UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

OLIVIA ANTUNES VALÉRIO GUIOTTI

Produção de biossurfactante por *Cutaneotrichosporon mucoides* em biorreator a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

LORENA
2018

OLIVIA ANTUNES VALÉRIO GUIOTTI

Produção de biossurfactante por *Cutaneotrichosporon mucoides* em biorreator a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

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

Orientadora: Drª Maria das Graças de Almeida Felipe

Versão Corrigida

LORENA

2018

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

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

Guiotti, Olivia Antunes Valério
Produção de biossurfactante por Cutaneotrichosporon mucoides em biorreator a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de açúcar / Olivia Antunes Valério Guiotti; orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe - Versão Corrigida. - Lorena, 2018.
97 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Hidrolisado hemicelulósico. 3. Fermentação. 4. Levedura. 5. Biossurfactante. I. Título. II. Felipe, Maria das Graças de Almeida, orient.

Dedico ao meu filho Matheus, que desde pequeno me ensinou que tudo acontece no tempo certo. Persistência, meu amor por você e principalmente a esperança de algum dia lhe servir de inspiração, foram as premissas que me guiaram até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho e proporcionar oportunidades de aprendizado, fazendo com que eu busque me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu marido, Luciano, por todo amor, apoio, parceria e por ser meu maior incentivador sempre.

Aos meus pais, Benedito e Dinaura, por terem se dedicado tanto à minha educação, por serem exemplos de pessoas íntegras e principalmente por sempre estenderem suas mãos, oferecendo amor e amparo em todos os momentos. A minha irmã Elisa, pela amizade acima de tudo.

Agradeço a Nilza, a minha mãe e ao Luciano por cuidarem do Matheus com amor e carinho nos momentos em que precisei ficar longe de casa.

À minha orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe pela paciência e compreensão e por compartilhar não somente seu conhecimento técnico, mas também sua amizade.

Ao professor Sílvio Silvério da Silva por permitir que eu desse continuidade ao trabalho iniciado pelo grupo LBios e por despertar em mim o interesse pela pesquisa e pela Biotecnologia desde a época em que fui sua aluna de iniciação científica.

Ao professor Júlio César dos Santos que me auxiliou em diversos momentos deste trabalho. Seu apoio foi fundamental. Muito obrigada.

Ao Paulo Marcelino, por toda ajuda, esclarecimentos sobre os detalhes da pesquisa, mas principalmente pela amizade e pelas risadas compartilhadas.

Agradeço aos amigos do laboratório que sempre me auxiliaram e dividiram sua alegria no dia-a-dia: Andrés, Flaviana, Alejandra, Bruna, Danielle, Fernanda, Jéssica, Fanny, Sarah, Henrique. Agradeço também aos amigos de outros laboratórios pela ajuda: Felipe, Nayellen, Henrique, Guilherme, Larissa, Sabrina, Rafael, Gilda, Ruly, Lucas e Juliana.

Aos técnicos e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, em especial à Nadir e Walkíria, e aos docentes que contribuíram para a minha formação no mestrado.

A CAPES por ter concedido a bolsa e a FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

GUIOTTI, O. A. V. **Produção de biossurfactante por *Cutaneotrichosporon mucoides* em biorreator a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 97 p. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

A crescente preocupação com a sustentabilidade e com o consumo de produtos naturais, ecologicamente corretos e biodegradáveis, coloca em evidência a importância do desenvolvimento de processos que utilizem matérias-primas renováveis para a obtenção de produtos de interesse à indústria. Nos últimos anos, tem-se buscado viabilizar as biorrefinarias lignocelulósicas para a obtenção de produtos a partir de biomassa vegetal, principalmente de subprodutos agrícolas e agroindustriais. Neste contexto, os biossurfactantes, os quais são metabólitos microbianos com propriedades tensoativas, emulsificantes e antimicrobianas, são bioprodutos alvos de pesquisa por apresentarem aplicações diversas nas indústrias petrolífera, química, alimentícia, farmacêutica e cosmética. Diferentes estratégias de redução do custo da produção microbiológica de compostos surfactantes vêm sendo desenvolvidas, a fim de tornar o processo mais viável do ponto de vista econômico e industrial e entre elas estão o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes, incluindo a otimização das condições do processo fermentativo e a utilização de substratos mais baratos, entretanto, poucos abordam a utilização de leveduras e do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima renovável disponível no Brasil. Dentro deste contexto, esta pesquisa tem como principal objetivo estudar a influência da agitação e da aeração na produção de biossurfactante a partir de meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e suplementado com nutrientes, pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em biorreator de bancada. Para tanto, foi utilizado planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central e o índice de emulsificação (I.E.) e a tensão superficial (T.S.) do meio foram analisados após 96 h de fermentação. Os melhores resultados (I.E. = 69.4 % e T.S. = 57.8 $mN.m^{-1}$) foram obtidos quando se empregou a maior agitação (250 rpm) e a menor aeração (0,5 vvm). O alto valor de I.E. evidencia o pontencial emulsificante do biossurfactante produzido, principalmente na indústria petroquímica. Entretanto, ainda se faz necessário otimizar os parâmetros agitação e aeração e reduzir a formação de espuma durante a fermentação, a fim de viabilizar este bioprocesso.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Hidrolisado hemicelulósico. Fermentação. Levedura. Biossurfactante.

ABSTRACT

GUIOTTI, O. A. V. **Biosurfactant production by *Cutaneotrichosporon mucoides* in bioreactor from hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse.** 2018. 97 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

The growing concern with sustainability and the consumption of natural, ecologically correct and biodegradable products highlights the importance of developing processes that use renewable raw materials to obtain products that can be applied in industry. In the last years, it has been tried to make viable the lignocellulosic biorrefinaries concept in order to obtain products from vegetal biomass, mainly from agricultural and agroindustrial by-products. In this context, the biosurfactants, which are microbial metabolites with tensoactive, emulsifying and antimicrobial properties, are bioproducts studied because they can be applied in the petroleum, chemical, food, pharmaceutical and cosmetic industries. Different strategies to reduce the cost of microbiological production of surfactant compounds have been developed in order to make the process viable from an economic and industrial point of view and among them are the development of more efficient bioprocesses, including the optimization of fermentation process conditions and the use of cheaper substrates, however, few works were done using yeasts and sugarcane bagasse as a renewable raw material available in Brazil. In this context, the main objective of this research is to study the influence of agitation and aeration in the production of biosurfactant using hemicellulosic hydrolyzate of sugarcane bagasse supplemented with nutrients and the yeast *Cutaneotrichosporon mucoides* in stirred tank bioreactor. For this purpose, a 2^2 full factorial design was used and the emulsification index (E.I.) and the surface tension (S.T.) of the medium were analyzed after 96 h of fermentation. The best results (E.I. = 69.4% and S.T. = 57.8 $mN.m^{-1}$) were obtained when using the highest agitation (250 rpm) and the lowest aeration (0.5 vvm). High results of E.I. showed the emulsifying potential of the biosurfactant produced, mainly in petrochemical industry. However, it is still necessary optimizing agitation and aeration parameters and decrease foaming formation during the fermentation in order to favor the viability of this bioprocess.

Keywords: Sugarcane bagasse. Hemicellulosic hidrolyzate. Fermentation. Yeast. Biosurfactant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura dos surfactantes. 20
Figura 2 - Efeito da concentração de um surfactante na adsorção em superfícies hidrofóbicas (a-muito baixa; b-baixa; c-concentração micelar crítica (CMC); d-acima da CMC). 21
Figura 3 - Variação da tensão superficial em função da concentração de surfactante indicando o ponto correspondente à concentração micelar crítica (CMC). 22
Figura 4 - Estruturas dos principais glicolipídeos. 28
Figura 5 - Estratégias de redução de custo da produção microbiológica de biossurfactantes. 29
Figura 6 - Esquema simplificado do metabolismo relacionado às vias metabólicas integradas de síntese de precursores de biossurfactantes a partir de carboidratos como substratos (A) e de lipídeos (B). 37
Figura 7 - Reator Bioengineering AG. 49
Figura 8 - Fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio baseado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, em frascos *Erlenmeyer*: A – Ensaios 1 (V_m = 50 mL), 2 (V_m = 50 mL) e 3 (V_m = 250 mL); B – Ensaio 4 (V_m = 250 mL); C – Ensaios 5 (V_m = 150 mL), 6 (V_m = 150 mL) e 7 (V_m = 150 mL). 57
Figura 9 - Perfil de consumo de xilose (A) e do crescimento celular da levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* durante as fermentações realizadas utilizando meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*. 59
Figura 10 - Perfil da variação do pH do meio de cultivo durante as fermentações realizadas utilizando meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*. 61
Figura 11 - Índice de Emulsificação (I.E.) das amostras do tempo final (96 h) das fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*, após 2 e 24 h da realização do teste. 62
Figura 12 - Gráfico de Pareto para efeitos padronizados das variáveis agitação e razão V_m/V_f nas variáveis resposta I.E.24 e T.S. correspondentes às fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*. A - considerando a resposta $I.E._{24}$; B – considerando a resposta T.S.. 64
Figura 13 - Superfície de resposta (A) e curvas de nível (B) para a variável resposta $I.E._{24}$ correspondentes ao modelo ajustado com base nos dados obtidos para produção de biossurfactantes utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* cultivada em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, em frascos *Erlenmeyer*. 67
Figura 14 - Superfície de resposta (A) e curvas de nível (B) para a variável resposta T.S. correspondentes ao modelo ajustado com base nos dados obtidos na produção de biossurfactantes utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* cultivada em

meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, em frascos *Erlenmeyer*. 69
Figura 15 – Espuma formada no ensaio nº 2 conduzido em biorreator de bancada com agitação de 250 rpm e aeração de 1,0 vvm, no tempo final (96h). 71
Figura 16 - Perfil de consumo de xilose (A) e de concentração de células (B) durante as fermentações realizadas com levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* utilizando meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada. 73
Figura 17 - Perfil de variação de pH durante as fermentações realizadas com levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* utilizando meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada. 75
Figura 18 - Índice de Emulsificação (I.E.) das amostras do tempo final (96 h) das fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada após 2 e 24 h da realização do teste. 76
Figura 19 - Gráfico de Pareto para efeitos padronizados das variáveis agitação e aeração nas variáveis resposta $I.E._{24}$ e T.S. correspondentes às fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* cultivada em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada. A - considerando a resposta $I.E._{24}$; B – considerando a resposta T.S.. 77
Figura 20 - Superfície de resposta (A) e curvas de nível (B) para a variável resposta $I.E._{24}$ correspondentes ao modelo ajustado com base nos dados obtidos para produção de biossurfactantes utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* cultivada em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, em reator de bancada. 80
Figura 21 - Índice de Emulsificação (I.E.) das amostras do tempo final (96 h) do ensaio nº 3 realizado em biorreator de bancada utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, após 2, 24 e 480 h da realização do teste com diferentes óleos (A); Emulsões formadas entre a amostra e o óleo de soja (B), óleo de motor automotivo (C) e óleo diesel (D) após 24 h do teste. 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais propriedades e aplicações indústriais dos biossurfactantes. 25
Tabela 2 - Tipos de biossurfactantes e seus principais representantes. 27
Tabela 3 - Principais empresas produtoras de biossurfactantes no mundo e principais aplicações. 31
Tabela 4 - Composição química de biomassas lignocelulósicas em diferentes vegetais....33
Tabela 5 - Planejamento fatorial 2^2 completo com triplicata no ponto central das fermentações realizadas utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*.....48
Tabela 6 - Planejamento fatorial 2^2 completo com triplicata no ponto central das fermentações utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada. 50
Tabela 7 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar. ..55
Tabela 8 - Resultados obtidos nos experimentos realizados conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central para a análise da influência das variáveis agitação e razão V_m/V_f na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*. 58
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) para os modelos de primeira ordem ajustados para as respostas $I.E._{24}$ e T.S. considerando-se os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central conduzido em frascos *Erlenmeyer* para avaliação do efeito das variáveis agitação e razão V_m/V_f na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes. 65
Tabela 10 - Resultados obtidos nos experimentos realizados conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central para a análise da influência das variáveis agitação e aeração na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada. 70
Tabela 11 - Resultados dos testes de concentração de células (g/L) e Índice de Emulsificação realizados nas amostras de espuma formada durante os ensaios conduzidos em biorreator de bancada. 74
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) para os modelos de primeira ordem ajustados para as respostas $I.E._{24}$ e T.S. considerando-se os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central conduzido em biorreator de bancada para avaliação do efeito das variáveis agitação e aeração na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes. 78

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise dos efeitos e de variância
BHL	Balanço Hidrofílico Lipofílico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
DO	*Dissolved oxygen*
E.E.	Estabilidade emulsificante
EFS	Extrato de farelo de soja
GMBio	Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (EEL / USP)
GRAS	*Generally Recognized as Safe*
HHBCA	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar
I.E.	Índice de Emulsificação
LBios	Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva – EEL / USP)
MSR	Método de Superfície de Resposta
STR	*Stirred Tank Reactor*
T.S.	Tensão Superficial
YMA	Meio ágar-extrato de levedura sólido
V_m/V_f	V_{meio}/V_{frasco}

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Surfactantes 19
2.2 Biossurfactantes 22
2.2.1 Propriedades gerais e aplicações 22
2.2.2 Gicolipídeos 28
2.3 Visão geral da produção biotecnológica de biossurfactantes 29
2.3.1 Subprodutos agroindustriais como matéria-prima em bioprocessos 32
2.3.2 Produção de biossurfactante por leveduras 35
2.3.3 Mecanismo de biossíntese de biossurfactantes por leveduras 36
2.4 Fatores que influenciam na produção de biossurfactantes 39
2.4.1 Meios de cultivo 39
2.4.2 Condições de cultivo 40
2.5 Produção de biossurfactantes em biorreatores agitados mecanicamente 42
3 OBJETIVOS 44
3.1 Objetivo Geral 44
3.2 Objetivos Específicos 44
4 MATERIAL E MÉTODOS 45
4.1 Matérias-primas 45
4.1.1 Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 45
4.1.2 Extrato de farelo de soja 45
4.2 Meios de cultivo 46
4.2.1 Meio ágar-extrato de levedura 46
4.2.2 Meio para preparação do inóculo 46
4.2.3 Meio para as fermentações 47
4.3 Microrganismo 47
4.4 Fermentação em frascos *Erlenmeyer* 48
4.5 Fermentações em biorreator de bancada 48
4.6 Métodos Analíticos 50
4.6.1 Quantificação de células 50
4.6.2 Determinação do pH 51
4.6.3 Determinação da condutividade 51
4.6.4 Determinação de compostos fenólicos totais 51

4.6.5 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, ácido fórmico, glicerol, xilitol e etanol 51
4.6.6 Determinação dos teores de furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) 52
4.6.7 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa) ... 52
4.6.8 Análise das propriedades físicas dos biossurfactantes 52
4.6.8.1 Determinação do índice de emulsificação (I.E.) 53
4.6.8.2 Determinação da tensão superficial (T.S.) 53
4.6.8.3 Determinação da estabilidade emulsificante (E.E.) 53
4.6.9 Determinação de lignina solúvel 53
4.6.10 Retirada de amostra de espuma do reator 54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
5.1 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) 55
5.2 Fermentações em frascos *Erlenmeyer* 56
5.3 Fermentação em biorreator de bancada 70
5.4 Teste de aplicação do biossurfactante obtido em biorreator de bancada 81
6 CONCLUSÃO 84
7 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS 85
REFERÊNCIAS 86

1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento da biomassa lignocelulósica de diferentes subprodutos agrícolas, em particular, as frações C6 e C5 correspondentes à celulose e hemicelulose, respectivamente, tem sido uma das prioridades no contexto atual de biorrefinarias e vêm possibilitando a obtenção de produtos de alto valor agregado a partir destas fontes de carbono abundantes no Brasil. Bioprocessos que empregam microrganismos capazes de assimilar xilose, o principal açúcar constituinte da fração hemicelulósica destes materiais, podem levar a uma grande diversidade de biomoléculas em bioprocessos. Recentemente, pesquisas realizadas pelo Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos, GMBio (EEL – USP) / Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios) revelaram que a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides*, proveniente da biodiversidade brasileira, é capaz de produzir biossurfactante a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.

Por serem, os biossurfactantes, moléculas versáteis e apresentarem propriedades, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, ação emulsificante e/ou tensoativa e ação antimicrobiana, estes apresentam ampla aplicação na indústria, abrangendo os setores petrolífero, químico, têxtil, farmacêutico, alimentício e cosmético. Além de serem considerados produtos ecologicamente corretos, uma vez que não apresentam riscos ao meio ambiente e à saúde humana, se enquadram no contexto de sustentabilidade, já que podem ser produzidos a partir de bioprodutos da indústria agrícola, tal como o bagaço de cana-de-açúcar.

