adição do mesmo proporcionou uma maior esporulação, confirmada com a realização de teste Tukey (p < 0,05) de significância. Há algumas hipóteses para tal resultado; inicialmente, presume-se que a presença do SLs facilitou o acesso das hifas do fungo aos nutrientes presentes na biomassa devido a alterações na tensão superficial entre os sólidos e a água presentes no

sistema, propiciando um maior contato entre o substrato e a parede celular do fungo. Além disso, presume-se também que o biossurfactante realiza uma alteração na hidrofobicidade da parede celular microbiana, proporcionando condições facilitadas de transporte intermembranas e com o meio externo, o que está possivelmente atrelado a um aumento de atividade enzimática das proteínas excretadas.

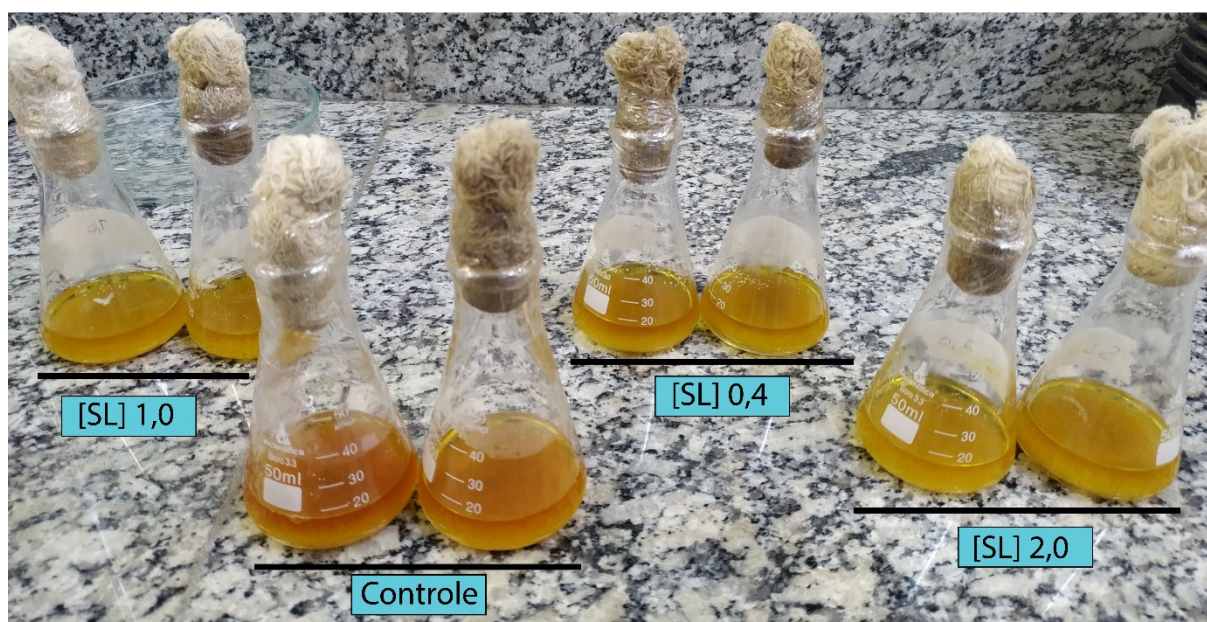


Figura 34. Meio de cultivo submerso do fungo *T. harzianum* suplementado com diferentes concentrações de SLs.

Existem muitos trabalhos na literatura, inclusive o desenvolvimento de muitas patentes envolvendo os BSs, bem como também os SLs em formulações antimicrobianas, antifúngicas e pesticidas (tópico 2.4.1). Posto isso, os ensaios de biocompatibilidade demonstraram, de maneira contra intuitiva, que é possível integrar os efeitos provenientes do metabolismo do fungo *T. harzianum* CCT 2160 aos dos SLs sintetizados pela levedura *S. bombicola* Y-6419.

Apesar disso, encontrou-se pertinentes trabalhos nos quais houveram algumas descobertas interessantes revolvendo este tema. O trabalho de Piegza et al. (2021) avalia a capacidade de fungos do gênero *Trichoderma* spp., inclusive da espécie *T. harzianum*, de secretar extracelularmente surfactantes, além de analisar a natureza química de tais biossurfactantes. Contudo, os surfactantes produzidos pelo *T. harzianum*, conforme revelado no referido documento, são lipopeptídeos. Lipopeptídeos são usualmente encontrados em fungos e bactérias, fazem parte dos seus mecanismos de defesa e sinalização celular e podem estar ancorados a membranas ou serem excretados ao meio extracelular.

A título de comparação, os lipopeptídeos se diferem estruturalmente, biologicamente e, físico-quimicamente dos soforolipídeos, sendo este o biossurfactante utilizado na presente invenção. Além disso, apesar de diversas moléculas poderem possuir efeito tensoativo (como proteínas, glicoproteínas, lipopolissacarídeos e, inclusive, lipopeptídeos), os seus efeitos biológicos não são necessariamente os mesmos, podendo ser benéficos ou danosos às plantas. Diversos microrganismos produzem biossurfactantes de determinada classificação e, apesar de expressarem este metabolismo, podem ser inibidos por outros tipos de biossurfactantes. Por exemplo, algumas espécies de *Bacillus* sp. produzem certos tipos de lipopeptídeos e podem ser inibidos por SLs ou raminolipídeos (de Rienzo et al., 2015; Díaz de Rienzo et al., 2016; Debelke et al., 2016).

Foi constatado também um grande potencial de SLs em inibir o crescimento de fungos envolvidos na putrefação de alimentos, entre eles os fungos filamentosos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Rhizopus* spp. (Hipólito et al., 2020). Analogamente, o artigo de Kumari et al. (2021) revela a atividade antifúngica de SLs produzidos por *Metschnikowia churdharensis*. Conforme revelado no referido documento, foram obtidas respostas positivas contra os fungos *Fusarium oxysporum* (MTCC 9913), *Fusarium solani* (MTCC 350) e *Colletotrichum gloeosporioides* (MTCC 2190).

Alfian et al. (2022) descrevem o uso da levedura *Starmerella riodocensis* para a produção de SLs, que foram aplicados em ensaios antimicrobianos contra a levedura *Candida albicans*, a qual se apresenta como uma levedura oportunista para o humano (Theberge et al., 2013). Os resultados apontaram um grande potencial inibidor dos SLs (500 – 1000 mg/L) contra a formação de hifas da levedura, que foram observadas após 5 horas de cultivo. Já para a formação de biofilme, foi constatada uma concentração de 500 mg/L de SLs necessária para inibir em 50% de biofilmes em estágio maduro de formação (após 24 horas). Por sua vez, Caretta et al. (2021) reportam a realização de ensaios antimicrobianos contra potenciais fitopatógenos da cultura de tomates, entre eles, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*, utilizando soforolipídeos derivados de *S. bombicola*. Após a aplicação dos SLs em concentração de 2 g/L às plantas infectadas, foi possível observar uma redução de 96% no caso de contaminações do tipo *Botrytis cinerea*.

É com base nestes pontos abordados que se pretende ascender o seguinte questionamento, muitos dos microrganismos mencionados acima são potenciais fitopatógenos e, muitos foram inibidos pela atividade dos SLs, salvo o fungo *T. harzianum*, que

também se apresenta como um potencial controlador biológico e promotor de crescimento de vegetais. Neste sentido, a integração entre SLs, o fungo e seus derivados metabólitos é ensejada com a premissa de se potencializar os efeitos adversos de ambos quando em associação com plantas e aplicados no cultivo. Portanto, atinge-se, neste momento, um ponto crítico fundamentalista da invenção tecnológica – a viabilidade de utilização dos bioprodutos no crescimento efetivo de plantas – e, assim, inicia-se o próximo e último tópico com as formulações feitas a partir dos bioprodutos, separadamente, e suas respectivas misturas, aplicando-as em ensaios germinativos e de crescimento vegetal de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.).

5.5 Ensaios Germinativos e Crescimento Vegetal

5.5.1 Formulações Envolvendo SLs e o Biofertilizante à base de *T. harzianum*

Os bioinsumos formulados estão dispostos na Tabela 20 e suas respectivas faixas de concentrações estão contidas entre 0,1 a 1,0 g/L para os SLs e, entre 1×10^4 a 1×10^6 esporos/mL para os BThs. Suas combinações entre si, também se encontram nas mesmas faixas aplicadas.

Tabela 20. Composição das formulações desenvolvidas a partir dos bioprodutos sintetizados pela levedura *S. bombicola* Y-6419 e pelo fungo *T. harzianum*. Sendo, SL: soforolipídeos; BTh: biofertilizante à base de *T. harzianum*; SLT: mistura entre SLs e BTh.

Ensaio	SLs (g/L)	BTh (esporos/mL)
SL1	0,100 – 0,150	0
SL2	0,400 – 0,500	0
SL3	1,0 – 1,1	0
BTh1	0	1×10^6 – 5×10^6
BTh2	0	1×10^5 – 5×10^5
BTh3	0	1×10^4 – 5×10^4
SLT1	0,100 – 0,150	1×10^4 – 5×10^4
SLT2	0,100 – 0,150	1×10^6 – 5×10^6
Controle (H ₂ O)	0	0

5.5.2 Análises dos Parâmetros Morfológicos das Plântulas de *Oryza sativa* L.

A quantidade de sementes germinadas foi contabilizada a cada 24 horas e os resultados presentes na Tabela 21 foram reportados em porcentagem de germinação (%) com respeito ao número total de sementes para cada tratamento. Ao final dos 10 dias de ensaio, os tamanhos de caule e raiz foram medidos com o auxílio de um paquímetro e a quantidade de raízes foi contabilizada para cada tratamento realizado com as formulações. A colonização das raízes pelo fungo *T. harzianum* CCT 2160 e; a influência dos SLs na geração de raízes secundárias foi verificada a partir de microscopias com um microscópio digital, ilustrada pela Figura 35.