Apesar da importância dos biossurfactantes, sua produção ainda apresenta limitações em função de apresentar um alto custo e ocorrer em processos que empregam microrganismos potencialmente patogênicos como algumas bactérias dos gêneros *Pseudomonas sp*. e alguns *Bacillus sp*. A grande vantagem do uso de leveduras é que muitas delas têm status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), o que minimiza os riscos de toxicidade e patogenicidade e permite a aplicação do bioproduto sem restrições. Além disso, algumas leveduras são mais tolerantes aos biossurfactantes secretados no meio de cultivo quando comparadas às bactérias.

Para o sucesso do processo de produção desses compostos é importante considerar a influência dos parâmetros nutricionais e das condições de processo no tipo e na quantidade do biossurfactante produzido. A aeração e a velocidade de agitação do meio são fatores importantes na transferência mássica de oxigênio para as células e na produção deste

bioproduto por leveduras, entretanto, podem levar à formação de espuma. Este é um desafio enfrentado durante a produção aeróbia de biossurfactante, pois a espuma pode arrastar células e produto, prejudicando o rendimento do processo. Além disso, não é adequado utilizar agentes antiespumantes nestes sistemas, pois eles podem causar algum efeito sobre o microrganismo e até mesmo interagir com o biossurfactante produzido, implicando em um processo mais complexo de purificação do mesmo.

Sendo assim, o presente trabalho propõe continuar as pesquisas relacionadas à obtenção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides*, a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, ou seja, de biomassa hemicelulósica. É avaliada a influência da agitação e da aeração na produção deste produto em biorreator de bancada do tipo tanque agitado de forma a propiciar conhecimentos científico e tecnológico a respeito destes parâmetros de processo, visando contribuir com o desenvolvimento de tecnologia de obtenção de produtos alternativos e com a viabilidade econômica de biorrefinarias multiprodutos.

É importante salientar que o presente trabalho é uma parte do projeto de auxílio regular FAPESP (Processo número 15/06238-4), coordenado pelo professor Silvio Silvério da Silva e intitulado “Biossurfactantes como moléculas versáteis: um novo conceito de produtos para biorrefinarias e combate às doenças tropicais negligenciadas - Fase 1: Seleção de leveduras, produção fermentativa e caracterização físico-química”, realizado previamente pelo GMBio. No referido projeto já foram otimizados os parâmetros nutricionais que influenciam a produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em frascos *Erlenmeyer*, em fermentações submersas e foi depositada uma patente para o processo de produção de biossurfactantes a partir de biomassa vegetal (BR 10 2014 031965-4).

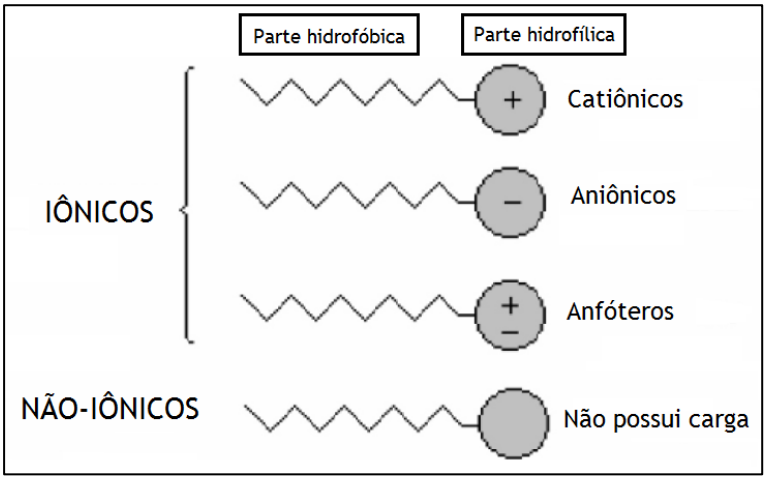
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surfactantes

O termo surfactante é oriundo da abreviatura da expressão em inglês SURFace ACTive AgeNTS (CRISTOF; ISHIVA, 2002). Também são usadas as expressões “composto tensoativo” ou “agente tensoativo” para denominá-los na língua portuguesa. O emprego destes compostos promove a redução das tensões interfacial e superficial, e também pode aumentar a solubilidade e mobilidade de compostos hidrofóbicos ou orgânicos insolúveis em soluções aquosas (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007).

Os surfactantes são substâncias com estruturas anfifílicas, sendo comumente representadas pelo modelo “cauda” apolar e “cabeça” polar (Figura 1). Em função da natureza dual, estas substâncias tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, sendo responsáveis por fenômenos de adsorção nas interfaces e superfícies de um determinado sistema (HUNTER, 1992). Os grupamentos hidrofóbicos presentes nas estruturas das moléculas surfactantes, responsáveis pela solubilidade em substâncias apolares, como por exemplo, em óleos e hidrocarbonetos, são geralmente formados por cadeias hidrocarbônicas lineares ou ramificadas, podendo conter grupos cíclicos ou aromáticos, não apresentando pólos de concentração de carga eletrostática. Já os grupamentos hidrofílicos são determinantes para a solubilidade dos tensoativos em água, sendo altamente polares, pois apresentam uma concentração de cargas, sejam elas positivas ou negativas, devido à presença de átomos com diferentes eletronegatividades, tais como oxigênio, nitrogênio, enxofre e fósforo, formando espécies iônicas ou não iônicas (ATWOOD; FLORENCE, 1985; HUNTER, 1992; DALTIN, 2011).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura dos surfactantes.



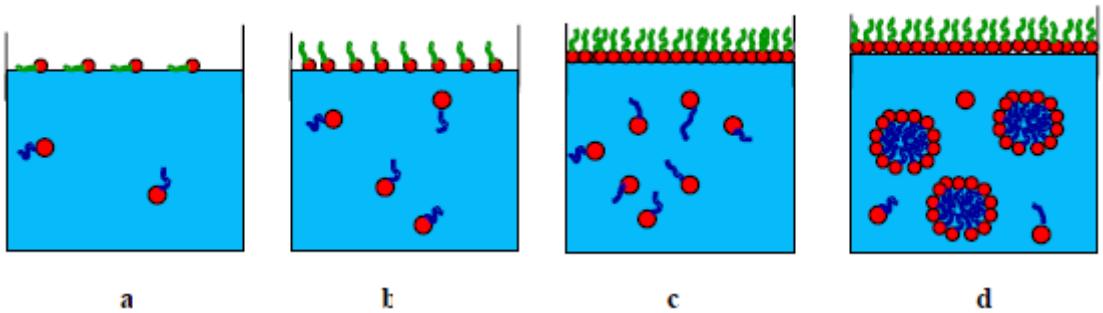
Fonte: Adaptado de PORTER, 1994 e SILVA, 2008.

Em geral, os surfactantes comerciais são sintetizados a partir de derivados do petróleo (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000), são eficientes e baratos, porém não são biodegradáveis e apresentam diferentes graus de toxicidade (BANAT, 1995). Os efeitos que podem advir do acúmulo destes compostos de origem sintética nos seres vivos e no ambiente ainda não são totalmente conhecidos (BARROS et al., 2007). Tais compostos podem ser classificados de acordo com os grupamentos polares presentes em sua estrutura, sendo agrupados em aniônicos, catiônicos, não iônicos e anfóteros (BORSATO; GALÃO; MOREIRA, 2004). Também podem ser classificados levando em consideração seus grupamentos apolares, sendo denominados ácidos graxos naturais, parafinas, olefinas, alquilbenzenos, álcoois, alquilfenóis, polipropilenoglicóis, fluorocarbonos e silicones (DALTIN, 2011).

Os surfactantes são fundamentais para a indústria, pois são responsáveis por dois fenômenos de extrema importância nos mais diversos processos: a redução da tensão superficial e o emulsionamento de líquidos. A tensão superficial é um efeito físico que ocorre na camada superficial de um líquido devido a um desbalanceamento de forças de atração entre as moléculas, pois elas sofrem atração única e permanentemente pelas forças intermoleculares das moléculas inferiores e laterais, uma vez que não há a presença de moléculas de água acima das mesmas. Desta forma, há uma tendência das moléculas da superfície serem “arrastadas” para o seio do líquido (ATKINS; JONES, 2010; DALTIN, 2011). Além disso, os surfactantes são responsáveis por características únicas que garantem diversas aplicações industriais envolvendo: detergência, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante (molhabilidade), solubilização e dispersão de fases entre

outras (NITSCHKE; PASTORE, 2002; DALTIN, 2011). O aumento da concentração dos surfactantes em soluções aquosas faz com que estes se organizem em agregados moleculares denominados micelas, devido à diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e da água (Figura 2), resultando em uma diminuição da tensão superficial do líquido (PORTER, 1994).

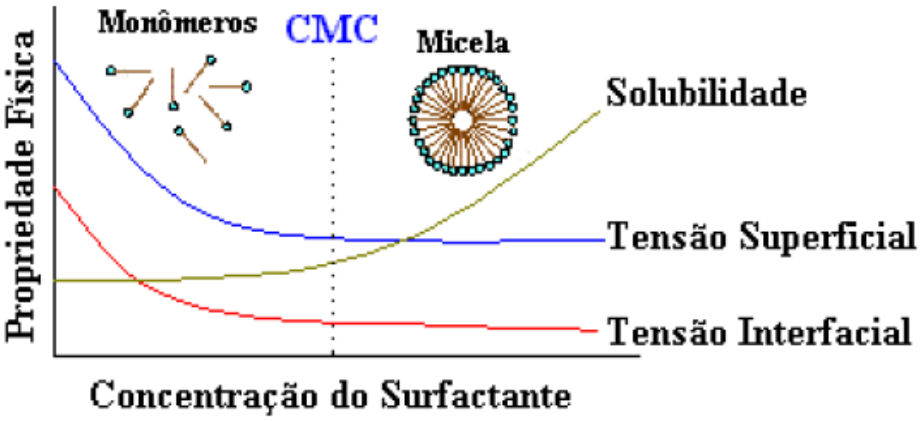
Figura 2 - Efeito da concentração de um surfactante na adsorção em superfícies hidrofóbicas (a-muito baixa; b-baixa; c-concentração micelar crítica (CMC); d-acima da CMC).



Fonte: Adaptado de PORTER, 1994.

A concentração onde se inicia o processo de formação das micelas, micelização, é denominada concentração micelar crítica (CMC), que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante a uma dada temperatura e concentração eletrolítica. O processo de formação dos agregados ocorre num intervalo pequeno de concentrações e pode ser detectado pela variação brusca produzida em determinadas propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do surfactante, como mostrado na Figura 3 (MANIASSO, 2001; RIZZATTI, 2003; RIZZATTI; ZANETTE; MELLO, 2009).

Figura 3 - Variação da tensão superficial em função da concentração de surfactante indicando o ponto correspondente à concentração micelar crítica (CMC).



Fonte: BAPTISTA, 2007.

Um surfactante, quando colocado em contato com dois líquidos imiscíveis, pode levar à formação de emulsões ou sistemas dispersivos. As partículas da fase dispersa ou descontínua se encontram distribuídas no seio da fase dispersante ou contínuo. Estes sistemas podem persistir por um período de tempo variável, com duração de segundos ou até anos. Alguns compostos surfactantes são responsáveis pela estabilização entre as fases, retardando a separação entre as duas fases distintas, agindo como emulsionantes (LYSSANT, 1974; DALTIN, 2011). A propriedade emulsificante dos surfactantes, segundo Lindner (2005), está relacionada com os tamanhos da cadeia hidrofóbica e a porção hidrofílica, sendo assim, nem todos os surfactantes apresentam capacidade emulsionante.

2.2 Biossurfactantes

2.2.1 Propriedades gerais e aplicações

Biossurfactantes são compostos com estruturas anfipáticas e são obtidos a partir de fontes naturais como vegetais, animais e microrganismos, diferente dos surfactantes sintéticos, obtidos, em sua maioria, de petróleo, como já dito anteriormente. Apresentam propriedades tensoativa e/ou emulsificante, antimicrobiana e antitumoral, o que lhes conferem inúmeras aplicações (DESAI; BANAT, 1997; MAKKAR, CAMEOTRA, 1998; NITSCHKE; PASTORE, 2002; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Durante muito tempo o conceito de biossurfactantes esteve restrito somente aos surfactantes microbianos.

Porém, mais recentemente Wim Soetaert, em palestra no Workshop on biosurfactants - Berlim, 2014, passou a dividir os biossurfactantes em compostos de primeira e segunda geração, de acordo com a origem dessas substâncias. Os biossurfactantes de primeira geração ou surfactantes verdes são conceituados como compostos extraídos e purificados de matérias-primas vegetais e animais ou inteiramente produzidos a partir de recursos renováveis por meio de sínteses químicas. Os principais exemplos são as saponinas, os ésteres de açúcares, os alquilpoliglicosídeos e as alcanolamidas. Já os biossurfactantes de segunda geração são compostos inteiramente produzidos a partir de recursos renováveis e por meio de um processo biológico (biocatálise ou fermentação), sendo exemplificados principalmente pelos surfactantes microbianos do tipo glicolipídeo e lipopeptídeo (SOETAERT, 2014).

Além dos biossurfactantes obtidos naturalmente ou por síntese química, a partir de recursos renováveis, alguns podem ser obtidos por meio de transformações enzimáticas/químicas em uma estrutura preexistente, os chamados biossurfactantes semi-sintéticos ou modificados (RECKE et al., 2013). Estes mecanismos de modificação enzimática / química permitem não só a mudança estrutural da molécula como também das propriedades físico-químicas e biológicas. Lang e Wagner (1987) e Zinjarde e Ghosh (2010) relataram a utilização de sistemas enzimáticos, tais como lipases e glicosidases, na modificação estrutural de moléculas biossurfactantes precursoras, carboidratos e lipídeos.

Quando comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam algumas características e vantagens, tais como:

a) Possuem baixa toxicidade: não causam danos aos seres vivos, podendo ser empregados sem restrições em alimentos e produtos farmacêuticos e cosméticos;
b) Possuem biodegradabilidade: são facilmente degradados na água e no solo, o que os tornam adequados para aplicações em biorremediação e tratamento de resíduos, bem como, os caracterizam como compostos “ecologicamente corretos”;
c) Possuem tolerância a temperatura, pH e força iônica extremos: o que permite uma aplicação mais abrangente já que podem ser utilizados em condições drásticas de temperatura, pH e força iônica;
d) Apresentam concentrações micelares críticas (CMC) baixas e alta atividade surfactante;

e) São mais eficientes e efetivos que, por exemplo, os sulfonatos aniônicos, uma vez que reduzem a tensão superficial mais rapidamente do que estes;
f) Aumentam a adsorção na interface óleo-água através de múltiplos pontos de ancoragem, aumentando a estabilidade das cadeias em uma única fase, produzindo efetiva estabilidade esférica. A grande área interfacial coberta pela molécula adsorvida e a multiplicidade de pontos de ancoragem asseguram que não ocorra dessorção durante a colisão das partículas e aumentam grandemente a estabilidade das emulsões;
g) Possuem atividade biológica, tais como, antimicrobiana e antitumorais (KITAMOTO et al., 2001);
h) Podem ser produzidos a partir de substratos renováveis, tais como, efluentes agroindustriais, óleos vegetais subprodutos da indústria petrolífera e alimentícia (COOPER, 1986; DESAI; BANAT, 1997; MULLIGAN, 2005; HOROWITZ; GILBERT; GRIFFEN, 1990; MULLIGAN; GIBBS, 1993; FLASZ et al., 1998; BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes são considerados moléculas versáteis devido à ampla possibilidade de aplicação industrial. Podem ser utilizados nas indústrias petrolífera, química, alimentícia, farmacêutica e na agricultura (VAN DYKE; LEE; TREVORS, 1991; NITSCHKE; PASTORE, 2002; NITSCHKE; COSTA, 2007; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009; GHARAEI-FATHABAD, 2011; CAMPOS et al., 2013; SILVA et al., 2014). Na Tabela 1, encontram-se de forma resumida as principais funções e aplicações dos biossurfactantes nos mais diversos setores industriais.

Tabela 1 - Principais propriedades e aplicações indústriais dos biossurfactantes.

Função	Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração e biorremediação
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação controlada de fármacos
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos e recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações e oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água e calcário-água
Agente fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes larvicida e mosquitocida	Controle de vetores de doenças tropicais negligenciadas
Agente de recuperação	Recuperação melhorada de petróleo (MEOR)
Estimuladores da imunidade animal e vegetal	Desenvolvimento de fármacos e formulações inoculantes
Agente antitumoral	Desenvolvimento de fármacos
Agente antimicrobiano	
Nanopartículas com potencial terapêutico	

Fonte: Adaptado de BANAT, 2000; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; NITSCHE; PASTORE, 2002; VATSA et al., 2010 GANESH et al., 2010; SILVA et al., 2015.

As propriedades físico-químicas e as classificações dos biossurfactantes devem-se às suas características estruturais. De acordo com Bognollo (1999) e Banat (2000), nos biossurfactantes, observam-se porções hidrofóbicas constituídas por cadeias hidrocarbônicas com um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupamento hidroxila, fosfato, carboxilato, um carboidrato, um aminoácido ou um peptídeo. A maioria dos biossurfactantes é neutra ou aniônica, ou seja, apresentam grupos

polares com carga negativa, e podem variar desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. Baseando-se na natureza de seus grupamentos hidrofílicos, os biossurfactantes também são comumente classificados de acordo com sua composição química (DESAI; DESAI, 1993) (Tabela 2).

A ação do biossurfactante e, consequentemente, sua aplicação na indústria, depende da sua estrutura. Compostos biossurfactantes de baixo peso molecular, principalmente glicolipídeos e alguns lipopeptídeos de cadeia curta, possuem maior atividade tensoativa e são capazes de reduzir a tensão superficial da água para valores abaixo de 30 mN/m, enquanto compostos biossurfactantes de alto peso molecular como os poliméricos e lipoproteínas são descritos como agentes emulsificantes (ROSENBERG; RON, 1999). O tipo de emulsão formada também depende da estrutura do biossurfactante, mais especificamente do Balanço Hidrofílico Lipofílico (BHL). A escala BHL indica a capacidade do agente surfactante de formar emulsões de água-em-óleo ou óleo-em-água, comparando com valores de BHL e propriedades surfactantes conhecidas. Os biossurfactantes com valores de BHL inferiores a 6, favorecem a estabilização de emulsões do tipo água-em-óleo, enquanto que os biossurfactantes com valores de BHL entre 10 e 18, têm efeitos opostos e favorecem emulsões óleo-em-água (DALTIN, 2011).

Tabela 2 - Tipos de biossurfactantes e seus principais representantes.

Tipo de biossurfactante	Principais representantes
Glicolipídeos	Ramnolipídeos Soforolipídeos Manosileritritol lipídeo Celobiose lipídeo Trehalolipídeos Trehalosemicolatos Micolatos mono, di e trissacarídeos
Lipídeos e derivados com estruturas diversas	Ácidos graxos; Lipídeos neutros; Fosfolipídeos.
Surfactantes poliméricos	Biodispersan Liposan Complexo carboidrato-lipídeo-proteína Lipoheteropolissacarídeos Manoproteínas Manana-lipídeo Manose-eritrose-lipídeo (manosil-eritrol-lipídeo)
Lipopeptídeos e lipoproteínas	Surfactina Iturina A Gramicidina Peptídeo-lipídeo Serrawetina Subtilisina Lisina-lipídeo Ornitina-lipídeo Cerilipina
Particulados	Vesículas de membrana, fímbrias e células íntegras (*whole cells*).

Fonte: Adaptado de BANAT, 2000.

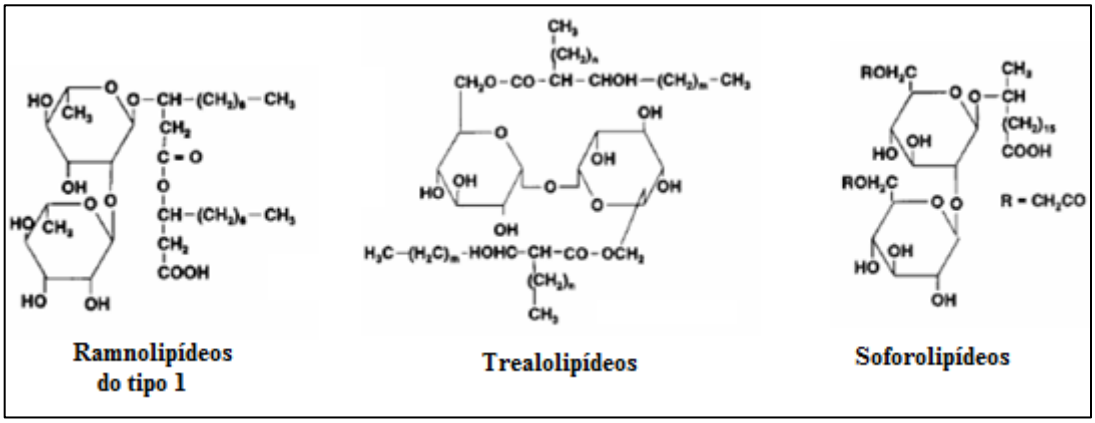
A classificação dos biossurfactantes também pode ser realizada de acordo com suas massas molares. Alguns autores comumente os classificam como compostos de alta massa molar (polissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas destes biopolímeros) ou baixa massa molar (glicolipídeos e lipopeptídeos) (RON; ROSENBERG, 2002). Na classificação quanto ao grupo polar, os principais tipos de biossurfactantes são os glicolipídeos, lipopeptídeos/lipoproteínas, lipídeos neutros, fosfolipídeos e os poliméricos. Dentre as leveduras, o tipo mais comum de biossurfactante produzido é o glicolipídeo.

2.2.2 Gicolipídeos

Os glicolípideos são os biossurfactantes mais conhecidos e estudados, sendo considerados de baixo peso molecular (ROSENBERG; RON, 1999). Eles apresentam uma porção polar glicídica (carboidratos), associada a uma ou mais cadeias longas de ácidos graxos hidroxilados ou não, que proporcionam um caráter apolar (DESAI; BANAT, 1997). São classificados bioquimicamente como carboidratos conjugados. Entre os glicolipídeos, os mais comuns são os ramnolípideos, soforolípideos, trealoselipídeos e trealosemicolatos e os manosileritritol lipídeos (MEL), sendo os soforolipídeos, MEL e celobiose lipídeos os principais produzidos por leveduras. As leveduras *Torulopis bombicola*, *Torulopis petrophilum* e *Candida sp*. são bastante citadas na produção de Soforolipídeos (SHAFI ; KHANNA, 1995; DESHPANDE; DANIELS, 1995).

A Figura 4 apresenta as estruturas químicas de três tipos de biossurfactantes glicolipídicos. Os ramnolipídeos são os glicolipídeos mais bem estudados na literatura, sendo produzidos principalmente pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Sua estrutura contém uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β-hidroxidecanóico. Os trealolipídeos são dissacarídeos de trealose ligados a ácido micólico, sendo que em diferentes microrganismos a produção de trealolipídeos difere no tamanho da estrutura do ácido micólico e número de insaturações (DESAI; BANAT, 1997). Os soforolipídeos são produzidos principalmente por leveduras e compreendem uma molécula de soforose ligada a uma cadeia de ácido graxo (JING et al., 2006).

Figura 4 - Estruturas dos principais glicolipídeos.



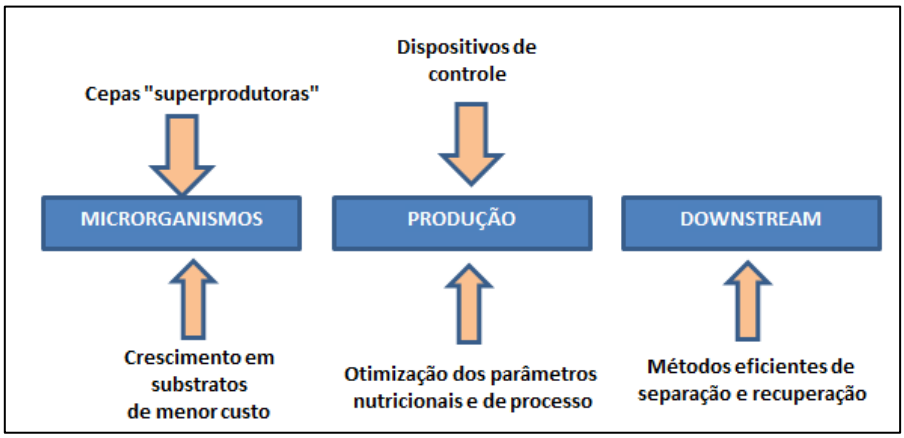
Fonte: DESAI; BANAT, 1997.

2.3 Visão geral da produção biotecnológica de biossurfactantes

A crescente busca por processos industriais e produtos sustentáveis aumentou o interesse das indústrias por substituintes aos tensoativos sintéticos de origem petroquímica. Os biossurfactantes passaram a ser cada vez mais estudados e aplicados nas mais diversas formulações e processos, já que podem ser obtidos a partir de recursos renováveis e apresentam características que os denominam como ecologicamente corretos, fazendo desses produtos a grande promessa para os detergentes do futuro (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; DALTIN, 2011; MAKKAR; CAMEOTRA; IBRAHIM, 2011). Os biossurfactantes possuem diversas aplicações, porém, ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros (NITSCHKE; PASTORE, 2002; CHEN, 2012).

Diferentes estratégias de redução do custo de produção microbiológica de compostos surfactantes vem sendo desenvolvidas, a fim de tornar o processo mais viável do ponto de vista econômico e industrial, entre elas estão: (1) o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes, incluindo a otimização das condições do processo fermentativo e dos processos de separação e recuperação do bioproduto; (2) utilização de substratos mais baratos (BANAT et al., 2014); (3) desenvolvimento genético de cepas superprodutoras (Figura 5) (RAZA, et al., 2007, BANAT et al., 2010).

Figura 5 - Estratégias de redução de custo da produção microbiológica de biossurfactantes.



Fonte: Adaptado de BANAT et al., 2010.

Com o avanço das pesquisas relacionadas a bioprocessos sustentáveis (fermentações e biocatálises), vários setores industriais, principalmente o alimentício, químico e farmacêutico, passaram a utilizar materiais antes considerados subprodutos,

como matérias-primas para a obtenção de produtos com alto valor agregado, os chamados *bio-based products* (HATTI-KAUL et al., 2007; LEE et al., 2011). A adoção desse tipo de matéria-prima se destaca não só pelo apelo ambiental, mas também por apresentarem um custo muito baixo, possibilitando uma boa relação custo / benefício quando comparado aos obtidos por sínteses químicas tradicionais, que utilizam matérias-primas caras, muitas delas derivadas de petroquímicos (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Além de agregar valor aos subprodutos, podem-se destacar os seguintes pontos como vantagens dos bioprocessos em relação às tradicionais sínteses químicas (COMASSETO, 2010):

a) utilização de condições mais brandas de processo, pois as reações são realizadas por microrganismos e enzimas a uma temperatura próxima à ambiente, o que acarreta menor gasto energético;
b) pH do meio de cultivo ou reacional próximo à neutralidade;
c) baixa carga de resíduos gerados durante o processo, além de apresentarem uma toxicidade baixa ou nula, não causando impactos ao meio ambiente;
d) regio e estereosseletividade das reações, principalmente nos processos biocatalíticos, resultando na produção de compostos enantiomericamente puros, não sendo necessária a utilização de métodos de resolução (separação) dispendiosos;
e) possibilidade de realizar reações biológicas em meio sólido (fermentações ou biocatálises em estado sólido).

Os países desenvolvidos, como os europeus e norte americano, são responsáveis por 75 – 80 % do consumo global de biossurfactantes, enquanto os países emergentes e da Ásia-Pacífico, 20 – 25 %. As principais aplicações desses produtos no mundo são como detergentes para uso doméstico (45%), aplicações institucionais (22%) e em produtos para higiene pessoal (11%), sendo que as demais aplicações incluem produtos de limpeza, indústria alimentícia, indústria petroquímica, agroquímicos e indústria têxtil (GRAND VIEW RESEARCH, 2014).

Várias empresas têm investido na produção de biossurfactantes para as mais variadas aplicações, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais empresas produtoras de biossurfactantes no mundo e principais aplicações.

Empresa	Localização	Produtos	Aplicações
TeeGene Biotech	Reino Unido	Ramnolipídeos Lipopeptídeos	Indústria farmacêutica
AGAE Technologies LLC	Estados Unidos	Ramnolipídeos com alto grau de pureza (90, 95 e 98%)	Indústria farmacêutica e petrolífera
Jeneil Biosurfactant Co. LLC	Estados Unidos	Ramnolipídeos	Indústria química e petrolífera
Paradigm Biomedical Inc.	Estados Unidos	Ramnolipídeos (Zonix/Reco)	Indústria farmacêutica
Rhamnolipids Companies, Inc.	Estados Unidos	Ramnolipídeos	Indústria farmacêutica, química, petrolífera, alimentos e agricultura
Fraunhofer IGB	Alemanha	Glicolipídeos (soforolipídeos, celobiose-lipídeos e manosileritritol-lipídeos)	Indústria química e farmacêutica
Cognis Cares Chemicals	China, Alemanha e Estados Unidos	Alquilpoliglicosídeo (APG®), *Plantcare* 1200 GLY e *Rheocare* TTA	Indústria química, farmacêutica e agricultura
Saraya Co. Ltd.	Japão	Soforolipídeos (Sophoron®)	Indústria farmacêutica e química
Ecover Belgium	Bélgica	Soforolipídeos	Indústria farmacêutica, química, petrolífera e agricultura
Groupe Soliance	França	Soforolipídeos	Indústria farmacêutica
MG Intobio Co. Ltd.	Coréia do Sul	Soforolipídeos (Sopholine)	Indústria farmacêutica
Synthezyme LLC	Estados Unidos	Soforolipídeos	Indústria química, farmacêutica e de alimentos
Allied Carbon Solutions (ACS) Ltd.	Japão	Soforolipídeos	Indústria química e agricultura

…Continua

…continuação

Empresa	Localização	Produtos	Aplicações
Henkel	Alemanha	Glicolipídeos (Soforolipídeos, Ramnolipídeos, Manosileritritol-lipídeos)	Indústria química e farmacêutica
Lion Corporation	Estados Unidos	Metil ester sulfonatos	Indústria química
Lipo Chemicals	Estados Unidos	Lipomulse Lux	Indústria química e farmacêutica
Kaneka Co.	Japão	Soforolipídeos	Indústria farmacêutica
Ecochem Ltd.	Canadá	Consórcio de biossurfactantes (EC-601, EC-1800, EC-2100W)	Indústria petrolífera e química

Fonte: Adaptado de RANDHAWA; RAHMAN (2014).

De acordo com dados dos últimos relatórios da Transparency Market Research (2011) e Grand View Research (2014), foi registrada uma produção média global de aproximadamente 344.000 toneladas de biossurfactantes e uma arrecadação de aproximadamente 1,7 bilhões de dólares entre 2011 e 2013. Há previsão de que até 2020 ocorra um aumento de 4,3 % na produção atingindo aproximadamente 461992 toneladas e 2,2 bilhões de dólares arrecadados. Segundo dados da plataforma de inovação europeia, *Bio-Tic* (2015), os biossurfactantes estão entre os cinco grupos de bioprodutos com maior potencial de aumentar a competitividade da sociedade e da indústria europeias até 2030, bem como introduzir no mercado ideias tecnologicamente inovadoras.

Apesar do mercado em expansão, a produção de biossurfactantes ainda é considerada baixa, pois os custos podem ser iguais ou superiores aos de produção dos surfactantes sintéticos. Além disso, a maioria dos biossurfactantes largamente estudados até o momento é produzido por bactérias patogênicas (SHEPHERD et al., 1995; SEKHON; KHANNA; CAMEOTRA, 2012). Diante destes problemas, a utilização de subprodutos industriais como substrato e leveduras não patogênicas como agentes fermentadores nos bioprocessos podem ser alternativas viáveis e rentáveis.

2.3.1 Subprodutos agroindustriais como matéria-prima em bioprocessos

As biomassas vegetais lignocelulósicas são constituídas por três principais frações – celulose, hemicelulose e lignina. A celulose e a hemicelulose são compostas por

polissacarídeos e a lignina é constituída de um macromaterial polifenólico. Esses compostos são comumente encontrados nas paredes celulares de vegetais, arranjados de forma que a celulose esteja cimentada pela hemicelulose e a lignina (NIGAM; GUPTA; ANTHWAL, 2009; FERREIRA et al., 2011).

A celulose é o componente com maior concentração nos materiais lignocelulósicos, variando de 40% a 60% (m/m) do peso seco do material, seguida pela hemicelulose, entre 20% a 35% e pela lignina, variando de 10% a 25% (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAJI, 2005). Entretanto, a composição quantitativa e qualitativa varia dependendo da espécie vegetal (SAHA, 2003; LYND et al., 2005) e mesmo dentro da própria espécie, devido a variações genéticas e diferentes condições de cultivo (FENGEL; WEGENER, 1989) – Tabela 4. O restante da biomassa é constituído, minoritariamente, por substâncias como proteínas, pectina, óleos, minerais, terpenos, alcalóides e vários pigmentos. Devido à rica composição orgânica, os materiais lignocelulósicos são aproveitados nos bioprocessos principalmente como fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, micronutrientes e fatores de crescimento de fundamental importância para a nutrição microbiana (NIGAM; GUPTA; ANTHWAL, 2009).