A partir dos resultados provenientes dos ensaios germinativos indicados na Tabela 19, nos quais foram aplicados os bioprodutos desenvolvidos, nota-se que, ao compará-los com o controle (H₂O) foi possível observar uma melhora em todos os aspectos analisados, exceto em alguns casos (e.g. ensaios SL3 e BTh3), nos quais obteve-se uma queda no tamanho de raiz e número de raízes. Sobretudo, é válido salientar, portanto, os resultados obtidos nos ensaios SL1, SL2, BTh1, BTh2 e SLT2, nos quais foram obtidos altos índices de germinação, bem como também foi possível observar alto desenvolvimento de raízes laterais.

Tabela 21. Resultados referentes a aplicação dos bioprodutos nos ensaios germinativos das sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e suas respectivas respostas morfológicas quantitativas.

Ensaio	Índice de Germinação (%)	Biomassa seca (mg/semente)	Tamanho de Raíz	Tamanho de Caule	No. de Raízes
SL1	95 ± 2,12	23,5 ± 1,22	6,0 ± 1,85	4,6 ± 1,42	5,3 ± 1,60
SL2	87 ± 0,70	22,1 ± 1,45	4,8 ± 2,26	4,0 ± 1,89	4,0 ± 1,98
SL3	91 ± 0,70	24,0 ± 1,80	0,7 ± 0,46	3,7 ± 1,45	1,4 ± 1,11
BTh1	85 ± 2,12	21,8 ± 0,90	5,2 ± 2,44	3,6 ± 1,68	3,7 ± 1,85
BTh2	87 ± 2,12	21,1 ± 0,38	5,2 ± 2,45	3,5 ± 1,71	4,0 ± 2,09
BTh3	76 ± 0,0	19,0 ± 0,13	4,4 ± 2,91	3,2 ± 2,12	3,2 ± 2,28
SLT1	89 ± 2,12	23,0 ± 2,8	5,2 ± 2,63	3,7 ± 1,84	3,3 ± 1,70
SLT2	84 ± 0,0	21,0 ± 1,04	4,3 ± 2,55	3,5 ± 1,94	2,8 ± 1,67
Controle (H ₂ O)	81 ± 0,70	19,8 ± 0,31	4,7 ± 2,84	3,6 ± 2,02	3,8 ± 2,37

As raízes laterais auxiliam as plantas no acesso a nutrientes, água e sinalização molecular, sendo este último fenômeno responsável pelas respostas bióticas das plantas quando associadas à microbiota e também responsável por obter sinais moleculares, dos quais derivam-se respostas imunológicas. Afora, o recrutamento e modificação da

comunidade presente na rizosfera, em específico dos fungos micorrizos, também é, em grande extensão influenciada pela presença de metabólitos secundários ou exudatos provenientes das raízes dos vegetais (Dang et al., 2021).

Ressalta-se, ainda, nos melhores ensaios índices de germinação de até 95%, enquanto para os ensaios realizados com o controle (H_2O) obteve-se um índice de 81%. Isso mostra que os bioprodutos aplicados surtiram efeitos benéficos no processo germinativo, bem como quebra de dormência da semente de arroz. No que diz respeito à biomassa seca das sementes, ensaios com os bioprodutos mostraram até 18% de aumento comparado ao controle, indicando um possível aumento nas atividades fisiológicas da planta. Na análise quantitativa de aspectos morfológicos da planta, como o tamanho de caule, raiz e quantidade de raízes laterais, pode-se observar um aumento de até 27%, 26% e 38%, respectivamente, quando os bioprodutos foram aplicados em suas concentrações adequadas e comparados ao ensaio controle.

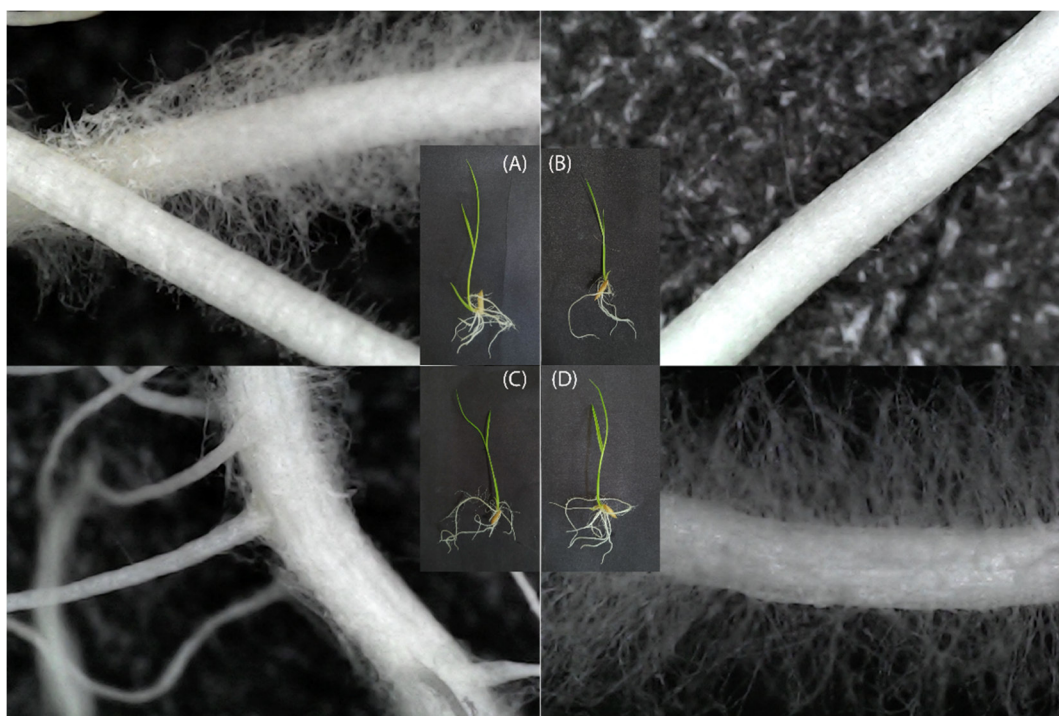


Figura 35. Análise microscópica das raízes da plântula de arroz após 10 dias de crescimento em uma incubadora BOD à 25°C e fotoperíodo de 12 horas, na qual as sementes provenientes do ensaio (a) SL1, (b) controle, (c) BTh1 e, (d) SLT1.

5.5.3 Cinética de Germinação

A Figura 36 mostra a cinética de germinação das sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) ao longo de um período de 7 dias. Neste período, as sementes foram contabilizadas uma vez ao dia e os resultados reportados sendo o acúmulo de sementes germinadas. Dos resultados, nota-se que nos ensaios SL1, SL2 e BTh1 obteve-se uma maior velocidade de germinação comparado aos outros no regime inicial (até 2 dias). Entre o período de 2 a 4 dias, os ensaios em sua grande maioria se assemelharam entre si em termos de quantidade de sementes germinadas e velocidade de germinação, salvo BTh1 e BTh3 dos quais exibiu-se o menor vigor. Ao passo que mais sementes foram germinadas, atingiu-se uma fase estacionária, onde a atividade germinativa diminuiu.

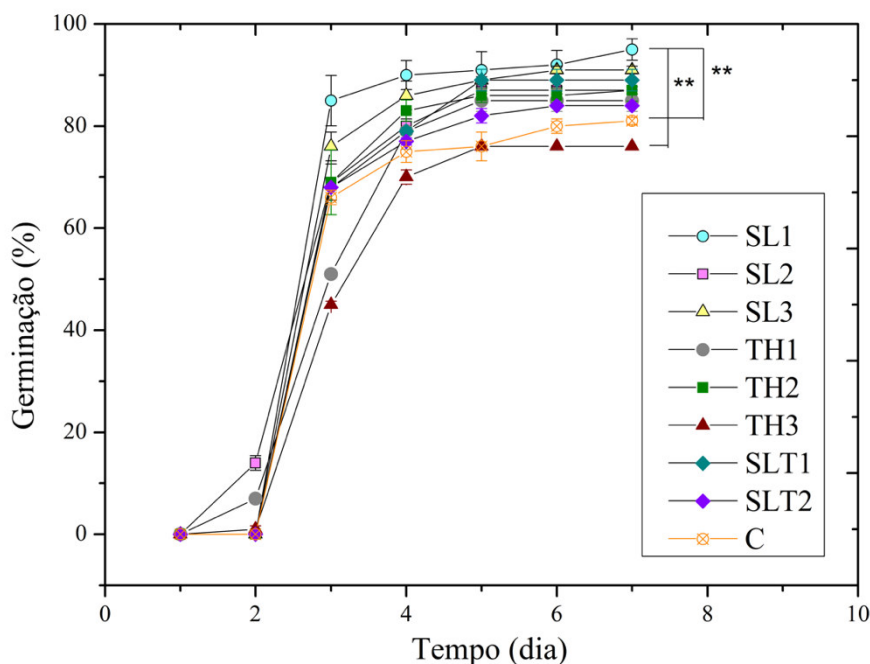


Figura 36. Cinética de germinação das sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) perante à aplicação dos bioprodutos (representados pelos símbolos e cores ao lado direito do gráfico) durante um período de 7 dias em uma incubadora BOD à 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Os ensaios codificados por SL são a respeito da aplicação dos SLs, BTh os ensaios da aplicação do biofertilizante à base de *T. harzianum*., os ensaios SLT dizem respeito à aplicação conjunta dos bioprodutos e, C representa o controle (H₂O).

Interessante notar que o tratamento com a condição BTh3 (10⁶ esporos/mL) causou uma diminuição no índice germinativo em relação ao controle, isso mostra que cargas altas de esporos da espécie *T. harzianum* CCT 2160 não foram benéficas à germinação e ao crescimento dos brotos. Em controversa, em um estudo realizado por Doni et al. (2014) encontrou-se um melhor índice, velocidade e vigor de germinação quando sementes de arroz

foram tratadas com 10^7 esporos/mL de diferentes espécies de *Trichoderma* spp. Isto demonstra que a aplicação de bioprodutos deve ser cautelosa com respeito ao tipo de microrganismo e biomolécula a ser implementada. Ainda, a propagação de maiores quantidades de esporos do *T. harzianum* CCT 2160, pode ter inibido o crescimento das sementes devido, possivelmente, a uma competição pelo oxigênio, água livre no sistema, bem como também à própria atividade fisiológica de crescimento do fungo aderido às cascas da semente.