Tabela 4 - Composição química de biomassas lignocelulósicas em diferentes vegetais.

Biomassa lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Palha de cana-de-açúcar	40 - 44	30 - 32	22 - 25
Bagaço de cana-de-açúcar	32 - 48	19 - 24	23 - 32
Madeira dura	43 - 47	25 - 35	16 - 24
Madeira mole	40 - 44	25 - 29	25 - 31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38 - 40	28	7 - 21
Fibra de côco	36 - 43	0,15 – 0,25	41 - 45
Fibra de bananeira	60 - 65	6 - 8	5 - 10
Palha de cevada	31 - 45	27 - 38	14 - 19
Cascas de aveia	29,3	28,4	22,2

Fonte: Adaptado de CORTEZ, 2010 e PÉREZ, 2015.

Tanto o bagaço *in natura* como os seus hidrolisados ricos em açúcares fermentescíveis podem ser utilizados como fontes de nutrientes em bioprocessos (PANDEY et al., 2000). As frações celulósica e de lignina já são exploradas em vários processos industriais químicos, físicos e biológicos. Porém, a utilização da fração hemicelulósica ainda é restrita à obtenção de etanol de segunda geração e xilitol. Vale ressaltar que as pentoses obtidas a partir da hemicelulose apresentam grande potencial de utilização em bioprocessos (PANDEY et al., 2000).

A utilização da fração hemicelulósica requer a solubilização de seus açúcares a partir de técnicas hidrolíticas ou pré-tratamentos que se baseiam na desestruturação seletiva da matriz reforçada que compõe os materiais lignocelulósicos. Com o rompimento da estrutura lignocelulósica e a maior acessibilidade à fração hemicelulósica é possível solubilizá-la, obtendo-se um hidrolisado rico em xilose, arabinose e glicose (PANDEY et al., 2000; LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; MOSIER et al., 2005; CHAMPAGNE, 2008; AGUIAR; FERRAZ, 2011).

A hidrólise ácida tem sido a técnica de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar que mostrou maior eficiência, com maiores rendimentos na liberação de açúcares pentoses fermentescíveis, sendo assim a mais empregada (LAOPAIBOON et al., 2010). Canilha et al. (2011) avaliaram as condições para a hidrólise ácida de bagaço de cana e observaram que o emprego de até 2 % de ácido sulfúrico, a 150 ºC durante 30 minutos foi eficiente na liberação dos açúcares fermentescíveis. Arruda et al. (2008) empregaram condições mais brandas como 1 % de ácido sulfúrico, a 120 °C por 20 minutos nas condições hidrolíticas e também obtiveram sucesso. Porém, além da liberação dos açúcares de interesse, nota-se a presença de ácidos orgânicos (ácido fórmico e acético) e compostos fenólicos (aldeídos e acídicos), oriundos da degradação da própria biomassa (ARRUDA et al., 2008). Nota-se também a formação de furanos (furfural e 5-hidroximetil-furfural), resultantes das reações de desidratação devido ao pH ácido e a elevada temperatura do meio reacional (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000b). Durante a fermentação, dependendo da concentração em que se encontram no meio de cultivo, estes compostos são tóxicos e agem como inibidores do crescimento microbiano e do metabolismo fermentativo (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAJI, 2005).

Devido à presença dos compostos inibidores do crescimento microbiano no hidrolisado, o processo de destoxificação se faz necessário como uma etapa prévia à fermentação para a redução do teor de ácidos orgânicos, compostos fenólicos e furanos (ARRUDA et al., 2008; ROBERTO et al., 1991). A técnica de destoxificação de

hidrolisados hemicelulósicos mais comum é o emprego combinado de ácidos e bases para o ajuste do pH, onde ocorre a precipitação seletiva de alguns compostos, e a posterior aplicação de carvão ativado para a adsorção de alguns inibidores, como por exemplo, os fenóis (ALVES et al., 1998; MARTÍNEZ et al., 2001; MARTON et al., 2006, VILLARREAL, 2005; GUILARDUCI et al., 2006; ARRUDA, 2011). Outras técnicas também são empregadas, tais como as que utilizam resinas de troca iônica (SANTOS; MARTON; FELIPE, 2014) e polímeros vegetais (SILVA-FERNANDES et al., 2017).

2.3.2 Produção de biossurfactante por leveduras

As leveduras têm sido cada vez mais utilizadas como agentes fermentadores, na produção de biossurfactantes. A grande vantagem das leveduras na produção dos biossurfactantes reside no *status* GRAS (*Generally Regarded As Safe*) que muitas delas apresentam, eliminando riscos de toxicidade e patogenicidade e permitindo aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, sem restrições (BARTH; GAILLARD, 1997; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Além disto, leveduras possuem estruturas celulares mais resistentes aos biossurfactantes secretados no meio de cultivo do que as bactérias, fazendo desse fato outro atrativo à produção industrial desses metabólitos (MONTEIRO et al., 2009).

Entre as leveduras mais conhecidas na produção dos biossurfactantes, temos as do gênero *Candida*, *Starmerella* e *Pseudozyma*. Porém, na literatura podemos encontrar relatos de produção pelos gêneros *Rhodotorula* sp., *Pichia* sp., *Debaromyces* sp., *Kluyveromyces* sp., *Yarrowia* sp. e *Cutaneotrichosporon* sp. Deve-se salientar que as leveduras descritas como lipases positivas e oleaginosas, acumuladoras de lipídeos intracelulares destacam-se como melhores produtoras de biossurfactantes (HOMMEL et al., 1994; DOUROU et al., 2017).

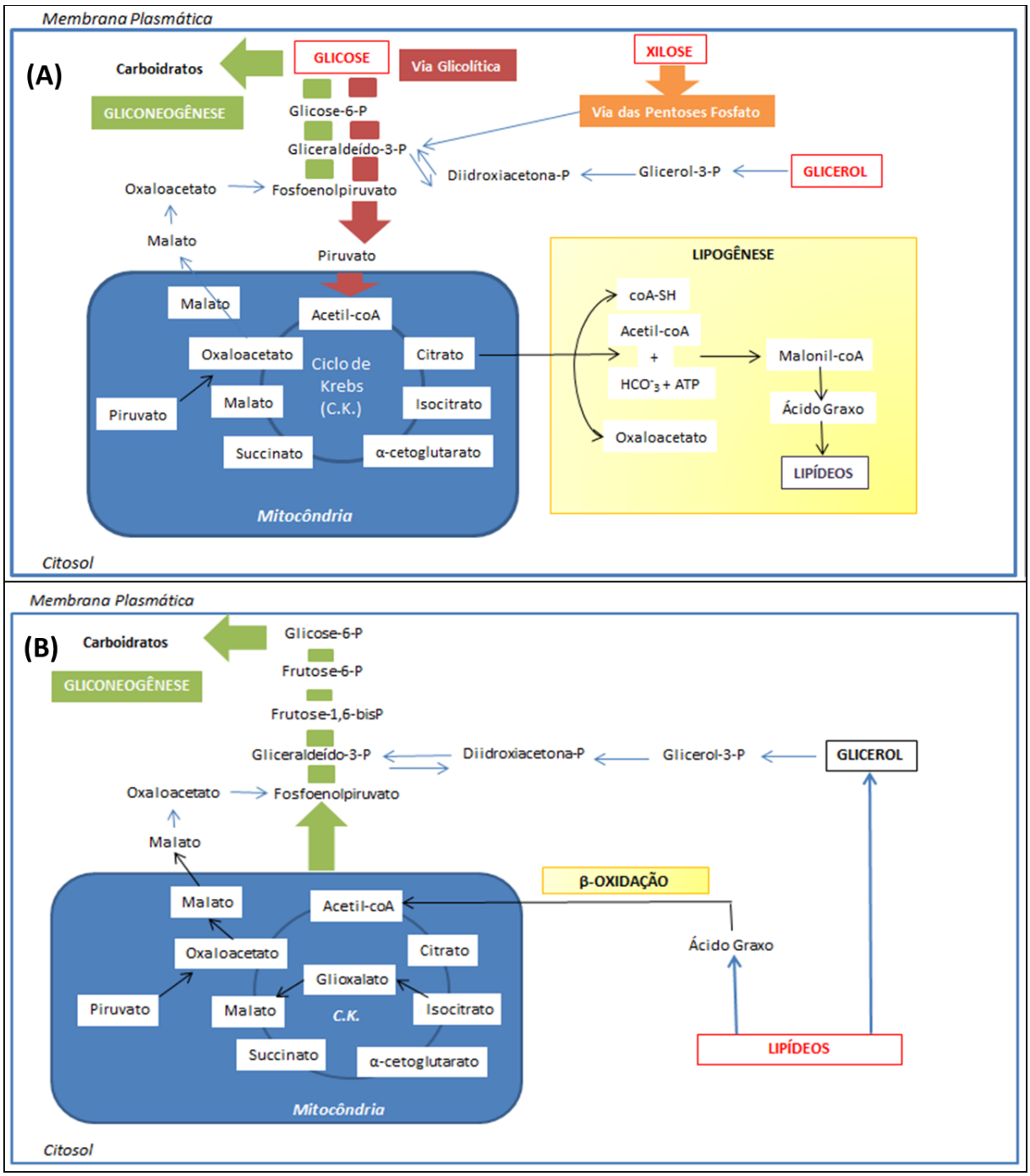
De acordo com a literatura, a maioria das pesquisas que relatam produção microbiana de biossurfactante por leveduras, utiliza meios semi-definidos ou sintéticos nos quais são empregadas como principais fontes de carbono a glicose, xilose e L-arabinose (AGEITOS et al., 2011). Também há diversas pesquisas que utilizam matérias-primas oriundas de subprodutos industriais, tais como glicerol e diferentes óleos vegetais, mas somente Portilla-Rivera et al. (2007), relataram a produção de biossurfactantes utilizando o hidrolisado hemicelulósico da biomassa vegetal, porém o agente fermentador foi *Lactobacillus sp*., uma bactéria. Sendo assim, exceto pelo trabalho já publicado pelo grupo

LBios (MARCELINO, 2017), pode-se dizer que não foram encontrados outros dados na literatura mostrando a utilização de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar na produção de biossurfactantes, através de leveduras.

2.3.3 Mecanismo de biossíntese de biossurfactantes por leveduras

Existem diferentes vias metabólicas propostas para a produção de biossurfactantes por leveduras, as quais dependem fundamentalmente da natureza da(s) fonte(s) de carbono utilizada(s) no meio de cultivo. Na Figura 6 encontra-se um esquema simplificado da integração metabólica relacionada à síntese de precursores de biossurfactante a partir de carboidratos (A) e a partir de lipídeos (B) como substratos.

Figura 6 - Esquema simplificado do metabolismo relacionado às vias metabólicas integradas de síntese de precursores de biossurfactantes a partir de carboidratos como substratos (A) e de lipídeos (B).



Fonte: Adaptado de MARCELINO, 2016.

No caso da utilização de carboidrato como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de glicolipídeo, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias, lipo e glicogênicas, sejam especialmente atendidas no metabolismo microbiano. Isto ocorre já que as moléculas de biossurfactantes, no caso, os glicolipídeos, apresentam estrutura dual, formada por açúcares e lipídeos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Para melhorar o processo de biossíntese de biossurfactantes é comum combinar duas fontes de carbono com diferentes polaridades nos meios de cultivo, assim, uma fração do substrato polar é utilizado primeiramente pelo microrganismo para o crescimento e manutenção celular e posteriormente para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto que o substrato apolar é utilizado exclusivamente para a produção da porção apolar do biossurfactante (WEBER; DOGE; HAUFE, 1992).

No catabolismo de fontes de carbono polares, como carboidratos (glicose e pentoses), glicerol ou outros, são gerados gliceraldeído-3-fosfato e glicose-6-fosfato, metabólitos chaves, pois atuam também como precursores na via gliconeogênica dos carboidratos componentes da porção polar do biossurfactante. Na gliconeogênese, o processo é bastante semelhante ao inverso da via glicolítica, visto que as reações que levam piruvato à glicose-6-fosfato são essencialmente inversas às da glicólise, com exceção de duas reações irreversíveis, a conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato e a hidrólise frutose-1,6-difosfato a frutose-6-fosfato, que são catalisadas, respectivamente, pelas enzimas piruvato carboxilase e hexose-difosfatase. Porém, estas mesmas fontes de carbono, após seu catabolismo, também produzem metabólitos intermediários importantes na síntese dos componentes da porção apolar, lipídica ou hidrocarbônica, do biossurfactante (MARCELINO, 2016).

Os carboidratos e/ou glicerol, após as oxidações que ocorrem nas vias glicolítica ou das pentoses monofosfatadas, produzem o piruvato. Por meio de uma reação de descarboxilação oxidativa, o piruvato é convertido em acetil-CoA, metabólito chave, pois é produto de degradação e atua nas sínteses de ácidos graxos. O acetil-CoA une-se ao oxaloacetato para transporte pelos compartimentos intracelulares (membranas da mitocôndria). No citosol, o acetil-CoA é regenerado, e posteriormente, reagindo com ânions bicarbonato, forma o malonil-CoA, outro metabólito chave na síntese de ácidos graxos constituintes dos lipídeos (SILDATK; WAGNER, 1987; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

No catabolismo de fontes de carbono apolares, como triacilglicerídeos, também são gerados metabólitos intermediários utilizados pelo microrganismo nas vias lipo e

gliconeogênicas, para a síntese tanto da parte polar, glicídica, do biossurfactante, como para a parte apolar, lipídica. Para a produção dos açúcares a via gliconeogênica é ativada, e as moléculas de acetil-CoA ou propionil-CoA provenientes da β-oxidação dos ácidos graxos, constituintes dos lipídeos, tornam-se os metabólitos chaves da via biossintética (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Na lipogênese, as moléculas de acetil-CoA ou propionil-CoA também serão utilizadas como precursores da síntese de ácidos graxos através dos mecanismos descritos anteriormente.

2.4 Fatores que influenciam na produção de biossurfactantes

A composição química e as características dos biossurfactantes produzidos por microrganismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio, presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção, além dos parâmetros de processo, tais como pH, temperatura, agitação e forma de condução do mesmo (BANAT, 1995; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Estes parâmetros interagem entre si de uma maneira complexa e afetam a cinética de produção de biossurfactantes (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Além disto, a produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações de nitrogênio (DESAI; BANAT, 1997).

2.4.1 Meios de cultivo

A fonte de carbono empregada no meio de cultivo tem influência no tipo e na quantidade de biossurfactante produzido, pois promove alterações na composição química da molécula, levando à variação nas suas propriedades físico-químicas (GEORGIOU; LINS; SHARMA, 1992). Tal comportamento foi constatado em pesquisas com a levedura *C. lipolytica* cultivada em diferentes fontes de carbono, tais como hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão, nas quais se observou maior produção de biossurfactante com hexadecano, uma vez que com este substrato obteve-se uma maior atividade emulsificante (CIRIGLIANO; CARMAN, 1984). No caso da produção de biossurfactante por Sarubbo et al. (2001), a partir de levedura *C. lipolytica* IA1055, utilizando glicose como fonte de carbono, foi observada uma alta atividade de

emulsificação, não tendo sido necessária a presença de hidrocarbonetos para indução de biossíntese de surfactantes.

Vários estudos mostram que, apesar da produção de biossurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbono solúveis em água, como os açúcares, as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos, tais como hidrocarbonetos, por exemplo, são adicionados ao meio (HOMMEL et al, 1994) .

O nitrogênio é essencial para o crescimento celular e possui grande importância para a síntese de proteínas e enzimas (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Diferentes compostos nitrogenados têm sido empregados na produção de biossurfactantes, tais como licor de milho, milhocina (SANTANA, et al, 2005), uréia (VANCE-HARROP; GUSMÃO; CAMPOS-TAKAKI, 2003), peptona (KIM et al., 2006), extrato de levedura (JING et al., 2006; CASAS; GARCIA-OCHOA, 1999), sulfato de amônio (ZINJARDE; PANT, 2002), nitrato de amônio (THANOMSUB et al., 2004), nitrato de sódio (BEDNARSKI et al., 2004), extrato de carne, farelo de soja e extrato de malte (MATA-SANDOVAL; KARNS; TORRENS, 2001).

A razão C/N e a limitação de nitrogênio também possuem um papel importante no processo de produção de biossurfactantes (ABU-RUWAIDA et al.,1991). Coeficientes de rendimento (Yps) de 0,012 a 0,675 g/g e valores de produtividade volumétrica (Qp) entre 0,021 e 1,76 g/L têm sido relatados na produção de biossurfactante por diversas leveduras, utilizando várias combinações e concentrações de fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultivo (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). No caso da produção de biossurfactante pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides*, em meio baseado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado, o meio de cultivo foi previamente otimizado pelo Grupo GMBio (MARCELINO, 2016).

2.4.2 Condições de cultivo

É importante estudar as condições de cultivo, tais como pH, temperatura, agitação, disponibilidade de oxigênio no meio e formas de condução do processo, pois elas interferem no metabolismo celular do microrganismo e influenciam a produção de biossurfactante (DESAI; BANAT, 1997). Trabalhar em condições otimizadas é essencial para o sucesso de ampliação de escala da produção de biossurfactantes, podendo tornar o bioprocesso economicamente competitivo (BANAT et al., 2010).

O efeito do pH em relação à produção de biossurfactante por *C. antarctica* foi estudado utilizando-se tampão fosfato em diferentes pHs (de 4 a 8). Todos os tampões utilizados resultaram em uma diminuição no rendimento da produção do biossurfactante, quando comparados com a água destilada (KITAMOTO et al., 2001). O pH do meio de cultivo foi um parâmetro estudado na síntese de glicolipídeos pela *C. antarctica* e *C. apicola*. Quando o pH foi mantido em 5,5, a produção de glicolipídeos atingiu o valor máximo. Sem o controle de pH, a síntese de biossurfactantes decresceu (BEDNARSKI et al, 2004). A produção de bioemulsificante pela levedura *R. glutinis* durante fermentação em batelada alimentada foi significantemente influenciada pelo pH e temperatura, sendo que as condições ótimas de cultivo foram 30ºC e pH 4,0 (JOHNSON; SINGH; SAINI, 1992).

Com relação à temperatura, a maioria das fermentações realizadas para a produção de biossurfactante ocorre em uma faixa de 25ºC a 30ºC (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Desphande e Daniels (1995) avaliaram o efeito da temperatura no crescimento de *C. bombicola* e na produção de soforolipídeos. A produção de soforolipídeos foi máxima a 27ºC, enquanto o crescimento celular máximo foi obtido a 30ºC.

Outros parâmetros importantes neste bioprocesso são a aeração e a agitação, pois influenciam na produção de biossurfactante, uma vez que facilitam a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa (SCHMIDELL et al., 2001). Em geral, para leveduras, a produção de biossurfactante aumenta com o aumento da agitação e aeração (SPENCER, 1979). A quantidade de oxigênio dissolvido no meio está diretamente relacionada à produção da parte apolar do biossurfactante (lipídica) (LI; DU; LIU, 2008; AGEITOS et al., 2011), sendo que a presença de oxigênio no meio leva o metabolismo do microrganismo à produção de acetil-CoA, utilizado como precursor da síntese de ácidos graxos, ou seja, da parte apolar do biossurfactante (SILDATK e WAGNER, 1987; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; LI; DU; LIU, 2008; LEHNINGER; NELSON; COX, 2014; AGEITOS et al., 2011), favorecendo a produção de biossurfactantes com melhores características emulsificantes.

Adamczak e Bednarski (2000) avaliaram a influência da aeração na síntese de biossurfactante por *C. antarctica* e a maior produção (45,5 g/L) foi alcançada quando a levedura foi cultivada, em biorreator, em meio com uma taxa de aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) e concentração de oxigênio dissolvido controlada em 50% do valor da saturação, em meio contendo 80 g/L de óleo de soja. Quando a aeração foi alterada para 2 vvm, no entanto, houve uma produção intensa de espuma e a

produção de biossurfactante decaiu 84%. A formação de espuma é um fator indesejado no processo, uma vez que diminui a transferência de oxigênio e pode retirar do meio reacional parte das células e do bioproduto, diminuindo os valores de produção desses metabólitos (WEI; CHOU; CHANG, 2005; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Albuquerque, Fileti e Campos-Takaki (2006) estudaram os efeitos da agitação e da temperatura na produção de biossurfactante frente a diferentes óleos, com o objetivo de ampliar a escala de produção de frascos agitados para biorreator. Foi verificado que o aumento da temperatura exerceu um efeito negativo sobre as atividades de emulsificação para emulsões água em hexadecano e água em óleo de milho e que o aumento da velocidade de agitação produziu um efeito positivo sobre a atividade de emulsificação de água em óleo de canola. As melhores condições de operação para a produção de biossurfactante foram 28ºC e 300 rpm.

2.5 Produção de biossurfactantes em biorreatores agitados mecanicamente

Em geral, o aumento de escala de um processo está condicionado a ensaios iniciais em bancadas de laboratório, para que sejam, em seguida, testados em escala semi-piloto e piloto. Após estes estudos, dá-se início a produção em escala industrial. O critério de aumento de escala em sistemas de cultivo aeróbio está relacionado em manter a similaridade entre os coeficientes volumétricos de oxigênio (k_La) (DORAN, 1995).

Dentre as várias formas de condução de processo em biorreatores, as fermentações por batelada simples e batelada alimentada são as mais utilizadas para estudos de produção de biossurfactante por leveduras (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Estes modos de condução de bioprocessos são atrativos para uma grande gama de processos fermentativos, pois exigem menos em termos de equipamentos, acompanhamento e manutenção (FRANÇA et al., 2014). São também seguros quanto à manutenção da assepsia, pois o reator é esterilizado ao final de cada batelada (SYLDATK; WAGNER, 1987).

Schimidell et al. (2001) reportaram que a mistura do fluido (sistema reacional) é de crucial importância em bioprocessos, sendo que em cultivos aeróbicos essa é uma operação crítica, pois está diretamente relacionada à transferência de oxigênio para as células. O oxigênio exerce papel fundamental na proliferação da biomassa microbiana e consequentemente na geração de produtos. A taxa com que o oxigênio é consumido pelas células determina a taxa na qual o gás é transferido para o sistema. Normalmente, a

demanda específica de oxigênio passa por um período máximo no início da fase exponencial de crescimento microbiano (DORAN, 1995).

Quando o ar é disperso através do meio líquido, diferentes padrões de fluxo das bolhas de ar podem ocorrer, segundo Doran (1995). Se a taxa de agitação é baixa e a de aeração é elevada, o gás envolve o impelidor sem que ocorra dispersão das bolhas, formando um fluxo de ar somente ao longo do eixo da haste do agitador. O aumento da velocidade de agitação faz com que o gás seja capturado sob as pás do impelidor, sendo então disperso através do meio líquido. Quanto à aeração, baixas taxas prejudicam a transferência de oxigênio e elevadas taxas podem causar turbilhonamento no sistema. Segundo Oura (1974), a capacidade de leveduras manterem um metabolismo aeróbio varia quando cultivadas sob diferentes intensidades de aeração, sendo este o principal agente controlador da capacidade de crescimento da levedura utilizando somente o metabolismo oxidativo. Oura (1974) também comenta que elevadas concentrações de oxigênio no meio durante o cultivo interferem no metabolismo dos microrganismos, pois podem provocar efeitos tóxicos de hiperoxia, que podem ser notados pelo aparecimento anormal de etanol ou acetaldeído.

A agitação e aeração constantes durante a produção aeróbia de biossurfactantes por bactérias e/ou leveduras pode ocasionar excessiva formação de espuma, afetando diretamente os rendimentos de produção (CHAYABUTRA; WU; JU, 2001; REILING et al., 1986, HENKEL et al., 2012). Estudos têm sido realizados visando estabelecer valores de aeração e agitação em biorreatores ou até mesmo visando identificar a melhor configuração de biorreatores, de maneira que não ocorra formação considerável de espuma (FAHIM et al., 2013; COUTTE et al., 2013). Lee e Kim (2008) mostraram que não é adequado utilizar agentes antiespuma nestes sistemas, pois eles podem causar algum efeito sobre o microrganismo e até mesmo interagir com o biossurfactante produzido, implicando em um processo mais complexo de purificação. Uma alternativa a ser considerada é o emprego de quebrador mecânico de espuma. Este dispositivo mecânico pode auxiliar no aumento do volume de trabalho do reator e evitar a perda de fermentações devido ao extravasamento de meio, o que além de prejuízos financeiros devido à perda de produtividade, aumenta os riscos de contaminação (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFA; HASSOUNA, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Contribuir para o desenvolvimento de tecnologia de produção de biossurfactante pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* a partir do cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, empregando biorreator de bancada do tipo tanque agitado STR (*Stirred Tank Reactor*).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, em frascos *Erlenmeyer*, a influência da disponibilidade de oxigênio resultante da combinação entre a agitação e a relação V_m/V_f na produção de biossurfactante pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, utilizando como ferramenta um planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central e o Índice de Emulsificação (I.E.) e a Tensão Superficial (T.S.) como variáveis resposta;

- Avaliar, em biorreator de bancada do tipo STR, a influência da disponibilidade de oxigênio resultante da combinação entre a agitação e a aeração na produção de biossurfactante pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, utilizando como ferramenta um planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central e o Índice de Emulsificação (I.E.) e a Tensão Superficial (T.S.) como variáveis resposta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

4.1.1 Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) utilizado no presente trabalho foi obtido por hidrólise ácida diluída (FERREIRA, 2017), concentrado e gentilmente cedido pelo professor Dr. Sílvio Silvério da Silva e sua aluna de doutorado Adriana Dilon. Até o momento do uso, o hidrolisado foi armazenado em bombonas plásticas de 50 L em câmara refrigerada a 4 ºC.

Antes de cada fermentação, o volume necessário de hidrolisado hemicelulósico, o qual foi inicialmente concentrado aproximadamente em um fator de cinco vezes, foi destoxificado empregando-se a metodologia que se baseia na adição de CaO comercial até pH 7,0, seguido do abaixamento para pH 2,5 com H_3PO_4 e à etapa de adsorção em carvão ativado (1,0% m / V) em frascos agitados a 100 rpm, 60 °C, por 30 minutos (MARTON et al., 2006). A cada etapa de alteração do pH e adsorção em carvão, os hidrolisados foram centrifugados, em centrífuga Beckman J6-HC, a 1250 g por 15 minutos para a remoção dos precipitados formados. Ao final, o hidrolisado destoxificado teve seu pH corrigido para 5,5 com NaOH (micropérolas) e foi autoclavado a 115 ºC por 15 minutos.

Para a caracterização dos hidrolisados concentrado e destoxificado foram analisados o pH e a condutividade e foram determinados os teores de xilose, glicose, arabinose e ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com o protocolo de Marton e colaboradores (2006). Os hidrolisados não destoxificado e destoxificado também foram caracterizados quanto aos compostos fenólicos totais (ARRUDA, 2011) e teores de furanos provenientes da degradação dos açúcares (furfural e 5-hidroximetilfurfural) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.1.2 Extrato de farelo de soja

O extrato do farelo de soja foi preparado a cada fermentação e utilizado como suplemento nos meios de cultivo para obtenção dos biossurfactantes. O farelo foi seco em estufa, a 60 ºC, até peso constante e aproximadamente 20 g foram pesados, colocados em frasco *Erlenmeyer* de 250 mL, no qual foram adicionados 100 mL de água destilada. Esta

suspensão foi levada à autoclave por 15 minutos a 121 ºC. O extrato foi então centrifugado assepticamente, em centrífuga Beckman J6-HC, a 2222 g por 15 min, para a separação dos sólidos e o sobrenadante foi utilizado nas fermentações. A caracterização do EFS obtido após o tratamento térmico em meio aquoso quanto ao pH, densidade, condutividade e aos teores de proteínas totais, lipídeos totais, compostos fenólicos totais, carboidratos totais e redutores e saponinas totais está apresentada na tese de Marcelino (2016).

4.2 Meios de cultivo

4.2.1 Meio ágar-extrato de levedura

O preparo do meio ágar-extrato de levedura (YMA) sólido (em g/L: 10 dextrose, 5 peptona, 3 extrato de malte, 3 extrato de levedura, 20 ágar) foi feito para manutenção do microrganismo utilizado nas fermentações.

4.2.2 Meio para preparação do inóculo

O inóculo foi preparado utilizando o meio basal proposto por Kitamoto e colaboradores (1990) modificado, o qual é composto por 2 g/L de fosfato monopotássico (KH_2PO_4), 10 g/L de extrato de levedura, 11 g/L de nitrato de amônio (NH_4NO_3), 2 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$) e 40 g/L de xilose, em vez de óleo de soja. As fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes foram autoclavadas a 111 ºC por 15 minutos, separadamente, para que não ocorresse reação de *Maillard* e precipitações. A levedura foi transferida da placa de manutenção (meio YMA) para três frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 100 mL de meio cada, com o auxílio de uma alça de platina e estes frascos foram incubados em agitador orbital a 200 rpm e 30 ºC por 48 horas. Após este período, as células foram separadas por centrifugação asséptica, em centrífuga Novatecnica NT-825, a 1169 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e a biomassa ressuspendida em água destilada estéril para ser utilizada como inóculo nas fermentações. Após diluições adequadas, o inóculo foi ajustado com o auxílio de uma escala Mc Farland modificada para leveduras (LEVI, 2003), inoculando-se aproximadamente 2,0 x 10^7 células/mL nos frascos *Erlenmeyer*. No experimento em reator de bancada, foi utilizada uma curva previamente preparada, que correlaciona absorbância a 600 nm com a concentração de células em g/L e foi inoculado no reator aproximadamente 1 g/L de células em cada ensaio.

4.2.3 Meio para as fermentações

As fermentações em frascos *Erlenmeyer* ocorreram em meio de cultivo previamente otimizado por Marcelino (2016), o qual foi composto por 15 g/L de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), 5 g/L de extrato de levedura, 10% de extrato de farelo de soja, 10 g/L de óleo de soja (baseado no teor de lipídeos totais) e HHBCA destoxificado contendo aproximadamente 40 g/L de xilose (Meio A).

Para as fermentações conduzidas em biorreator de bancada, foi utilizado o meio de cultivo também previamente otimizado por Marcelino (2016), porém, o que continha menor concentração de extrato de farelo de soja, pois este nutriente tenderia a aumentar a formação de espuma no biorreator STR, podendo prejudicar a condução do processo. O meio escolhido foi composto por 5 g/L de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), 15 g/L de extrato de levedura, 2% de extrato de farelo de soja, 2 g/L de óleo de soja (baseado no teor de lipídeos totais) e HHBCA destoxificado contendo aproximadamente 40 g/L de xilose (Meio B).

As fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes foram autoclavadas a 111 ºC por 15 minutos, separadamente, para que não ocorresse reação de *Maillard* e precipitações, tornando os nutrientes indisponíveis para o consumo dos microrganismos. Após o resfriamento, foram misturadas nas proporções ideais para o preparo do volume desejado do meio e o pH inicial foi ajustado para 5,5, quando necessário.

4.3 Microrganismo

Foi utilizada a linhagem de levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* CLM 42.4 (SSS11) proveniente de material lignocelulósico em decomposição encontrado na Mata Atlântica brasileira, isolada pelo grupo de pesquisa em Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Carlos A. Rosa ao laboratório do GMBio / LBios (EEL – USP). O microrganismo encontra-se depositado na Coleção de Microrganismos, DNA e Células da UFMG.

A cultura estoque foi mantida em placa contendo meio YMA sólido, de onde foram transferidas para o preparo dos inóculos utilizados nas fermentações. Antes das fermentações as células foram analisadas microscopicamente, a partir do preparo de lâminas fixadas e coradas com fucsina.

4.4 Fermentação em frascos *Erlenmeyer*

Foi realizado, primeiramente, um experimento em frascos *Erlenmeyer*, utilizando planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, a fim de estudar a influência da agitação e da relação V_m/V_f na produção de biossurfactante. A relação V_m/V_f é utilizada em experimentos empregando frascos *Erlenmeyer* cujo objetivo é avaliar o impacto da aeração na produção do bioproduto de interesse (FONTES et al, 2010).

As fermentações foram conduzidas a 30 ºC, em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo diferentes volumes de meio (50 mL, 150 mL e 250 mL) descrito no item 4.2.3 e em diferentes agitações e relações V_m/V_f, conforme a Tabela 5 abaixo:

Tabela 5 - Planejamento fatorial 2^2 completo com triplicata no ponto central das fermentações realizadas utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*.

Ensaio	Nível (X_1)	Nível (X_2)	Agitação (rpm) (X_1)	Relação V_m/V_f* (X_2)	Volume meio (mL)
1	-1	-1	100	0,1	50
2	+1	-1	250	0,1	50
3	-1	+1	100	0,5	250
4	+1	+1	250	0,5	250
5	0	0	175	0,3	150
6	0	0	175	0,3	150
7	0	0	175	0,3	150

X_1 = Agitação (rpm) e $X_2 = V_m/Vf$. *Vm/Vf: Volume de meio por volume do frasco.

Fonte: Autoria própria.

Alíquotas foram retiradas em 24, 48, 72 e 96 h, centrifugadas a 1169 g por 15 min, separando-se a biomassa celular e o sobrenadante. Foram analisadas as concentrações de células, o pH do sobrenadante, o Índice de Emulsificação (I.E.) e a Tensão Superficial (T.S.) ao final da fermentação.