Sobre este efeito, é conhecido que o fungo *Trichoderma* spp. possui alta atividade catalítica com relação à síntese e excreção de enzimas do tipo β -glucanases e, portanto, uma carga fúngica mais elevada pode ter intensificado também a concentração dessas enzimas, neste sentido, isso pode ter prejudicado a própria duplicação celular da semente de arroz. Ademais, não houve deformação da gema apical, cotilédone e tecidos adjacentes devido às contaminações secundárias causadas pelo fungo, corroborando que o fungo não agiu a nível de transcrição celular e sua diferenciação.

Adiante, o tratamento SL1 demonstrou alto potencial na promoção de germinação, tanto e velocidade quanto em quantidade. Disso, nota-se que os SLs possuem uma atividade intutora de crescimento e de quebra de dormência. Presume-se que seja possível um aumento da atividade enzimática nos estágios iniciais de germinação das sementes devido à interação entre os SLs e a membrana celular. Nesta interação, há a mudança de hidrofobicidade das sementes e, na permeabilidade de membrana aumentando o contato com o oxigênio, facilitando a difusão de água e excreção de enzimas. Ressalta-se também os tratamentos nos quais foram aplicados ambos bioprodutos em conjunto. Por exemplo, em SLT1 a velocidade de germinação se assemelhou à velocidade obtida com o tratamento SL1, possivelmente devido ao efeito do biossurfactante. Em SLT2, a carga celular foi de aproximadamente 10^6 esporos/mL e, embora esta carga fosse prejudicial à germinação e ao crescimento, os SLs atenuaram este efeito, fazendo com que os ensaios fossem ainda melhores em comparação ao controle. Isto evidencia o efeito bioprotetor dos SLs quando associados às raízes e, conseqüentemente, à rizosfera.

A dissertação de mestrado de Silva (2014) avaliou o efeito do tratamento de sementes de *Lactuca sativa* (alface), *Zea mays* (milho), *Glycine max* (soja) e *Helianthus annuus* (girassol) com raminolipídeos sintetizados pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1. Foi evidenciado neste trabalho que todos os resultados, salvo aqueles procedidos com as sementes de *G. max* demonstraram boas respostas à aplicação dos raminolipídeos no que diz respeito ao índice de germinação. Em contrapartida, notou-se alguns efeitos indesejados no

crescimento das plântulas de *L. sativa*, a qual apresentou embora melhores índices germinativos e massa seca, menor crescimento das raízes. Efeitos adversos a respeito de massa seca e crescimento de raízes não apenas esteve ausente nas outras espécies como também foram melhorados nos ensaios conduzidos com o tratamento de raminolipídeos em todas as concentrações testadas, com exceção dos testes realizados nas plântulas de *Z. max* na faixa de 0,075 – 0,1% (m/v) dos quais observou-se uma diminuição do índice de germinação, bem como tamanho de raiz e massa seca relativamente menores quando comparado ao controle feito com apenas água destilada.

Diante disto, salienta-se, novamente, que é possível obter resultados negativos, como também foi aferido pela atual dissertação e, as faixas de concentração devem ser devidamente estabelecidas conforme há o desenvolvimento do bioproduto. Um estudo fundamentado em evidências empíricas se torna transparente ao potencial usuário do produto e, à própria ética científica. Os biopromotores e protetores do cultivo vegetal podem e devem ser utilizados com cautela, de maneira que perdure seus efeitos benéficos e que seus mecanismos sejam utilizados diante de uma avaliação meticulosa do caso do cultivo e dos seus potenciais efeitos de tratamento da microbiota do solo.

6 CONCLUSÕES

O processo sistêmico-epistemológico para o desenvolvimento de bioprodutos, especificamente, bioinsumos agrícolas exibiu-se complexo e subordinado a diferentes fatores e variáveis, que não obstante se fazem impreteríveis para que se obtenha um produto robusto, eficaz e sustentável. Neste sentido, sobretudo, há de se salientar a notável biocompatibilidade do fungo *T. harzianum* CCT 2160 com os SLs provenientes da levedura *S. bombicola* Y-6419, este ponto foi, de fato, apesar de elucidado por meio de ensaios experimentais simples, imprescindível para a continuidade do trabalho e formulação dos bioinsumos que foram submetidos à patente tecnológica. É evidente que, com maior embasamento e um *background* prático a ordem dos experimentos realizados seria outra. Apesar disso, não se anula o fato que os processos anteriores às análises de biocompatibilidade serviram de grande ajuda ao crescimento inflacionário dos conceitos e práticas científicas conduzidas em anteposição, as quais, fortunadamente, geraram publicações em periódicos de grande impacto e engrandecimento tanto pessoal quanto profissional.

Outros resultados de grande importância, se dão na utilização de diversos subprodutos agroindustriais como matéria-prima ou fontes nutricionais para a biossíntese das moléculas destacadas ao longo desta dissertação. Sendo assim, o extrato do farelo de arroz como uma fonte alternativa de nitrogênio em combinação com óleo de cozinha residual possibilitou um aumento de até 6 vezes mais na produção de SLs em comparação com meios sintéticos. Isso se deve ao fato de que, além do extrato de farelo de arroz ser uma fonte alternativa de proteínas, também se apresenta como uma fonte de cofatores enzimáticos e de micronutrição e, deste modo, pode induzir o metabolismo de SLs. Não obstante, os materiais lignocelulósicos como a casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar não apenas serviram de matéria-prima nas fermentações em estado sólido do fungo *T. harzianum* CCT 2160. Estes mesmos materiais também auxiliaram no processo de secagem dos SLs biossintetizados pela levedura *S. bombicola* Y-6419, demonstrando serem promissores adjuvantes de secagem renováveis e ecológicos. Este mesmo processo entrou também como escopo de reivindicação da submissão à patente tecnológica apresentada.

O terceiro marco de grande estima, discorre sobre ensaios de germinação e crescimento das plântulas de *Oryza sativa* L., nos quais foi possível observar relevantes melhoras no crescimento das raízes, aumento de massa seca e no índice germinativo por meio da aplicação tanto dos SLs quanto do BTh. Acerca, é válido ressaltar também que

análises futuras serão realizadas com o objetivo de examinar o efeito do bioprodutos na saúde e recrutamento da microbiota da rizosfera, bem como seus efeitos bioprotetores contra pragas e bioestimuladores do sistema imune de plantas. Este último marco, mostrou-se também imprescindível na elucidação do efeito tóxico das biomoléculas aplicadas, neste sentido, avaliou-se as faixas de concentrações suscetíveis a favováveis respostas durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

Outros marcos, não menos importantes e, tampouco menos trabalhosos, residem nas otimizações dos bioprocessos de fermentação dos microrganismos utilizados, as quais exibiram grande avanço para o laboratório em relação ao melhoramento de produção e aproveitamento da utilização de subprodutos. Ainda, sobre os bioprodutos sintetizados, serão realizadas análises mais detalhadas de suas composições e, desta forma, abrindo margem para o planejamento de formas de cultivo que propiciem a biossíntese de outras biomoléculas de interesse agrícola.

Por fim, diante dos resultados apresentados ainda há algumas ressalvas a serem feitas que passam por pretensões experimentais e fenomenológicas a serem elucidadas, futuramente. Ademais, pode-se obter formulações diferentes do bioinsumo que continuará se desenvolvendo, agregando outros grupos de pesquisa ao passo que outras propriedades são examinadas, outras biomoléculas com potenciais aditivas nas formulações, bem como outras parceiras e laboratórios que poderão subsidiar as técnicas e conhecimentos necessários para se melhorar a formulação no seu manuseio e, tanto em seus efeitos biológicos quanto em suas propriedades físico-químicas.

REFERÊNCIAS

- Abu Yazid, N., Barrena, R., Komilis, D., & Sánchez, A., 2017. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. *Sustainability*, 9(2), 224. <https://doi.org/10.3390/su9020224>
- Adetunji, C. O., Jeevanandam, J., Inobeme, A., Olaniyan, O. T., Anani, O. A., Thangadurai, D., Islam, S., 2021. Application of biosurfactant for the production of adjuvant and their synergetic effects when combined with different agro-pesticides. In *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science* (pp. 255-277). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823380-1.00006-X>
- AGROSTAT, Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. Balança Comercial do Agronegócio. <http://indicadores.agricultura.gov.br/>.
- Akhtar, N., Gupta, K., Goyal, D., Goyal, A., 2016. Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(2), 489-511. <https://doi.org/10.1002/ep.12257>
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., Maier, R. M., 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3262-3268. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3262-3268.2000>
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., Heulin, T., 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3393-3398. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000>
- Albrecht, A., Rau, U., Wagner, F. 1996. Initial steps of sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. *Applied microbiology and biotechnology*, 46, 67-73. <https://doi.org/10.1007/s002530050784>
- Alcon, A., Santos, V. E., Casas, J. A., García-Ochoa, F., 2004. Use of flow cytometry for growth structured kinetic model development: Application to *Candida bombicola* growth. *Enzyme and microbial technology*, 34(5), 399-406. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.016>
- Alfian, A. R., Watchputi, K., Sooklim, C., Soontorngun, N., 2022. Production of new antimicrobial palm oil-derived sophorolipids by the yeast *Starmerella riodocensis* sp. nov. against *Candida albicans* hyphal and biofilm formation. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01852-y>
- Almeida, D. G., Soares da Silva, R. D. C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., Sarubbo, L. A., 2017. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. *Frontiers in microbiology*, 8, 157. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00157>
- Anderson, B. S., Phillips, B. M., Hunt, J. W., Worcester, K., Adams, M., Kapellas, N., Tjeerdema, R. S., 2006. Evidence of pesticide impacts in the Santa Maria River watershed, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(4), 1160-1170. <https://doi.org/10.1897/05-231R.1>

Ashby, R. D., Solaiman, D. K., 2019. Sophorolipids: Unique microbial glycolipids with vast application potential. In *Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications* (pp. 28-55). CRC Press.