4.5 Fermentações em biorreator de bancada

No presente trabalho foi utilizado o biorreator modelo Bioengineering AG Tipo KLF2000 (Fabricante Bioengineering / volume máximo de trabalho de 2,4 L), do tipo STR (*Stirred Reactor Tank*), equipado com sensores de pH, de temperatura, de oxigênio dissolvido (DO), 4 chicanas removíveis, um eixo agitador com dois impelidores do tipo

Rushton (disco de lâminas) em aço inox AISI 316 L, um condensador em vidro equipado com filtro exaustor de membrana 0,2 µm e um dispositivo de aeração equipado com anel aspersor e filtro de membrana 0,2 µm (Figura 7).

Figura 7 - Reator Bioengineering AG.

Fonte: Autoria própria.

O biorreator foi operado em modo descontínuo, a 30 °C, contendo aproximadamente 1,0 g/L de células, inoculadas após preparo do inóculo descrito no item 4.2.2 e 1,0 L do meio descrito no item 4.2.3, sob diferentes níveis de agitação e aeração, conforme planejamento fatorial completo 2^2 completo com triplicata no ponto central mostrado na Tabela 6:

Tabela 6 - Planejamento fatorial 2^2 completo com triplicata no ponto central das fermentações utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada.

Ensaio	Nível (X_1)	Nível (X_2)	Agitação (rpm) (X_1)	Aeração (vvm) (X_2)	Aeração (mL/min) (X_2)
1	-1	-1	150	0,5	500
2	+1	-1	250	0,5	500
3	-1	+1	150	1,0	1000
4	+1	+1	250	1,0	1000
5	0	0	200	0,75	750
6	0	0	200	0,75	750
7	0	0	200	0,75	750

X_1 = Agitação (rpm) e X_2 = Aeração (vvm)

Fonte: Autoria própria.

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa) foi calculado no início de cada ensaio. Amostras foram retiradas em 24, 48, 72 e 96 h, quando a fermentação foi interrompida. As amostras foram centrifugadas a 1169 g por 15 min, separando-se a biomassa celular do sobrenadante, o qual foi utilizado na determinação do pH, consumo de açúcares e nos testes para estudo das propriedades emulsificantes e tensoativas dos biossurfactantes.

As respostas dos ensaios foram dadas pela medida do I.E. (Y_1) e T.S. (Y_2) e foram analisadas pelo Método de Superfície de Resposta (MSR), com o auxílio do software *Statistica 7.0* (Stasoft). Os níveis de agitação e de aeração propostos foram baseados nos que constam na revisão de Fontes, Amaral e Coelho (2008). Aerações em níveis maiores podem favorecer a formação de espuma no sistema, o que prejudicaria o processo (ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2000).

4.6 Métodos Analíticos

4.6.1 Quantificação de células

No experimento realizado em frascos *Erlenmeyer*, a quantificação de células foi realizada utilizando uma curva previamente preparada por Marcelino (2016), que correlaciona a absorbância a 600 nm com o número de células/mL. Esta curva foi preparada utilizando a escala “Mc Farland” adaptada para correlacionar o número de células totais de leveduras com absorbância a 600 nm (LEVI, 2003).

No experimento realizado em biorreator de bancada, a quantificação de células das amostras foi realizada por gravimetria, ou seja, após as amostras coletadas serem centrifugadas a 1169 g por 15 min, o precipitado foi ressuspendido em mesmo volume inicial de água destilada. Após homogeneização, 5 mL da suspensão de células foi colocado em cadinho de papel alumínio previamente pesado e levado em estufa a 60 ºC até peso constante (após aproximadamente 48 h). O cálculo da concentração de células foi realizado levando-se em conta o peso final de células encontrado em cada amostra.

4.6.2 Determinação do pH

O pH dos hidrolisados e das amostras das fermentações foram determinados por potenciometria utilizando o aparelho pH-metro *Sppencer Scientific* SP3611.

4.6.3 Determinação da condutividade

A condutividade dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar foram determinadas por condutimetria utilizando aparelho condutivímetro GEHAKA CG 1800.

4.6.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Alíquotas de 2,0 mL de amostras dos hidrolisados foram devidamente diluídas e tiveram seus pH ajustados para 12 com NaOH 6 eqg/ L e a concentração de fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria à 280 nm como descrito no item 4.6.9.

4.6.5 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, ácido fórmico, glicerol, xilitol e etanol

As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro *Sep-Pak* C18 (*Milipore*) para a determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, ácido fórmico, glicerol, xilitol e etanol. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo *Agilent Technology*, serie A1100 (EUA), nas seguintes condições: coluna *Bio-Rad* AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C, volume de injeção de 20 µL, detector de índice de refração *Agilent*, fase móvel H_2SO_4 0,01 eqg / L e fluxo de 0,6 mL/min.

4.6.6 Determinação dos teores de furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural)

Para a análise das concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural, as amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna *Agilent Zorbax Eclipse Plus* C18, (4,6 mm x 100 mm, 3,5 micras) mantida à temperatura de 25 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de ultra-violeta UV-VIS (276 nm); fase móvel acetonitrila / água 1:8 e fluxo de 0,8 mL/min.

4.6.7 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi determinado pela metodologia de "gassing-out" (PIRT, 1975). Inicialmente o meio de cultivo isento de células foi degaseificado com nitrogênio, com o objetivo de reduzir a zero o teor de oxigênio dissolvido no meio. O meio foi então agitado e aerado de acordo com as condições desejadas, monitorando-se o aumento da concentração do oxigênio dissolvido em função do tempo. Por integração da equação de balanço de oxigênio no meio líquido (Equação 1) foi possível obter a relação apresentada na Equação 2:

$$\frac{dC}{dt} = \mathrm{kLa}\ (\mathrm{C}* - \mathrm{C}) \qquad (1)$$

$$ln\left(1 - \frac{C}{C*}\right) = -kLa\ x\ t \qquad (2)$$

onde C/C* corresponde à leitura do eletrodo (fração da concentração de oxigênio dissolvido em relação à concentração de saturação). O gráfico do logaritmo de (1 – C/C*) em função do tempo permite a determinação do valor de k_La em h^{-1}.

4.6.8 Análise das propriedades físicas dos biossurfactantes

Os sobrenadantes obtidos no final das fermentações foram submetidos aos testes de índice de emulsificação (I.E.) (CHEN; BAKER; DARTON, 2007) e de tensão superficial (T.S.) para se verificar a produção e as características de superfície ativa dos biossurfactantes obtidos. Aproximadamente 1,0 mL de cada amostra foi utilizado em cada teste.

4.6.8.1 Determinação do índice de emulsificação (I.E.)

A determinação do índice de emulsificação nos sobrenadantes foi realizada de acordo com uma adaptação da metodologia descrita por Chen, Baker e Darton (2007) a fim de se obter uma medida indireta do biossurfactante produzido. Para tanto, foram adicionados em um tubo de ensaio 1,0 mL da amostra e 1,0 mL de querosene e o tubo foi submetido a agitação de 9000 rpm em vórtex (PHOENIX AP56) por 1 minuto. O índice de emulsificação pode ser expresso em porcentagem (%), sendo a razão entre a altura da camada emulsiva e a altura total da coluna do líquido, medidas após 2 e 24 horas da realização do teste, de acordo com a Equação 3:

$$\mathrm{I.E.} = \frac{altura\ da\ camada\ emulsificada}{altura\ total\ do\ líquido} \times 100\% \quad (3)$$

4.6.8.2 Determinação da tensão superficial (T.S.)

Para a determinação da tensão superficial dos biossurfactantes foi utilizado o método da gota pendente utilizando-se 200 µL do sobrenadante das amostras obtidas no tempo 96h das fermentações, um tensiômetro digital (Kruss FM40 – Easy Drop) e o software DropShape analysis.

4.6.8.3 Determinação da estabilidade emulsificante (E.E.)

A estabilidade das emulsões formadas no teste de aplicação do biossurfactante obtido em biorreator de bancada foi avaliada por meio da repetição do cálculo do índice de emulsificação (I.E.) (item 4.6.8.1) em diferentes tempos para verificar se houve perda da estabilidade emulsificante dos biossurfactantes. Os tempos para a reavaliação do I.E. e cálculos de estabilidade foram 2, 24 e 480 h após a realização do teste. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.6.9 Determinação de lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro (Beckman modelo DU 800). Desta forma, alíquotas de 2,0 mL provenientes da fração líquida do material armazenado foram diluídas em balões

volumétricos e alcalinizadas com solução de NaOH 6 mol / L até atingirem pH 12,0 e analisadas por espectroscopia de UV. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme as Equações 6 e 7, conforme descrito por Gouveia et al. (2009). Considerou-se a concentração compostos fenólicos equivalente a de lignina solúvel.

$$\textit{Conc. De Lignina solúvel} = (4{,}187\text{x}10^{-2} * (A_{t280} - A_{pd280}) - 3{,}279\text{x}10^{-4}) \quad (6)$$

$$A_{pd280} = (C_{Furf} * \varepsilon_{Furf}) + (C_{HMF} * \varepsilon_{HMF}) \quad (7)$$

Onde:

a) Conc. De lignina solúvel: concentração de lignina solúvel ($g.L^{-1}$);
b) A_{t280}: absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação em 280 nm;
c) A_{pd280}: absorbância em 280 nm dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-hidroximetilfurfural), cujas concentrações C_{Furf} e C_{HMF} foram determinadas previamente por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e ε_{Furf} e ε_{HMF} são as absortividades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 $L.g^{-1}.cm^{-1}$, conforme determinado experimentalmente por Rocha et al. (1997).

4.6.10 Retirada de amostra de espuma do reator

Após 96 h de fermentação o meio foi retirado do reator e separado para futuras análises. Adicionou-se 1500 mL de água destilada no reator e ligou-se a agitação em 500 rpm por 40 min para que a espuma que tinha ficado aderida nas paredes do reator se solubilizasse na água. Após esse período retirou-se 10 mL de amostra, centrifugou-se a 1169 g por 15 min para a separação das células. O sobrenadante foi utilizado para análise de I.E. e o precipitado foi ressuspendido em 10 mL de água destilada. A concentração de células foi calculada por gravimetria, conforme descrito no item 4.6.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA)

O hidrolisado hemicelulósico resultante da hidrólise ácida diluída do bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado antes e após a destoxificação com emprego de carvão ativo, processo que tem como objetivo reduzir o teor de compostos tóxicos provenientes da hidrólise, tais como o ácido acético, o furfural e hidroximetilfurfural e os compostos fenólicos (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000a).

Tabela 7 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.

		Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar	
		HHBCA Concentrado e não-destoxificado	**HHBCA Concentrado e destoxificado**
Parâmetros	pH	0,53	5,53
	Condutividade (µS/cm)	39,63 ± 0,309	9,27 ± 0,085
Componentes (g/L)	Xilose	70,63 ± 0,818	69,77 ± 0,508
	Arabinose	5,3 ± 0,073	5,21 ± 0,015
	Glicose	4,27 ± 0,023	4,38 ± 0,045
	Ácido Acético	2,17 ± 0,073	2,32 ± 0,15
Componentes (mg/L)	Furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural)	240,75 ± 5,861	58,84 ± 1,138
	Fenóis totais	6604	743

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, a partir dos dados das análises cromatográficas, nota-se que a xilose é o monossacarídeo em maior concentração nestes hidrolisados (aproximadamente 88,07 %), seguida pela arabinose (6,61 %) e glicose (5,32 %), já que a hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar tem em sua constituição polissacarídeos como a xiloglucana (GIRIO et al., 2010).

Quanto ao método de destoxificação empregado, pode-se verificar também na Tabela 7 que, apesar de não ter reduzido a quantidade de ácido acético, o mesmo proporcionou a redução de 75,6 % de furanos e 88,8% de fenóis totais e as concentrações de furanos, fenólicos e ácido acético ficaram abaixo das concentrações consideradas prejudiciais à viabilidade celular para alguns microrganismos fermentativos (furanos < 1 g/L; fenólicos < 1 g/L e ácido acético < 5 g/L) (VILLA, 1998; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000a; 2000b; SILVA; CHANDEL, 2014).

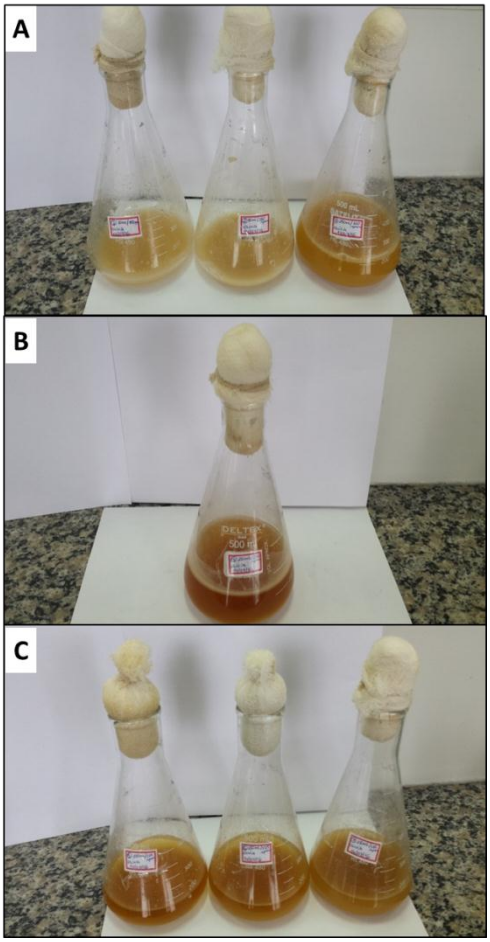
Apesar do processo de destoxificação também ter ocasionado uma pequena perda nas concentrações dos açúcares xilose e arabinose, cujas reduções foram de 1,22 %, 1,70 %, respectivamente, a xilose ainda representa 87,92 % dos açúcares presentes no hidrolisado destoxificado, o que pode ser considerado um indicador de que as condições de hidrólise empregadas foram eficientes e favoráveis à solubilização dos açúcares contidos na fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar. Este efeito da destoxificação do hidrolisado em função da remoção parcial do ácido acético, furanos, compostos fenólicos e também a perda de açúcares tem sido constatado em outros trabalhos (ARRUDA et al., 2008).

Quanto à condutividade, sabe-se que íons e partículas presentes no hidrolisado não-destoxificado podem interferir nas propriedades emulsificantes e tensoativas dos biossurfactantes produzidos por meio da força iônica do meio (DALTIN, 2011; MARCELINO, 2016). Observa-se na Tabela 7, que a condutividade do hidrolisado após a destoxificação reduziu de 39,63 µS/cm para 9,27 µS/cm, indicando uma menor concentração de íons e partículas no meio e, consequentemente, uma reduzida força iônica, o que pode ocasionar maior estabilidade das emulsões formadas pelo biossurfactante produzido (MARCELINO, 2016).

5.2 Fermentações em frascos *Erlenmeyer*

Considerando-se que ainda não existem relatos na literatura sobre a influência da agitação e da aeração na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, foram realizados primeiramente experimentos em frascos *Erlenmeyer*, utilizando o meio de fermentação descrito no item 4.2.3 e variando-se os parâmetros agitação e razão V_m/V_f (Figura 8). Esta razão entre volumes é, juntamente com a agitação, uma forma de variar as condições de aeração em frascos *Erlenmeyer*. De fato, para maiores valores de razão V_m/V_f há menor área superficial do líquido em contato com o ar, reduzindo as trocas gasosas e limitando a disponibilidade de oxigênio para o microrganismo.

Figura 8 - Fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio baseado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, em frascos *Erlenmeye*r: A – Ensaios 1 (V_m = 50 mL), 2 (V_m = 50 mL) e 3 (V_m = 250 mL); B – Ensaio 4 (V_m = 250 mL); C – Ensaios 5 (V_m = 150 mL), 6 (V_m = 150 mL) e 7 (V_m = 150 mL).



Fonte: Autoria própria.

Os ensaios foram realizados de acordo com um planejamento estatístico fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central, resultando nos dados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados obtidos nos experimentos realizados conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central para a análise da influência das variáveis agitação e razão V_m/V_f na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*.

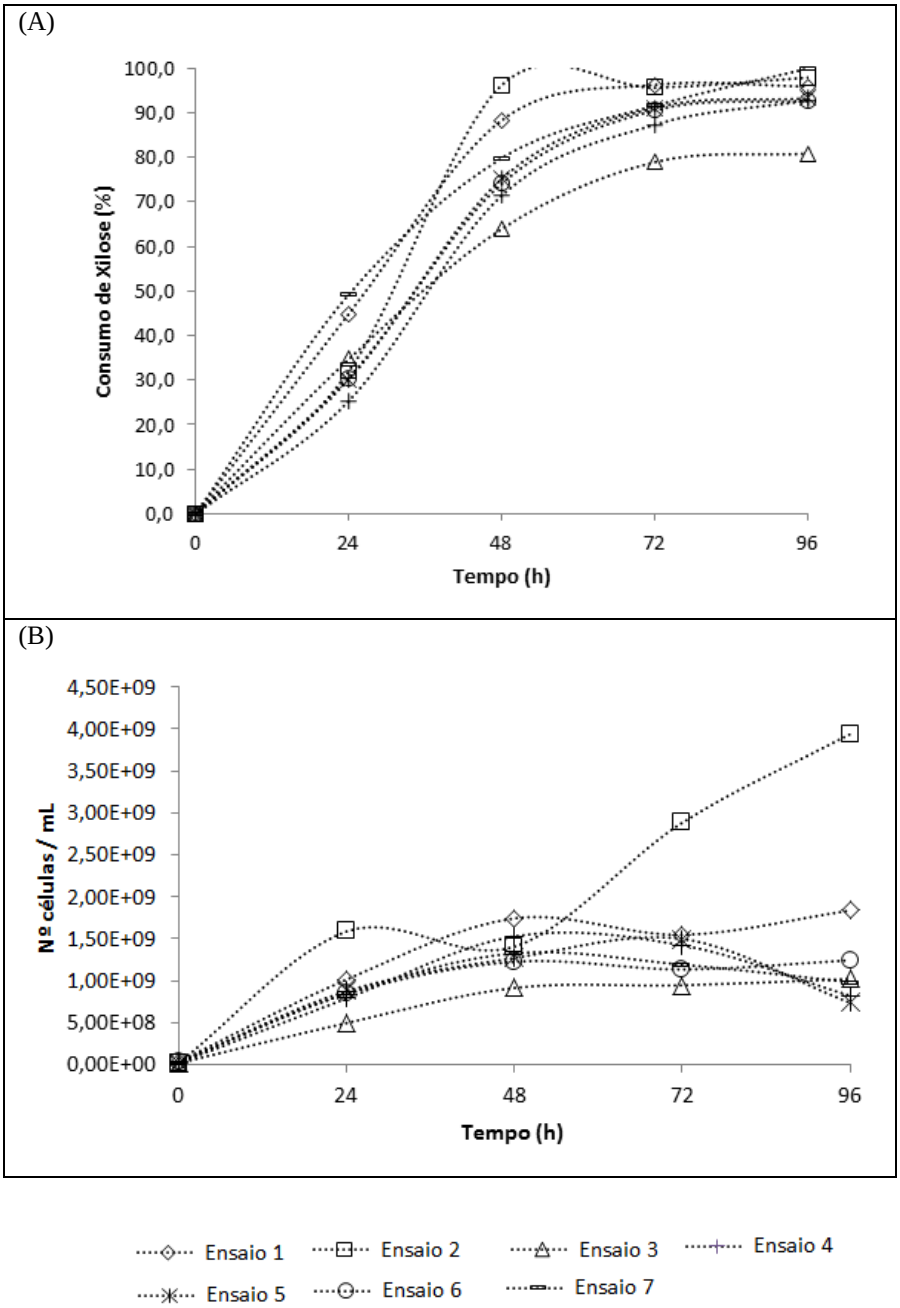
Ensaio	Agitação (rpm) (X_1)	Relação V_m/V_f* (X_2)	Consumo de Xilose em 96 h (%)	Nº células / mL em 96 h	pH final	I.E.$_2$ (%)	I.E.$_{24}$ (%)	T.S. (mN/m)
1	100 (-1)	0,1 (-1)	95,9	$1,84 \times 10^9$	3,86	62,5	62,5	55,2
2	250 (+1)	0,1 (-1)	97,9	$3,94 \times 10^9$	3,83	66,7	58,3	56,4
3	100 (-1)	0,5 (+1)	80,9	$1,02 \times 10^9$	4,80	41,7	41,7	55,3
4	250 (+1)	0,5 (+1)	92,8	$0,82 \times 10^9$	4,12	68,8	68,8	52,5
5	175 (0)	0,3 (0)	93,3	$0,74 \times 10^9$	4,06	62,5	62,5	54,0
6	175 (0)	0,3 (0)	92,7	$1,25 \times 10^9$	4,07	58,8	58,8	54,2
7	175 (0)	0,3 (0)	99,9	$0,99 \times 10^9$	4,09	61,5	61,5	53,4

X_1 = Variável resposta agitação (rpm) – valor codificado entre parênteses; X_2 = Variável resposta V_m/Vf – valor codificado entre parênteses. *Vm/Vf: Volume de meio por volume do frasco; I.E.$_2$: Índice de Emulsificação observado 2 h após o teste; I.E.$_{24}$: Índice de Emulsificação observado 24 h após o teste; T.S.: Tensão Superficial.

Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar, pelos resultados mostrados na Tabela 8 que, em 96 h de fermentação, mais de 90 % da xilose já havia sido consumida, independentemente da agitação e da relação V_m/V_f, exceto no ensaio nº 3, que foi submetido à menor agitação (100 rpm) e maior relação V_m/V_f (0,5). Provavelmente, tal combinação de agitação e razão V_m/V_f ocasionou uma baixa transferência de massa das moléculas de oxigênio e dos componentes do meio para as células, o que resultou em uma concentração celular final de $1,02 \times 10^9$ nº células/ mL, no menor consumo de xilose (80,9 %) e, consequentemente em uma baixa produção de biossurfactante (I.E.$_{24}$= 41,7 %). Estes dados também podem ser verificados nas Figuras 9A-B, que mostram o perfil de consumo de xilose e do crescimento celular durante as fermentações.

Figura 9 - Perfil de consumo de xilose (A) e do crescimento celular da levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* durante as fermentações realizadas utilizando meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*.



Fonte: Autoria própria.

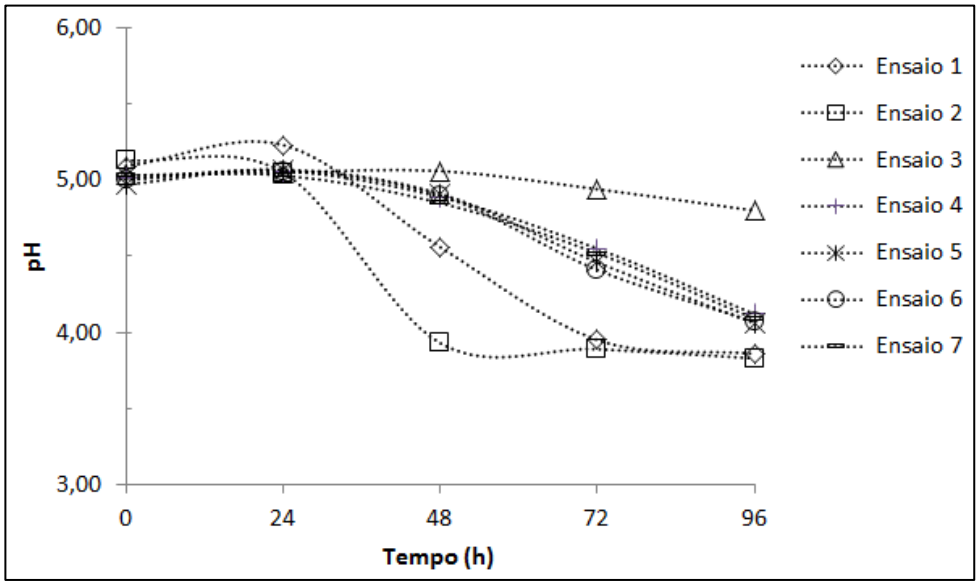
Observa-se ainda pela Tabela 8 e pelas Figuras 9A-B, que no ensaio nº 2, no qual se empregou a maior agitação (250 rpm) e a menor relação V_m/V_f (0,1, ou seja, maior interface entre oxigênio e o meio), ocorreu o segundo maior valor de consumo de xilose (97,9%), a maior concentração de células ao final da fermentação (3,94 x 10^9 nº células / mL) e o segundo valor mais alto de I.E.$_2$ (66,7%). Tais dados indicam que a combinação entre os parâmetros de agitação e da razão V_m/V_f utilizados neste ensaio foram eficientes

na produção de biossurfactante, apesar do índice de emulsificação ($I.E._{24}$) ter caído para 58,3%, após 24h do teste, o que evidenciou uma menor estabilidade da emulsão, quando comparado aos demais ensaios.

No ensaio nº 4, no qual se empregou a maior agitação (250 rpm) e a maior relação V_m/V_f (0,5), verificou-se um baixo crescimento celular (0,82 x 10^9 nº células/ mL), consumo de xilose de 92,8 % e a maior produção de biossurfactante ($I.E._{24}$ = 68,8 % e T.S. = 52,5 mN/m). Estes dados indicam que a combinação entre maior agitação e maior razão V_m/V_f ocasionou uma transferência de massa satisfatória das moléculas de oxigênio e dos componentes do meio para as células, o que favoreceu a produção de biossurfactante. Fontes et al. (2010) também constataram aumento da produção de biossurfactante pela levedura *Y. lipolytica*, em meio semi-sintético contendo glicose como fonte de carbono, quando a agitação dos frascos *Erlenmeyer* foi aumentada de 160 para 250 rpm. Estes autores também verificaram que o aumento da relação V_m/V_f de 0,3 para 0,5 aumentou a produção de biossurfactante de aproximadamente 27,5 % para 38,9 %. Uma possível explicação se deve à formação de espuma na condição de V_m/V_f igual a 0,3 e diminuição significativa da concentração celular após 24 h (de aproximadamente 7 g/L para aproximadamente 3 g/L) devido à migração de células para a espuma formada, resultando em baixa produção de biossurfactante no meio de cultivo. A formação de espuma observada pode estar relacionada à redução da razão V_m/V_f, que modifica significantemente a oxigenação do meio, porque aumenta a área interfacial gás-líquido (FONTES et al., 2010). Além disso, a espuma pode diminuir a eficiência de transferência de oxigênio e remover células e moléculas de biossurfactantes, diminuindo a presença destes metabólitos no meio (WEI; CHOU; CHANG, 2005).

O perfil da variação do pH do meio de cultivo durante as fermentações é mostrado na Figura 10.

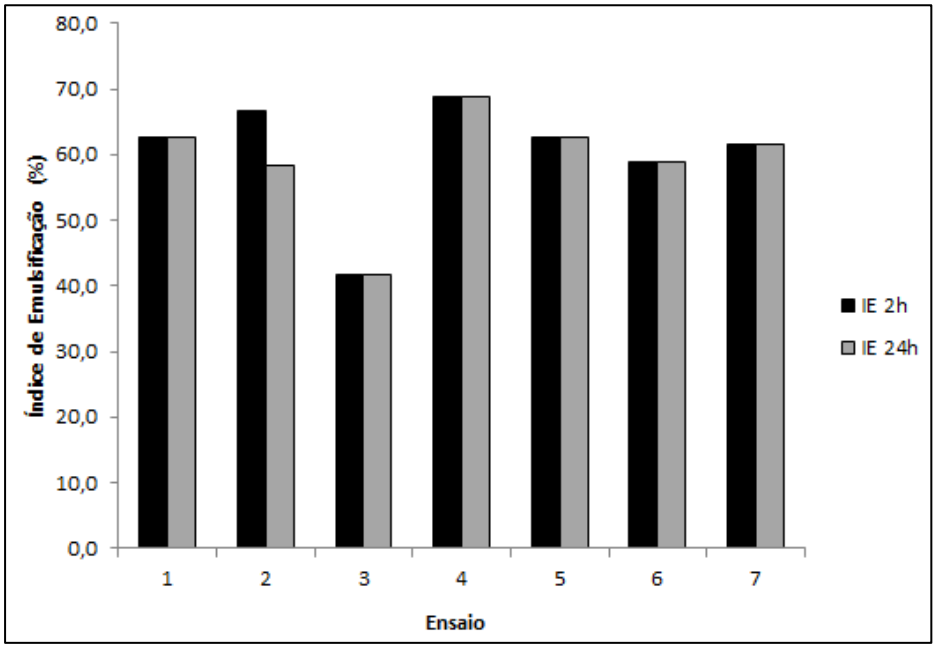
Figura 10 - Perfil da variação do pH do meio de cultivo durante as fermentações realizadas utilizando meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*.



Fonte: Autoria própria.

Observa-se na Figura 10 que ocorreu um decréscimo do pH do meio de cultivo durante as fermentações, porém, apesar de Bednarski et al. (2004) terem mostrado em seu estudo que mantendo o pH em 5,5 obteve-se maior produção de glicolipídeos por leveduras do gênero *Candida sp*. e que quando não se ajustou o pH no meio de cultura, obteve-se um efeito negativo na eficiência da síntese do bioproduto, no caso do presente estudo, a queda do pH aparentemente não impediu a produção do biossurfactante. Isto pode ser evidenciado pelos resultados obtidos no teste de índice de emulsificação (I.E.) realizado com os sobrenadantes das amostras retiradas ao final da fermentação (96 h), os quais indicaram a presença de biossurfactante no meio, conforme Figura 11.

Figura 11 - Índice de Emulsificação (I.E.) das amostras do tempo final (96 h) das fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*, após 2 e 24 h da realização do teste.



Fonte: Autoria própria.

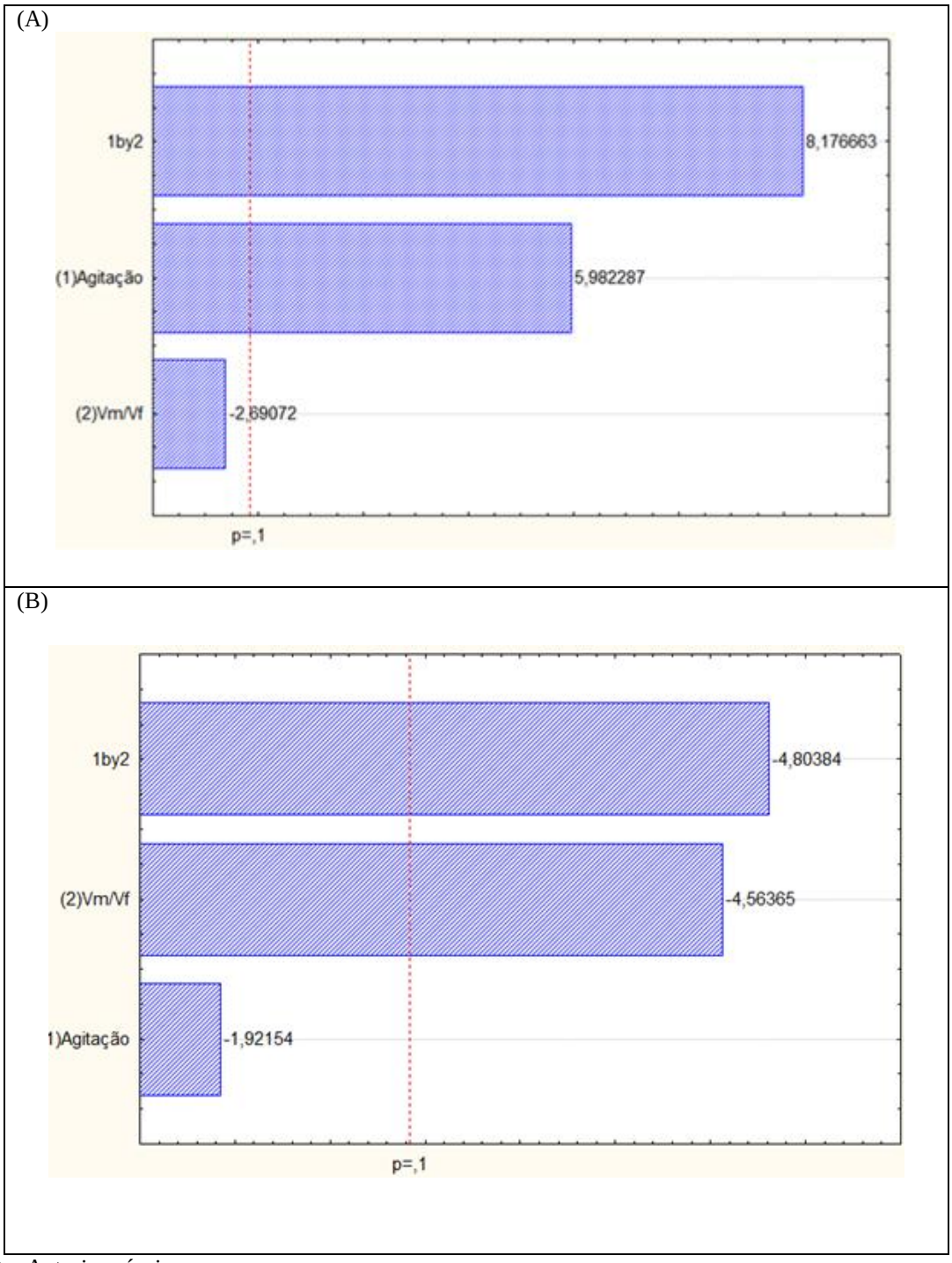
Verifica-se pela Tabela 8 e Figura 11 que todos os ensaios tiveram I.E. maiores do que 50%, exceto o ensaio nº 3, no qual o $I.E._2$ foi de 41,7 %. Sendo assim, pode-se inferir que a produção de biossurfactantes em frascos *Erlenmeyer* foi eficiente, uma vez que, segundo Haba e colaboradores (2000) e Batista e colaboradores (2006), substâncias bioemulsificantes com I.E. maiores que 50% são eficientes para processos industriais. Os maiores valores de $I.E._2$ foram obtidos nos frascos nº 2 e nº 4 (66,7% e 68,8%, respectivamente), os quais foram submetidos à agitação de 250 rpm e razão V_m/V_f de 0,1 e 0,5, respectivamente. Parece evidente que a agitação maior (250 rpm) foi uma condição favorável à produção de biossurfactante, independentemente da razão V_m/V_f. Tais resultados podem ter sido devidos ao efeito que maiores agitações exercem na excreção de biossurfactantes no meio. O aumento na velocidade de agitação possivelmente favorece a liberação de biossurfactantes conectados às paredes celulares de leveduras, aumentando a quantidade de surfactantes livres no meio de cultura (FONTES et al., 2010).