Ashby, R. D., McAloon, A. J., Solaiman, D. K., Yee, W. C., Reed, M., 2013. A process model for approximating the production costs of the fermentative synthesis of sophorolipids. *Journal of surfactants and detergents*, 16(5), 683-691. <https://doi.org/10.1007/s11743-013-1466-0>

Ashby, R. D., Solaiman, D. K., Foglia, T. A., 2008. Property control of sophorolipids: influence of fatty acid substrate and blending. *Biotechnology letters*, 30, 1093-1100. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9653-1>

Ashby, R. D., Solaiman, D. K., Foglia, T. A., 2006. The use of fatty acid esters to enhance free acid sophorolipid synthesis. *Biotechnology letters*, 28, 253-260. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-5527-y>

Ashok, A., Doriya, K., Rao, D. R. M., Kumar, D. S., 2017. Design of solid state bioreactor for industrial applications: an overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.014>

Asmer, H. J., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. (1988). Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 1460-1466. <https://doi.org/10.1007/BF02898308>

Baccile, N., Babonneau, F., Jestin, J., Pehau-Arnaudet, G., Van Bogaert, I., 2012. Unusual, pH-induced, self-assembly of sophorolipid biosurfactants. *ACS nano*, 6(6), 4763-4776. <https://doi.org/10.1021/nn204911k>

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>

Bajaj, V. K., Annapure, U. S., 2015. Castor oil as secondary carbon source for production of sophorolipids using *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069. *Journal of Oleo Science*, 64(3), 315-323. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14214>

Baker, K. F., Cook, R. J., 1974. *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company.

Baldotto, L. E. B., Baldotto, M. A., Olivares, F. L., Viana, A. P., Bressan-Smith, R., 2010. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34, 349-360. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000200008>

Ballardo, C., Abraham, J., Barrena, R., Artola, A., Gea, T., Sánchez, A., 2016. Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties. *Journal of environmental management*, 169, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.12.029>

Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L. Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 427-444. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>

Barbosa, F. G., Ribeaux, D. R., Rocha, T., Costa, R. A., Guzmán, R. R., Marcelino, P. R., Silva, S. S. D., 2022. Biosurfactants: Sustainable and Versatile Molecules. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 33, 870-893. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220074>

- Barcelos, G. S., Dias, L. C., Fernandes, P. L., Fernandes, R. D. C. R., Borges, A. C., Kalks, K. H., Tótolá, M. R., 2014. Spray drying as a strategy for biosurfactant recovery, concentration and storage. *SpringerPlus*, 3, 1-9. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-49>
- Bhangale, A. P., Wadekar, S. D., Kale, S. B., Pratap, A. P., 2014. Sophorolipids synthesized using non-traditional oils with glycerol and studies on their surfactant properties with synthetic surfactant. *Tenside Surfactants Detergents*, 51(5), 387-396. <https://doi.org/10.3139/113.110320>
- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, 60, 379-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Bowtell, J. L., Bruce, M., 2002. Glutamine: an anaplerotic precursor. *Nutrition*, 18(3), 222-224. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00795-X](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00795-X)
- Brenneis, R., Baeck, B., Kley, G., 2004. Alcoholysis of waste fats with 2-ethyl-1-hexanol using *Candida antarctica* lipase A in large-scale tests. *European journal of lipid science and technology*, 106(12), 809-814. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200401051>
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F. M., Palmquist, J., Jin, H., 2018. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360(6393), 1126-1129. DOI: 10.1126/science.aar4142
- Canilha, L., Carvalho, W., Rocha, G. J. M., Almeida e Silva, J. B., Giuliatti, M., 2007. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. *Bioquímica e Biotecnologia*. Associação Brasileira de Química-ABQ.
- Carneiro, B. C.; Conversão de bagaço de cana-de-açúcar em biossurfactante por *Aureobasidium pullulans* LB83 utilizando fermentação em estado sólido. 2019. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019
- Casas, J. A., de Lara, S. G., Garcia-Ochoa, F., 1997. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzyme and microbial technology*, 21(3), 221-229. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00038-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00038-0)
- Casas, J., Garcia-Ochoa, F., 1999. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88(5), 488-494. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87664-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87664-1)
- Cavalcante, J. J. V., Vargas, C., Nogueira, E. M., Vinagre, F., Schwarcz, K., Baldani, J. I., Hemerly, A. S., 2007. Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 673-686. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl242>
- Cavalero, D. A., Cooper, D. G., 2003. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Journal of biotechnology*, 103(1), 31-41. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00067-1)
- Celar, F., 2003. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. *Biological Control*, v. 28(1), p. 19-24. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00049-5)
- Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, D. A., Pan, X., Saddler, J. N., 2007. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. *Biofuels*, 67-93.

Chen, Y., Nai, X., Li, M., Kong, J., Hao, S., Yan, H., Liu, J., 2021. A comprehensive research on Lactone Sophorolipid (LSL) and Soy Protein Isolate (SPI) interacting mixture. *Journal of Molecular Liquids*, 339, 117239. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117239>

Ciesielska, K., Van Bogaert, I. N., Chevneau, S., Li, B., Groeneboer, S., Soetaert, W., Devreese, B., 2014. Exoproteome analysis of *Starmerella bombicola* results in the discovery of an esterase required for lactonization of sophorolipids. *Journal of Proteomics*, 98, 159-174. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.12.026>

Ciesielska, K., Roelants, S. L., Van Bogaert, I. N., De Waele, S., Vandenberghe, I., Groeneboer, S., Devreese, B., 2016. Characterization of a novel enzyme—*Starmerella bombicola* lactone esterase (SBLE)—responsible for sophorolipid lactonization. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 9529-9541. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7633-2>

Cooper, D. G., Goldenberg, B. G., 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53(2), 224-229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>

Copping, L. G., Menn, J. J., 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 56(8), 651-676. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200008\)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200008)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U)

Cusano, A. M., Burlinson, P., Deveau, A., Vion, P., Uroz, S., Preston, G. M., Frey-Klett, P., 2011. *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 type III secretion mutants no longer promote ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental microbiology reports*, 3(2), 203-210. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00209.x>

da Penha, M. P., Rocha-Leão, M. H. M. D., Leite, S. G. F., 2019. Freeze-Drying of 6-Pentyl- α -Pyrone Produced by *Trichoderma harzianum* IOC4042 in Solid State Fermentation. *Industrial Biotechnology*, 15(4), 256-262. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0033>

Daltin, D., 2011. *Tensoativos: química, propriedades e aplicações*. Editora Blucher

Daniel, H. J., Reuss, M., Syldatk, C., 1998. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Biotechnology Letters*, 20, 1153-1156. <https://doi.org/10.1023/A:1005332605003>

Daverey, A., Pakshirajan, K., 2010. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 79(1), 246-253. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.04.002>

Daverey, A., Pakshirajan, K., 2009. Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Applied biochemistry and biotechnology*, 158, 663-674. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8449-z>

Davila, A. M., Marchal, R., Monin, N., Vandecasteele, J. P., 1993. Identification and determination of individual sophorolipids in fermentation products by gradient elution high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 648(1), 139-149. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83295-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83295-4)

Davila, A. M., Marchal, R., Vandecasteele, J. P., 1994. Sophorose lipid production from lipidic precursors: predictive evaluation of industrial substrates. *Journal of Industrial Microbiology*, 13, 249-257. <https://doi.org/10.1007/BF01569757>

- Davila, A. M., Marchal, R., Vandecasteele, J. P., 1997. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Applied microbiology and biotechnology*, 47, 496-501. <https://doi.org/10.1007/s002530050962>
- de França, S. K. S., Cardoso, A. F., Lustosa, D. C., Ramos, E. M. L. S., de Filippi, M. C. C., da Silva, G. B., 2015. Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 317-324. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0244-3>
- De Graeve, M., De Maeseneire, S. L., Roelants, S. L., Soetaert, W., 2018. *Starmerella bombicola*, an industrially relevant, yet fundamentally underexplored yeast. *FEMS yeast research*, 18(7), foy072. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy072>
- De la Cruz-Quiroz, R., Roussos, S., Aguilar, C. N., 2018. Production of a biological control agent: Effect of a drying process of solid-state fermentation on viability of *Trichoderma* spores. *Int. J. Green Tech*, 4, 1-6.
- de O Caretta, T., I Silveira, V. A., Andrade, G., Macedo Jr, F., PC Celligoi, M. A., 2022. Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(3), 1245-1254. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11462>
- de Oliveira, J. P., Bruni, G. P., Lima, K. O., El Halal, S. L. M., da Rosa, G. S., Dias, A. R. G., da Rosa Zavareze, E., 2017. Cellulose fibers extracted from rice and oat husks and their application in hydrogel. *Food chemistry*, 221, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.048>
- De Rienzo, M. A. D., Banat, I. M., Dolman, B., Winterburn, J., Martin, P. J., 2015. Sophorolipid biosurfactants: possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New biotechnology*, 32(6), 720-726. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.009>
- Debnath, S., Chakraborty, G., Dutta, S. S., Chaudhuri, S. R., Das, P., Saha, A. K., 2020. Potential of *Trichoderma* species as biofertilizer and biological control on *Oryza sativa* L. cultivation. *Biotechnol. Veg*, 20(1), 1-16.
- Debye, P., Anacker, E. W., 1951. Micelle shape from dissymmetry measurements. *The Journal of Physical Chemistry*, 55(5), 644-655.
- Delbeke, E. I. P., Movsisyan, M., Van Geem, K. M., Stevens, C. V. (2016). Chemical and enzymatic modification of sophorolipids. *Green Chemistry*, 18(1), 76-104. <https://doi.org/10.1039/C5GC02187A>
- Della, V. P., Hotza, D., Junkes, J. A., Oliveira, A. P. N. D., 2006. Comparative study of silica obtained from acid leaching of rice husk and the silica obtained by thermal treatment of rice husk ash. *Quimica Nova*, 29, 1175-1179. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600005>
- Dengle Pulate, V., Bhagwat, S., Prabhune, A., 2013. Microbial oxidation of medium chain fatty alcohol in the synthesis of sophorolipids by *Candida bombicola* and its physicochemical characterization. *Journal of Surfactants and Detergents*, 16, 173-181. <https://doi.org/10.1007/s11743-012-1378-4>
- Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., Schlichting, I., 2005. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical reviews*, 105(6), 2253-2278. <https://doi.org/10.1021/cr0307143>

Desai, J. D., Banat, I. M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1), 47-64. <https://doi.org/10.1128/membr.61.1.47-64.1997>

Deshpande, M., Daniels, L., 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresource technology*, 54(2), 143-150. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00116-6](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00116-6)

Develter, D. W., Lauryssen, L. M., 2010. Properties and industrial applications of sophorolipids. *European journal of lipid science and technology*, 112(6), 628-638. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900153>

Díaz De Rienzo, M. A., Stevenson, P., Marchant, R., Banat, I. M., 2016. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 363(2). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv224>

Dolman, B. M., Kaisermann, C., Martin, P. J., Winterburn, J. B., 2017. Integrated sophorolipid production and gravity separation. *Process Biochemistry*, 54, 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.021>

Dolman, B. M., Wang, F., Winterburn, J. B., 2019. Integrated production and separation of biosurfactants. *Process Biochemistry*, 83, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.002>

Doni, F., Anizan, I., Radziah, C. C., Salman, A. H., Rodzihan, M. H., Yusoff, W. M. W., 2014. Enhancement of Rice Seed Germination and Vigour by " *Trichoderma*" spp. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, 7(21), 4547-4552.

Dubois, M. et al. Phenol sulfuric total sugar. *Anal Chem*, v. 28, p. 350-356, 1956.

Egelhaaf, S. U., Müller, M., Schurtenberger, P., 1998. Size determination of polymer-like micelles using cryo-electron microscopy. *Langmuir*, 14(16), 4345-4349. <https://doi.org/10.1021/la971370c>

Elad, Y., 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 719-732. <https://doi.org/10.1007/BF01877146>

Ewart, K. V., Lin, Q., Hew, C. L., 1999. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55, 271-283. <https://doi.org/10.1007/s000180050289>

FAO, Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO). Pesticides Use. www.fao.org.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Sustainable Food and Agriculture. www.fao.org.

Fleurackers, S. J., 2006. On the use of waste frying oil in the synthesis of sophorolipids. *European journal of lipid science and technology*, 108(1), 5-12. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500237>

Flores-Gallegos, A. C., Nava-Reyna, E., 2019. Plant growth-promoting microbial enzymes. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 521-534). Academic Press

Gao, R., Falkeborg, M., Xu, X., Guo, Z., 2013. Production of sophorolipids with enhanced volumetric productivity by means of high cell density fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 1103-1111. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4399-z>

- Gibbs, J. W., 1928. The collected works of J. Willard Gibbs, volume I: thermodynamics. Yale University Press
- Göbbert, U., Lang, S., Wagner, F., 1984. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnology Letters*, 6, 225-230. <https://doi.org/10.1007/BF00140041>
- Gorin, P. A. J., Spencer, J. F. T., Tulloch, A. P., 1961. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. *Canadian Journal of Chemistry*, 39(4), 846-855. <https://doi.org/10.1139/v61-104>
- Gowthaman, M. K., Krishna, C., Moo-Young, M., 2001. Fungal solid state fermentation—an overview. *Applied mycology and biotechnology*, 1, 305-352. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(01\)80014-9](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(01)80014-9)
- Guilmanov, V., Ballistreri, A., Impallomeni, G., Gross, R. A., 2002. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Biotechnology and bioengineering*, 77(5), 489-494. <https://doi.org/10.1002/bit.10177>
- Hanson, L. E., Howell, C. R., 2002. Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. *Mycological Research*, 106(3), 321-328. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005592>
- Haran, S., Schickler, H., Chet, I., 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142(9), 2321-2331. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-9-2321>
- Hipólito, A., da Silva, R. A. A., de Oliveira Caretta, T., Silveira, V. A. I., Amador, I. R., Panagio, L. A., Celligoi, M. A. P. C., 2020. Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101797. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101797>
- Hirata, Y., Ryu, M., Oda, Y., Igarashi, K., Nagatsuka, A., Furuta, T., Sugiura, M., 2009. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *Journal of bioscience and bioengineering*, 108(2), 142-146. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.03.012>
- Holloway, P. J., Rees, R. T., Stock, D. (Eds.), 2013. Interactions between adjuvants, agrochemicals and target organisms (Vol. 12). Springer Science & Business Media
- Hu, X., Subramanian, K., Wang, H., Roelants, S. L., To, M. H., Soetaert, W., Chopra, S. S., 2021. Guiding environmental sustainability of emerging bioconversion technology for waste-derived sophorolipid production by adopting a dynamic life cycle assessment (dLCA) approach. *Environmental Pollution*, 269, 116101. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116101>
- Hu, Y., Ju, L. K., 2001. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *Journal of biotechnology*, 87(3), 263-272. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00248-6)
- Hua, Z., Chen, J., Lun, S., Wang, X., 2003. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water research*, 37(17), 4143-4150. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00380-4)
- Imura, T., Masuda, Y., Minamikawa, H., Fukuoka, T., Konishi, M., Morita, T., Kitamoto, D., 2010. Enzymatic conversion of diacetylated sophoroselipid into acetylated glucoselipid: surface-active properties of novel bolaform biosurfactants. *Journal of oleo science*, 59(9), 495-501.

Imura, T., Kawamura, D., Morita, T., Sato, S., Fukuoka, T., Yamagata, Y., Kitamoto, D., 2013. Production of sophorolipids from non-edible jatropha oil by *Stamerella bombicola* NBRC 10243 and evaluation of their interfacial properties. *Journal of oleo science*, 62(10), 857-864.

Inglis, G. D., Sigler, L., Goette, M. S., 1993. Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile rotundata*). *Microbial ecology*, 26, 125-143. <https://doi.org/10.1007/BF00177048>

Ji, X. J., Huang, H., Nie, Z. K., Qu, L., Xu, Q., Tsao, G. T., 2011. Fuels and chemicals from hemicellulose sugars. *Biotechnology in China III: biofuels and bioenergy*, 199-224. DOI: 10.1007/10_2011_124

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>

Jiménez-Peñalver, P., Koh, A., Gross, R., Gea, T., Font, X., 2020. Biosurfactants from waste: structures and interfacial properties of sophorolipids produced from a residual oil cake. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(2), 481-486. <https://doi.org/10.1002/jsde.12366>

Kaczorek, E., 2012. Effect of External Addition of Rhamnolipids Biosurfactant on the Modification of Gram Positive and Gram Negative Bacteria Cell Surfaces during Biodegradation of Hydrocarbon Fuel Contamination. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(4).

Kaczorek, E., Pacholak, A., Zdarta, A., Smulek, W., 2018. The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase. *Colloids and Interfaces*, 2(3), 35. <https://doi.org/10.3390/colloids2030035>

Kallimanis, A., Frillingos, S., Drainas, C., Koukkou, A. I., 2007. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Applied microbiology and biotechnology*, 76, 709-717. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1036-3>

Karbassi, F., Haghbeen, K., Saboury, A. A., Ranjbar, B., Moosavi-Movahedi, A. A., 2003. Activity, structural and stability changes of mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 32(2), 137-143. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00153-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00153-X)

Karimi, K., Kheradmandinia, S., Taherzadeh, M. J., 2006. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 30(3), 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.11.015>

Khan, J., Ooka, J. J., Miller, S. A., Madden, L. V., Hoitink, H. A. J., 2004. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against *Phytophthora* crown rot and leaf blight. *Plant Disease*, 88(3), 280-286. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.3.280>

Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmad, A., Ali, S. M., Khan, A. U., 2009. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, 14(2), 586-597. <https://doi.org/10.3390/molecules14020586>

KIM, H. S., KIM, Y. B., LEE, B. S., KIM, E. K., 2005. Sophorolipid production by *Candida bombicola* ATCC 22214 from a corn-oil processing byproduct. *Journal of microbiology and biotechnology*, 15(1), 55-58.

- Kim, K., Dalsoo, Y., Youngbum, K., BAEKSEOK, L., DOONHOON, S., Eun-Ki, K. I. M., 2002. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent. *Journal of microbiology and biotechnology*, 12(2), 235-241.
- Kim, Y. B., Yun, H. S., Kim, E. K., 2009. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. *Bioresource technology*, 100(23), 6028-6032. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.053>
- Konishi, M., Fukuoka, T., Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D., 2008. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *Journal of oleo science*, 57(6), 359-369.
- Konishi, M., Yoshida, Y., Horiuchi, J. I., 2015. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(3), 317-322. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.08.007>
- Kosaric, N., Sukan, F. V. (Eds.), 2014. *Biosurfactants: production and utilization—processes, technologies, and economics (Vol. 159)*. CRC press
- Krawczyńska, M., Kolwzan, B., Rybak, J., Gediga, K., Shcheglova, N. S., 2012. The Influence of Biopreparation on Seed Germination and Growth. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(6).
- Kumar, A., Singh, S. K., Kant, C., Verma, H., Kumar, D., Singh, P. P., Kumar, M., 2021. Microbial biosurfactant: a new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants*, 10(9), 1472. <https://doi.org/10.3390/antiox10091472>
- Kumari, A., Kumari, S., Prasad, G. S., Pinnaka, A. K., 2021. Production of Sophorolipid biosurfactant by insect derived novel yeast *Metschnikowia churdharensis* fa, sp. nov., and its antifungal activity against plant and human pathogens. *Frontiers in microbiology*, 12, 678668. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678668>
- Kurtzman, C. P., Price, N. P., Ray, K. J., Kuo, T. M., 2010. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. *FEMS microbiology letters*, 311(2), 140-146. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02082.x>
- Lachance, M. A., Wijayanayaka, T. M., Bundus, J. D., Wijayanayaka, D. N., 2011. Ribosomal DNA sequence polymorphism and the delineation of two ascospore yeast species: *Metschnikowia agaves* and *Starmerella bombicola*. *FEMS yeast research*, 11(4), 324-333. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00718.x>
- Lamb, C. D. C., Silva, B. M. Z. D., de Souza, D., Fornasier, F., Riça, L. B., Schneider, R. D. C. D. S., 2018. Bioethanol production from rice hull and evaluation of the final solid residue. *Chemical Engineering Communications*, 205(6), 833-845. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1422495>
- Lang, S., BRAKEMEIER, A., HECKMANN, R., SPÖCKNER, S., RAU, U., 2000. Production of native and modified sophorose lipids. *Chimica oggi*, 18(10), 76-79.
- Lavanya, M. N., Venkatachalapathy, N., Manickavasagan, A., 2017. Physicochemical characteristics of rice bran. *Brown rice*, 79-90. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59011-0_5
- Lehr, C. M., Bouwstra, J. A., Kok, W., Noach, A. B., de Boer, A. G., Junginger, H. E., 1992. Bioadhesion by means of specific binding of tomato lectin. *Pharmaceutical research*, 9, 547-553. <https://doi.org/10.1023/A:1015804816582>
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., Moëgne-Loccoz, Y., 2017. Let the core microbiota be functional. *Trends in Plant Science*, 22(7), 583-595. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.008>

- Li, F., Zhu, L., 2014. Surfactant-modified fatty acid composition of *Citrobacter* sp. SA01 and its effect on phenanthrene transmembrane transport. *Chemosphere*, 107, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.016>
- Li, J., Chikindas, M. L., Ludescher, R. D., Montville, T. J., 2002. Temperature-and surfactant-induced membrane modifications that alter *Listeria monocytogenes* nisin sensitivity by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5904-5910. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5904-5910.2002>
- Li, J., Xia, C., Fang, X., Xue, H., Song, X., 2016. Identification and characterization of a long-chain fatty acid transporter in the sophorolipid-producing strain *Starmerella bombicola*. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(16), 7137-7150. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7580-y>
- Lin, W., Liu, S., Tong, L., Zhang, Y., Yang, J., Liu, W., Dang, Z., 2017. Effects of rhamnolipids on the cell surface characteristics of *Sphingomonas* sp. GY2B and the biodegradation of phenanthrene. *RSC advances*, 7(39), 24321-24330. DOI: 10.1039/C7RA02576A
- Liu, Z., Tian, X., Chen, Y., Lin, Y., Mohsin, A., Chu, J., 2019. Efficient sophorolipids production via a novel in situ separation technology by *Starmerella bombicola*. *Process Biochemistry*, 81, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.005>
- Lonsane, B. K., Saucedo-Castaneda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N. P., Krishnaiah, M. M., 1992. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry*, 27(5), 259-273. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)85011-P](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)85011-P)
- Luna, J. M., Rufino, R. D., Sarubbo, L. A., Campos-Takaki, G. M., 2013. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 102, 202-209. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.008>
- Ma, X., Li, H., Song, X., 2012. Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576. *Journal of colloid and interface science*, 376(1), 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.03.007>
- Ma, X., Meng, L., Zhang, H., Zhou, L., Yue, J., Zhu, H., Yao, R., 2020. Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 77-100. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10247-w>
- Ma, Z., Liu, J., Dick, R. P., Li, H., Shen, D., Gao, Y., Ling, W., 2018. Rhamnolipid influences biosorption and biodegradation of phenanthrene by phenanthrene-degrading strain *Pseudomonas* sp. Ph6. *Environmental Pollution*, 240, 359-367. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.125>
- 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>
- Marcelino, P. R. F., Peres, G. F. D., Terán-Hilares, R., Pagnocca, F. C., Rosa, C. A., Lacerda, T. M., 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, 212-223. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.001>
- Marchal, R., Lemal, J., Sulzer, C., Davila, A. M., 1999. U.S. Patent No. 5,900,366. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office

- Margaritis, A., Zajic, J. E., Gerson, D. F., 1979. Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(7), 1151-1162. <https://doi.org/10.1002/bit.260210706>
- Martínez Angel, J. D., Pineda Vásquez, T. G., Junkes, J. A., Hotza, D., 2009. Characterization of ash from combustion of rice husk in a fluidized bed reactor. *Química Nova*, 32, 1110-1114. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500006>
- Mascarin, G. M., Jaronski, S. T., 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-26. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Mastouri, F., Björkman, T., Harman, G. E., 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), 1213-1221. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0091>
- McBain, J. W., 1913. Mobility of highly-charged micelles. *Trans. Faraday Soc.*, 9, 99-101.
- McGenity, T. J., Timmis, K. N., Fernández, B. N. (Eds.), 2016. *Hydrocarbon and lipid microbiology protocols*. Springer.
- McIntosh, S., Vancov, T., 2010. Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource technology*, 101(17), 6718-6727. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.116>
- Meyer, M. C.; Mazaro, S. M.; da Silva, J. C. *Trichoderma: uso na agricultura*. 1. ed. Brasília: Embrapa soja, 2019.
- Ming, S., Rong, J., Zhang, C., Li, C., Zhang, C., Zhang, Y., Li, G., 2019. The solid fermentation state's optimization of *Trichoderma Harzianum* M1. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 612, No. 2, p. 022111). IOP Publishing. DOI 10.1088/1757-899X/612/2/022111
- Minucelli, T., Ribeiro-Viana, R. M., Borsato, D., Andrade, G., Cely, M. V. T., de Oliveira, M. R., Celligoi, M. A. P. C., 2017. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. *Waste and biomass valorization*, 8(3), 743-753. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9592-3>
- Mishra, N., Sundari, K., 2017. Designing low cost SSF strategy for mass production of bioinoculant *Trichoderma harzianum* KSNM with longer shelf life. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 18, 447-458.
- Mohanty, S., Mukherji, S., 2013. Surfactant aided biodegradation of NAPLs by *Burkholderia multivorans*: comparison between Triton X-100 and rhamnolipid JBR-515. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 644-652. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.064>
- Monnier, N., Furlan, A. L., Buchoux, S., Deleu, M., Dauchez, M., Rippa, S., Sarazin, C., 2019. Exploring the dual interaction of natural rhamnolipids with plant and fungal biomimetic plasma membranes through biophysical studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1009. <https://doi.org/10.3390/ijms20051009>
- Monnier, N., Furlan, A., Botcazon, C., Dahi, A., Mongelard, G., Cordelier, S., Rippa, S., 2018. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* are elicitors triggering *Brassica napus* protection

against *Botrytis cinerea* without physiological disorders. *Frontiers in Plant Science*, 1170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01170>

Moongngarm, A., Daomukda, N., Khumpika, S., 2012. Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. *Apcbee Procedia*, 2, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.014>

Morya, V. K., Park, J. H., Kim, T. J., Jeon, S., Kim, E. K., 2013. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. *Bioresource technology*, 143, 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.094>

Mukerjee, P.; Mysels, K. J., 1971. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems. National Standard reference data system

Mulqueen, P., 2003. Recent advances in agrochemical formulation. *Advances in colloid and interface science*, v. 106(1-3), p. 83-107.

Murínová, S., Dercová, K., Čertík, M., Lászlová, K., 2014. The adaptation responses of bacterial cytoplasmic membrane fluidity in the presence of environmental stress factors—polychlorinated biphenyls and 3-chlorobenzoic acid. *Biologia*, 69(4), 428-434. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0337-0>

Naughton, P. J., Marchant, R., Naughton, V., Banat, I. M., 2019. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of applied microbiology*, 127(1), 12-28. <https://doi.org/10.1111/jam.14243>

Nikzad, M., Movagharnejad, K., Talebnia, F., Aghaiy, Z., Mighani, M., 2015. Modeling of alkali pretreatment of rice husk using response surface methodology and artificial neural network. *Chemical Engineering Communications*, 202(6), 728-738. <https://doi.org/10.1080/00986445.2013.871707>

Ogawa, S., Ota, Y., 2000. Influence of exogenous natural oils on the ω -1 and ω -2 hydroxy fatty acid moiety of sophorose lipids produced by *Candida bombicola*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64, 2466-2468. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.2466>

Oliveira, L.R.M. Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose. 2012. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J., Rinzema, A., 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, 18(8), 356-360. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01466-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01466-9)

Otto, R. T., Daniel, H. J., Pekin, G., Müller-Decker, K., Fürstenberger, G., Reuss, M., Syldatk, C., 1999. Production of sophorolipids from whey: II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, 52, 495-501. <https://doi.org/10.1007/s002530051551>

Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S. S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 633-654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>

Palme, O., Comanescu, G., Stoineva, I., Radel, S., Benes, E., Develter, D., Lang, S., 2010. Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle

manipulation. *European journal of lipid science and technology*, 112(6), 663-673. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900163>

Pandey, A., Soccol, C. R., Larroche, C. (Eds.), 2008. *Current developments in solid-state fermentation*. Springer Science & Business Media

Pandey, A., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., Nigam, P. S. N., 2001. "Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications" Reference Book

Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process biochemistry*, 35(10), 1153-1169. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)

Pang, P. K., Poppe, L., Szakacs, G., Ibrahim, C. O., 2006. Xylanase production by a local isolate, *Trichoderma* spp. FETL c3-2 via solid state fermentation using agricultural wastes as substrates. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), 7-14.

Paula, L. E. D. R., Trugilho, P. F., Napoli, A., Bianchi, M. L., 2011. Characterization of residues from plant biomass for use in energy generation. *Cerne*, 17, 237-246. <https://doi.org/10.1590/S0104-77602011000200012>

Pekin, G., Vardar-Sukan, F., Kosaric, N., 2005. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey. *Engineering in Life Sciences*, 5(4), 357-362. <https://doi.org/10.1002/elsc.200520086>

Piegza, M., Pietrzykowska, J., Trojan-Piegza, J., Łaba, W., 2021. Biosurfactants from *Trichoderma* Filamentous Fungi—A Preliminary Study. *Biomolecules*, 11(4), 519. <https://doi.org/10.3390/biom11040519>

Postma-Blaauw, M. B., de Goede, R. G. M., Bloem, J., Faber, J. H., Brussaard, L., 2010. Soil biota community structure and abundance under agricultural intensification and extensification. *Ecology*, 91(2), 460-473. <https://doi.org/10.1890/09-0666.1>

Prado, C. A., Antunes, F. A. F., Rocha, T. M., Sánchez-Muñoz, S., Barbosa, F. G., Terán-Hilares, R., Santos, J. C., 2022. A review on recent developments in hydrodynamic cavitation and advanced oxidative processes for pretreatment of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, 345, 126458. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126458>

Price, N. P., Ray, K. J., Vermillion, K., Kuo, T. M., 2009. MALDI-TOF mass spectrometry of naturally occurring mixtures of monorhamnolipids and dirhamnolipids. *Carbohydrate Research*, 344(2), 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.10.013>

Qiu, L., Li, J. J., Li, Z., Wang, J. J., 2019. Production and characterization of biocontrol fertilizer from brewer's spent grain via solid-state fermentation. *Scientific Reports*, 9(1), 480. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36949-1>

Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 34(6), 1037-1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>

Raimbault, M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 26-27. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34581998000300007>

Rauf, M., Awais, M., Ud-Din, A., Ali, K., Gul, H., Rahman, M. M., Arif, M., 2021. Molecular mechanisms of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase producing *Trichoderma asperellum* MAP1 in enhancing wheat tolerance to waterlogging stress. *Frontiers in Plant Science*, 11, 614971. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.614971>

Rayhane, H., Josiane, M., Gregoria, M., Yiannis, K., Nathalie, D., Ahmed, M., Sevastianos, R., 2019. From flasks to single used bioreactor: Scale-up of solid state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *Journal of environmental management*, 252, 109496. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109496>

Recke, V. K., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Syldatk, C., Wray, V., Tokuda, H., Lang, S., 2013. Enzymatic production of modified 2-dodecyl-sophorosides (biosurfactants) and their characterization. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(4), 452-463. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300012>

Reddy, K. T., Agrawal, P., 2012. Studies on characterizations of agriculture waste (rice husk) for the production of ethanol. *Journal of Environmental Research and Development*, 7(2A), 1076-1084.

Renkin, M., 2003. Environmental profile of sophorolipid and rhamnolipid biosurfactants. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 80(4), 249-252

Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosani, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Mohammadi, A. A., 2020. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, 199, 117457. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>

Ribeiro, I. A., Bronze, M. R., Castro, M. F., Ribeiro M. H. L., 2013. Sophorolipids: improvement of the selective production by *Starmerella bombicola* through the design of nutritional requirements. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 1875-1887. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4437-x>

Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., Prigent-Combaret, C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>

Rodrigues, L. R., 2015. Microbial surfactants: fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. *Journal of colloid and interface science*, 449, 304-316. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.01.022>

Rodríguez, A., Gea, T., Sánchez, A., Font, X., 2021. Agro-wastes and Inert Materials as Supports for the Production of Biosurfactants by Solid-state Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 1963-1976. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01148-5>

Roelants, S. L., De Maeseneire, S. L., Ciesielska, K., Van Bogaert, I. N., Soetaert, W., 2014. Biosurfactant gene clusters in eukaryotes: regulation and biotechnological potential. *Applied microbiology and Biotechnology*, 98, 3449-3461. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5547-4>

Roelants, S. L., Ciesielska, K., De Maeseneire, S. L., Moens, H., Everaert, B., Verweire, S., Soetaert, W., 2016. Towards the industrialization of new biosurfactants: biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmerella bombicola*. *Biotechnology and bioengineering*, 113(3), 550-559. <https://doi.org/10.1002/bit.25815>

Roelants, S., Solaiman, D. K., Ashby, R. D., Lodens, S., Van Renterghem, L., Soetaert, W., 2019. Production and applications of sophorolipids. *Biobased Surfactants*, p. 65-119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00003-4>

- Rosa, C. A., Viana, E. M., Martins, R. P., Antonini, Y., Lachance, M. A., 1999. *Candida batistae*, a new yeast species associated with solitary digger nesting bees in Brazil. *Mycologia*, 91(3), 428-433. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061036>
- Rosa, C. A., Lachance, M. A., Silva, J. O., Teixeira, A. C. P., Marini, M. M., Antonini, Y., Martins, R. P., 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS yeast research*, 4(3), 271-275. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00173-9)
- Rosa, C. A., Lachance, M. A., 1998. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *International journal of systematic bacteriology*, 48(4), 1413-1417. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1413>
- Rudden, M., Tsauosi, K., Marchant, R., Banat, I. M., Smyth, T. J., 2015. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the quantitative determination of rhamnolipid congeners. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 9177-9187. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6837-1>
- Rufino, R. D., Luna, J. M., Sarubbo, L. A., Rodrigues, L. R. M., Teixeira, J. A. C., Campos-Takaki, G. M., 2011. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.045>
- Ruyters, S., Mukherjee, V., Verstrepen, K. J., Thevelein, J. M., Willems, K. A., Lievens, B., 2015. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(1), 39-48. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1544-y>
- Sachdev, D. P., Cameotra, S. S., 2013. Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 1005-1016. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>
- Sachdev, S., Singh, A., Singh, R. P., 2018. Optimization of culture conditions for mass production and bio-formulation of *Trichoderma* using response surface methodology. *3 Biotech*, 8(8), 360. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1360-6>
- Saerens, K. M., Zhang, J., Saey, L., Van Bogaert, I. N., Soetaert, W., 2011. Cloning and functional characterization of the UDP-glucosyltransferase UgtB1 involved in sophorolipid production by *Candida bombicola* and creation of a glucolipid-producing yeast strain. *Yeast*, 28(4), 279-292. <https://doi.org/10.1002/yea.1838>
- Saerens, K. M., Roelants, S. L., Van Bogaert, I. N., Soetaert, W., 2011. Identification of the UDP-glucosyltransferase gene UGTA1, responsible for the first glucosylation step in the sophorolipid biosynthetic pathway of *Candida bombicola* ATCC 22214. *FEMS yeast research*, 11(1), 123-132. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00695.x>
- Saerens, K. M., Saey, L., Soetaert, W., 2011. One-step production of unacetylated sophorolipids by an acetyltransferase negative *Candida bombicola*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 2923-2931. <https://doi.org/10.1002/bit.23248>
- Saerens, K. M., Van Bogaert, I. N., Soetaert, W., 2015. Characterization of sophorolipid biosynthetic enzymes from *Starmerella bombicola*. *FEMS Yeast Research*, 15(7), fov075. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov075>
- Saha, B. C., Cotta, M. A., 2008. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 32(10), 971-977. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.01.014>

Sala, A., Barrena, R., Artola, A., Sánchez, A., 2019. Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(8), 655-694. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1557497>

Sala, A., Barrena, R., Sanchez, A., Artola, A., 2021. Fungal biopesticide production: Process scale-up and sequential batch mode operation with *Trichoderma harzianum* using agro-industrial solid wastes of different biodegradability. *Chemical Engineering Journal*, 425, 131620. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131620>

Sala, A., Artola, A., Sánchez, A., Barrena, R., 2020. Rice husk as a source for fungal biopesticide production by solid-state fermentation using *B. bassiana* and *T. harzianum*. *Bioresource technology*, 296, 122322. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122322>

Sala, A., Vittone, S., Barrena, R., Sanchez, A., Artola, A., 2021. Scanning agro-industrial wastes as substrates for fungal biopesticide production: Use of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, 295, 113113. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113113>

Samad, A., Zhang, J., Chen, D., Chen, X., Tucker, M., Liang, Y., 2017. Sweet sorghum bagasse and corn stover serving as substrates for producing sophorolipids. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(3), 353-362. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1891-y>

Sana, S., Datta, S., Biswas, D., Sengupta, D., 2018. Assessment of synergistic antibacterial activity of combined biosurfactants revealed by bacterial cell envelop damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(2), 579-585. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.09.027>

Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Sarubbo, L. A., 2016. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>.

Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., Chopade, B. A., 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 30(2), 127-144. <https://doi.org/10.3109/07388550903427280>

Schellenberger, R., Touchard, M., Clément, C., Baillieux, F., Cordelier, S., Crouzet, J., Dorey, S., 2019. Apoplastic invasion patterns triggering plant immunity: plasma membrane sensing at the frontline. *Molecular plant pathology*, 20(11), 1602-1616. <https://doi.org/10.1111/mpp.12857>

Shah, M. U. H., Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M., Talukder, M. M. R., Yusup, S. B., Goto, M., 2017. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. *Biochemical Engineering Journal*, 127, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.005>

Shah, V., Doncel, G. F., Seyoum, T., Eaton, K. M., Zalenskaya, I., Hagver, R., Gross, R., 2005. Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(10), 4093-4100. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4093-4100.2005>

Shao, B., Liu, Z., Zhong, H., Zeng, G., Liu, G., Yu, M., Zhao, C., 2017. Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: a review. *Microbiological research*, 200, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.005>

- Shao, L., Song, X., Ma, X., Li, H., Qu, Y., 2012. Bioactivities of sophorolipid with different structures against human esophageal cancer cells. *Journal of Surgical Research*, 173(2), 286-291. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.09.013>
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., Maizel, J. V., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications*, 28, 815-820. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(67\)90391-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(67)90391-9)
- Sharma, S., Gupta, R. B. L., Yadava, C. P. S., 2002. Selection of a suitable medium for mass multiplication of entomofungal pathogens. *Indian journal of entomology*, 64(3), 254-261
- Silva, V. L., Lovaglio, R. B., Von Zuben, C. J., Contiero, J., 2014. Larvicidal activity of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 against *Aedes aegypti* larvae. *Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*
- Silva, Vinícius Luiz da. Desenvolvimento de estratégias de alimentação para produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em biorreator. 2014. 113 f. Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2014. <http://hdl.handle.net/11449/110409>.
- Singh, B. N., Singh, A., Singh, S. P., Singh, H. B., 2011. *Trichoderma harzianum*-mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 121-134. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9792-4>
- Singh, R., Glick, B. R., Rathore, D., 2018. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: A review. *Pedosphere*, 28(2), 170-189. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60018-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60018-9)
- Smyth, T. J., Rudden, M., Tsaousi, K., Marchant, R., Banat, I. M., 2016. Protocols for the detection and chemical characterisation of microbial glycolipids. *Hydrocarbon and lipid microbiology protocols: biochemical methods*, 29-60. DOI: 10.1007/8623_2014_25
- Soccol, C. R., da Costa, E. S. F., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., de Souza Vandenberghe, L. P., 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., Ashby, R. D., Uknalis, J., 2017. Characterization of growth inhibition of oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay. *Journal of microbiological methods*, 136, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.012>
- Soni, K. A., Balasubramanian, A. K., Beskok, A., Pillai, S. D., 2008. Zeta potential of selected bacteria in drinking water when dead, starved, or exposed to minimal and rich culture media. *Current microbiology*, 56, 93-97. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9046-z>
- Sotirova, A. V., Spasova, D. I., Galabova, D. N., Karpenko, E., Shulga, A., 2008. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Current microbiology*, 56, 639-644. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9139-3>
- Sotirova, A., Spasova, D., Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D., 2009. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, 164(3), 297-303. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.005>

Spaepen, S., Vanderleyden, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), a001438. doi: 10.1101/cshperspect.a001438

Spencer, J. F. T., Gorin, P. A. J., Tulloch, A. P., 1970. *Torulopsis bombicola* sp. n. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 36, 129-133. <https://doi.org/10.1007/BF02069014>

Stenersen, J., 2004. *Chemical pesticides mode of action and toxicology*. CRC press

Stewart, A., Hill, R., 2014. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 415-428). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00031-X>

Tabnut, Departamento de Informática em Saúde. Relatório básico: Farelo de Arroz. <https://tabnut.dis.epm.br/alimento/20060/farelo-de-arroz-cru>.

Takahashi, M., Morita, T., Wada, K., Hirose, N., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, D., 2011. Production of sophorolipid glycolipid biosurfactants from sugarcane molasses using *Starmerella bombicola* NBRC 10243. *Journal of Oleo Science*, 60(5), 267-273. <https://doi.org/10.5650/jos.60.267>

Tanford, Charles. "The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes John Wiley & Sons." New York (1980).

Terán Hilares, R., Ramos, L., da Silva, S. S., Dragone, G., Mussatto, S. I., Santos, J. C. D., 2018. Hydrodynamic cavitation as a strategy to enhance the efficiency of lignocellulosic biomass pretreatment. *Critical reviews in biotechnology*, 38(4), 483-493. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1369932>

Tsiafouli, M. A., Thébault, E., Sgardelis, S. P., De Ruiter, P. C., Van Der Putten, W. H., Birkhofer, K., Hedlund, K., 2015. Intensive agriculture reduces soil biodiversity across Europe. *Global change biology*, 21(2), 973-985. <https://doi.org/10.1111/gcb.12752>

Tulloch, A. P., Hill, A., Spencer, J. F. T., 1967. A new type of macrocyclic lactone from *Torulopsis apicola*. *Chemical Communications (London)*, (12), 584-586. <https://doi.org/10.1039/C19670000584>

Tulloch, A. P., Spencer, J. F. T., Gorin, P. A. J., 1962. The fermentation of long-chain compounds by *torulopsis magnoliae*: I. structures of the hydroxy fatty acids obtained by the fermentation of fatty acids and hydrocarbons. *Canadian Journal of Chemistry*, 40(7), 1326-1338. <https://doi.org/10.1139/v62-203>

Twigg, M. S., Baccile, N., Banat, I. M., Déziel, E., Marchant, R., Roelants, S., Van Bogaert, I. N., 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>

Van Bogaert, I. N., Holvoet, K., Roelants, S. L., Li, B., Lin, Y. C., Van de Peer, Y., Soetaert, W., 2013. The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: a biotechnological interesting biosurfactant produced by *S tarmerella bombicola*. *Molecular microbiology*, 88(3), 501-509. <https://doi.org/10.1111/mmi.12200>

Van Bogaert, I.N.A., Roelants, S., Develter, D. et al., 2010. Sophorolipid production by *Candida bombicola* on oils with a special fatty acid composition and their consequences on cell viability. *Biotechnol Lett* 32, 1509–1514. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0323-8>

- Van Renterghem, L., Clicque, H., Huyst, A., Roelants, S. L., Soetaert, W., 2019. Miniaturization of *Starmerella bombicola* fermentation for evaluation and increasing (novel) glycolipid production. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 4347-4362. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09766-3>
- Van Renterghem, L., Roelants, S. L., Baccile, N., Uyttersprot, K., Taelman, M. C., Everaert, B., Soetaert, W., 2018. From lab to market: an integrated bioprocess design approach for new-to-nature biosurfactants produced by *Starmerella bombicola*. *Biotechnology and bioengineering*, 115(5), 1195-1206. <https://doi.org/10.1002/bit.26539>
- Varjani, S. J., Upasani, V. N., 2017. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource technology*, 232, 389-397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>
- Vassilev, N., De Oliveira Mendes, G., 2018. Solid-state fermentation and plant-beneficial microorganisms. In *Current developments in biotechnology and bioengineering* (pp. 435-450). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00019-0>
- Vegas, R., Alonso, J. L., Domínguez, H., Parajó, J. C., 2004. Processing of rice husk autohydrolysis liquors for obtaining food ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7311-7317. <https://doi.org/10.1021/jf049142t>
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. N., Valero, J. R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Lorito, M., 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and molecular plant pathology*, 72(1-3), 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L., Chet, I., 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS microbiology letters*, 305(1), 42-48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01910.x>
- Vogel, V., Gohy, J. F., Lohmeijer, B. G., Van Den Broek, J. A., Haase, W., Schubert, U. S., Schubert, D., 2003. Metallo-supramolecular micelles: Studies by analytical ultracentrifugation and electron microscopy. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41(20), 3159-3168. <https://doi.org/10.1002/pola.10902>
- Wadekar, S., Kale, S., Lali, A., Bhowmick, D., Pratap, A., 2012. Sophorolipid production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 1029-1039. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1986-6>
- Wang, H., Roelants, S. L., To, M. H., Patria, R. D., Kaur, G., Lau, N. S., Lin, C. S., 2019. *Starmerella bombicola*: recent advances on sophorolipid production and prospects of waste stream utilization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(4), 999-1007. <https://doi.org/10.1002/jctb.5847>
- Wang, H., Kaur, G., To, M. H., Roelants, S. L., Patria, R. D., Soetaert, W., Lin, C. S. K., 2020. Efficient in-situ separation design for long-term sophorolipids fermentation with high productivity. *Journal of Cleaner Production*, 246, 118995. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118995>

Wang, Z., Li, Y., Zhao, Y., Zhuang, L., Yu, Y., Wang, M., Wang, Q., 2021. A microbial consortium-based product promotes potato yield by recruiting rhizosphere bacteria involved in nitrogen and carbon metabolisms. *Microbial biotechnology*, 14(5), 1961-1975. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13876>

Whipps, J. M., Lumsden, R. D., 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, 9-22. <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0009>

Winterburn, J. B., Martin, P. J., 2012. Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. *Biotechnology letters*, 34, 187-195. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0782-6>

Xin, F., Geng, A., 2010. Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 295-306. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8745-2>

Xu, C., Alam, M. A., Wang, Z., Chen, H., Zhang, J., Huang, S., Xu, J., 2021. Mechanisms of bio-additives on boosting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 337, 125341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125341>

Yang, J., Ching, Y. C., Chuah, C. H., 2019. Applications of lignocellulosic fibers and lignin in bioplastics: A review. *Polymers*, 11(5), 751. <https://doi.org/10.3390/polym11050751>

Yang, L., Li, Y., Zhang, X., Liu, T., Chen, J., Wei, L., Hua, Q., 2019. Metabolic profiling and flux distributions reveal a key role of acetyl-CoA in sophorolipid synthesis by *Candida bombicola*. *Biochemical Engineering Journal*, 145, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.013>

Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I., 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(11), 863-873. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01198-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01198-0)

Yoo, D. S., Lee, B. S., Kim, E. K., 2005. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. *Journal of microbiology and biotechnology*, 15(6), 1164-1169.

Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., Faruq, G., 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>

Zajic, J. E., Seffens, W., Panchal, C., 1983. Biosurfactants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1(2), 87-107. <https://doi.org/10.3109/07388558309082580>

Zaragoza, A., Aranda, F. J., Espuny, M. J., Teruel, J. A., Marques, A., Manresa, A., Ortiz, A., 2009. Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp. *Langmuir*, 25(14), 7892-7898. <https://doi.org/10.1021/la900480q>

Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Kubicek, C. P., 1999. Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host. *Fungal Genetics and Biology*, 26(2), 131-140. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1111>

Zeng, Y., Zhao, S., Yang, S., Ding, S. Y., 2014. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Current opinion in biotechnology*, 27, 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.008>

Zeng, Z., Liu, Y., Zhong, H., Xiao, R., Zeng, G., Liu, Z., Qin, L., 2018. Mechanisms for rhamnolipids-mediated biodegradation of hydrophobic organic compounds. *Science of The Total Environment*, 634, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.349>

Zhang, Y., Jia, D., Sun, W., Yang, X., Zhang, C., Zhao, F., Lu, W., 2018. Semicontinuous sophorolipid fermentation using a novel bioreactor with dual ventilation pipes and dual sieve-plates coupled with a novel separation system. *Microbial biotechnology*, 11(3), 455-464. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13028>

Zulkifli, W. N. F. W. M., Razak, N. N. A., Yatim, A. R. M., Hayes, D. G., 2019. Acid precipitation versus solvent extraction: Two techniques leading to different lactone/acidic sophorolipid ratios. *Journal of Surfactants and Detergents*, 22(2), 365-371. <https://doi.org/10.1002/jsde.12223>