A obtenção de maiores índices de emulsificação em frascos *Erlenmeyer* submetidos a agitações maiores pode estar relacionada à função fisiológica dos biosurfactantes. É sugerido por Fontes et al. (2010) que a produção de biossurfactante por levedura pode aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em água e, consequentemente, facilitar

o transporte de nutrientes para o microrganismo, uma vez que o aumento da agitação poderia tornar o contato entre as gotas da fase orgânica (dispersa em água) e o microrganismo mais difícil e este fato induziria uma maior excreção de biossrufactante no meio (FONTES et al., 2010). O oposto pode ocorrer com outros microrganismos: um aumento na velocidade de agitação pode resultar em redução da produção de biossurfactante devido ao efeito de cisalhamento, que poderia causar stress celular (MOUSSA; AHMED; ABDEL-HAMID, 2006), entretanto, no caso de leveduras, Desai e Banat (1997) mencionaram que a produção de biossurfactante usualmente aumenta com o aumento da velocidade de agitação e com a aeração. Yeh, Wei e Chang (2006) e Amaral, Silva e Lehocky (2006), também mencionaram que a produção de biossurfactante, tanto por bactéria, quanto por levedura, aumentou com o aumento da velocidade de agitação.

As constatações feitas anteriormente de que maiores agitações e maior razão V_m/V_f (ou seja, menor interface entre oxigênio e o meio) são favoráveis à produção de biossurfactante por *C. mucoides* em frascos *Erlenmeyer* podem ser confirmadas pela análise estatística, realizada com o auxílio do software *Statistica* 7.0, para as variáveis resposta $I.E._{24}$ e T.S., utilizando-se os dados mostrados na Tabela 9. Os gráficos de Pareto obtidos são mostrados na Figura 12A-B.

Figura 12 - Gráfico de Pareto para efeitos padronizados das variáveis agitação e razão V_m/V_f nas variáveis resposta I.E.24 e T.S. correspondentes às fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em frascos *Erlenmeyer*. A - considerando a resposta I.E.$_{24}$; B – considerando a resposta T.S..



Fonte: Autoria própria.

Conforme mostrado na Figura 12A, para a resposta I.E.$_{24}$, a variável agitação e a interação entre esta e a razão V_m/V_f apresentaram efeitos significativos na produção de

biossurfactante ao nível de confiança de 90%. Na Figura 12B pode-se observar que, para a resposta T.S., as variáveis significativas foram o fator V_m/V_f e também a interação entre agitação e V_m/V_f.

Buscou-se então a composição de modelos de primeira ordem para as variáveis resposta consideradas em função da agitação e razão V_m/V_f, sendo estes apresentados nas Equações 3 e 4 e a análise de variância (ANOVA) correspondente na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) para os modelos de primeira ordem ajustados para as respostas I.E.$_{24}$ e T.S. considerando-se os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central conduzido em frascos *Erlenmeyer* para avaliação do efeito das variáveis agitação e razão V_m/V_f na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes.

Fatores	**I.E.$_{24}$ (%)**					**T.S. (mN/m)**				
	SQ	**GL**	**QM**	**F**	**p-valor**	**SQ**	**GL**	**QM**	**F**	**p-valor**
Modelo	402,55	3	134,18	36,63	0,0267**	8,25	3	2,75	15,87	0,0599*
X_1	131,10	1	131,10	35,79	0,0268**	0,640	1	0,640	3,69	0,195
X_2	26,52	1	26,52	7,24	0,1148	3,61	1	3,61	20,83	0,0448**
X_1 X_2	244,92	1	244,92	66,86	0,0146**	4,00	1	4,00	23,08	0,0407**
Falta de Ajuste	16,56	1	16,56	4,52	0,1673	1,66	1	1,66	9,56	0,0906
Erro Puro	7,33	2	3,66			0,347	2	0,173		
Total	426,44	6				10,25	6			
R^2	0,982					0,960				

X_1 – Agitação (rpm); **X_2** – V_{meio}/V_{frasco}; **X_1X_2** – interações entre os fatores; **SQ** – soma dos quadrados; **GL** – graus de liberdade; **QM** – média quadrática; **F –** teste F; *p-valor < 0,1: significativo para intervalo de 90% de confiança; **p-valor < 0,05: significativo para intervalo de 95% de confiança.
Fonte: Autoria própria

I.E.$_{24}$ (%) = $57,83 + 5,72X_1 – 2,58X_2 + 7,83X_1X_2$ (Equação 3)

TS (%) = $54,85 – 0,40X_1 – 0,95X_2 – 1,00X_1X_2$ (Equação 4)

Em que:

X_1 – agitação (valor real em rpm);

X_2 – relação V_m/V_f (valor real);

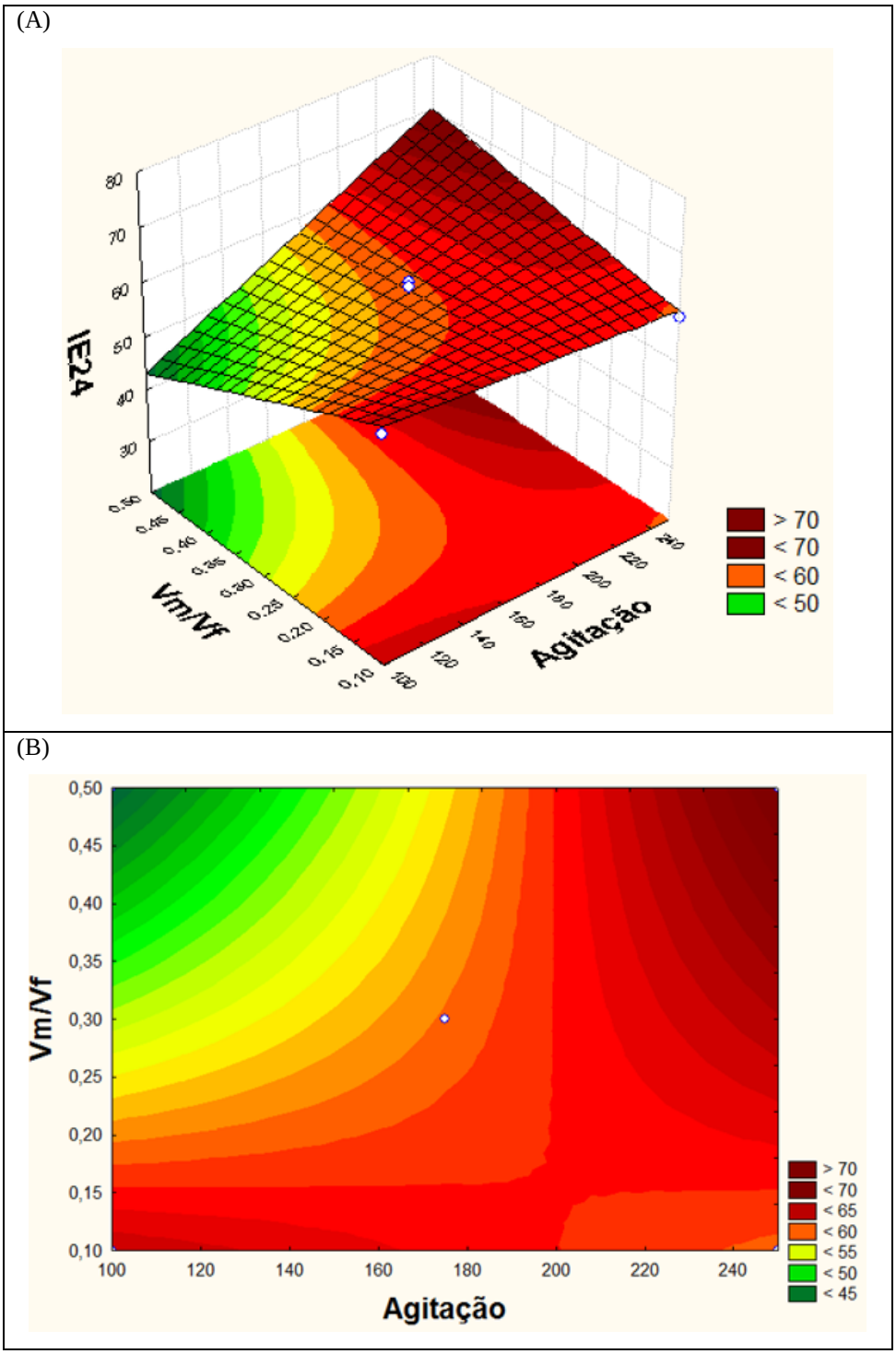
X_1X_2 – interação entre os fatores.

A análise de variância indicou que os modelos de primeira ordem são adequados para explicar a variabilidade experimental observada na faixa de valores estudados. O modelo de primeira ordem ajustado para a resposta I.E.$_{24}$ foi significativo para um intervalo de 95% de confiança (p-valor de 0,0267), sendo que, na faixa de valores estudada, é capaz de

explicar 98,2 % da variabilidade dos dados experimentais (R^2 de 0,982), sem falta de ajuste significativa. O modelo ajustado para a resposta T.S., por sua vez, foi significativo para um intervalo de confiança de 90% (p-valor de 0,0599) e, na faixa de valores estudada, embora tenha uma falta de ajuste significativa para um nível de 90% de confiança (p-valor de 0,0906), pode explicar 96,0 % da variabilidade dos dados experimentais (R^2 de 0,960).

As superfícies de resposta e curvas de nível correspondentes aos modelos obtidos para as variáveis resposta $I.E._{24}$ e T.S. são mostradas nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Figura 13 - Superfície de resposta (A) e curvas de nível (B) para a variável resposta I.E.$_{24}$ correspondentes ao modelo ajustado com base nos dados obtidos para produção de biossurfactantes utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* cultivada em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, em frascos *Erlenmeyer*.

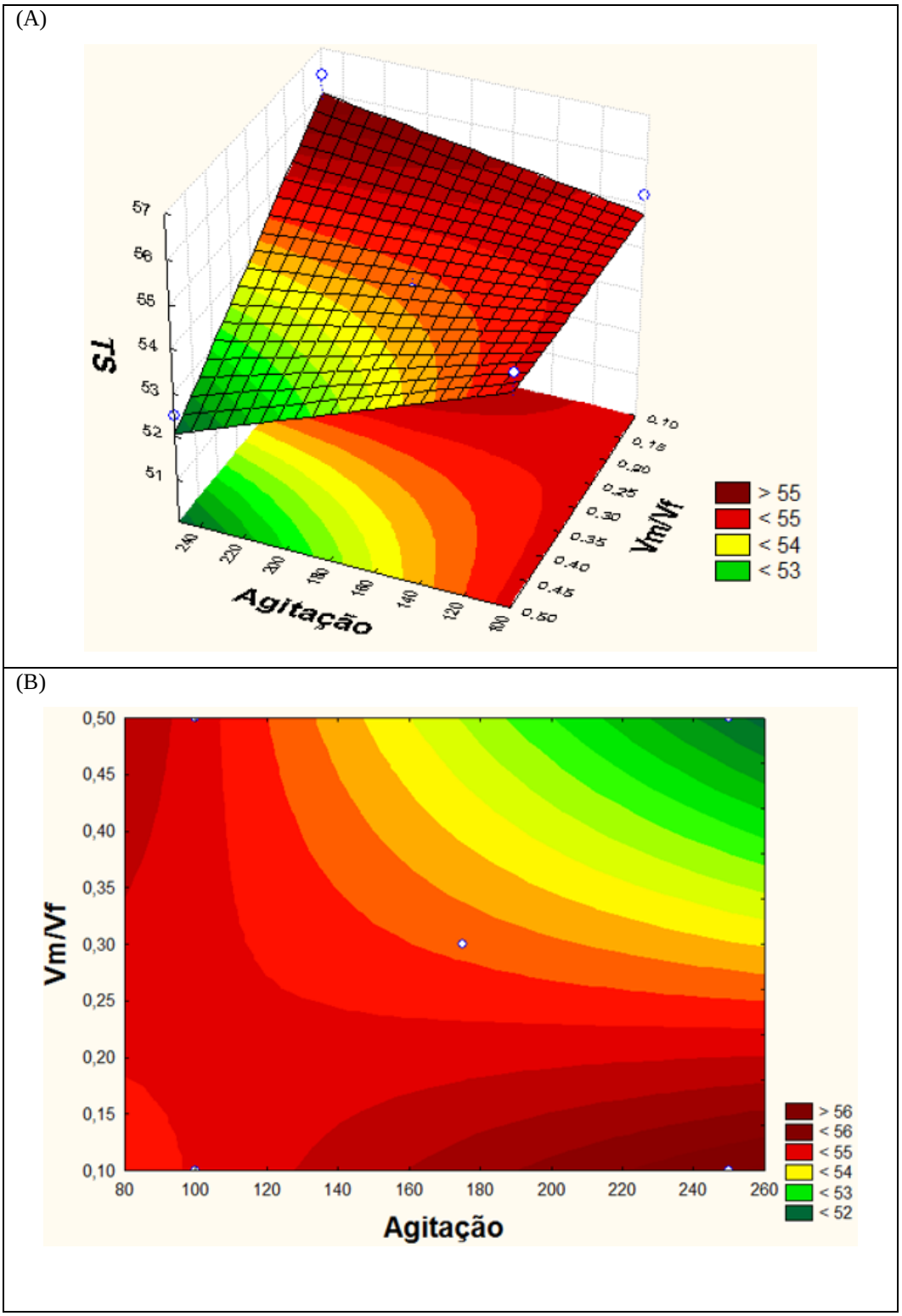


Fonte: Extraído do software *Statistica*.

A análise da Figura 13 mostra que maiores valores de I.E.$_{24}$ podem ser obtidos empregando-se maior agitação, sendo que, em valores de baixa agitação, a influência da

razão V_m/V_f torna-se mais importante, com maiores valores de $I.E._{24}$ observados para menores razões V_m/V_f. Para valores de elevada agitação, o efeito da razão V_m/V_f é menos pronunciado, com maiores valores de $I.E._{24}$ observados com maior razão entre volumes de meio e de frasco. Este fato pode ser corroborado pelos resultados obtidos no experimento n° 2 (V_m/V_f = 0,1) e n° 4 (V_m/V_f = 0,5), ambos submetidos ao maior nível de agitação (250 rpm), nos quais foi obtido maior valor de $I.E._{24}$ no ensaio n° 4.

Figura 14 - Superfície de resposta (A) e curvas de nível (B) para a variável resposta T.S. correspondentes ao modelo ajustado com base nos dados obtidos na produção de biossurfactantes utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* cultivada em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, em frascos *Erlenmeyer*.



Fonte: Extraído do software *Statistica*.

Pode-se observar na Figura 14 que quanto maior o nível de agitação e quanto maior a relação V_m/V_f, ou seja, quanto maior a quantidade de líquido no frasco e, portanto, menor a área interfacial entre ar e líquido, maior será a quantidade de biossurfactante produzido, pois menor será a T.S. obtida no meio, corroborando as análises feitas anteriormente.

5.3 Fermentação em biorreator de bancada

O experimento em reator de bancada foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da agitação e da aeração através de planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central, uma vez que ainda não existem relatos na literatura sobre a influência destes parâmetros de processo na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio baseado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. A Tabela 10 apresenta o delineamento do planejamento fatorial com as respostas obtidas nos ensaios. As fermentações conduzidas em biorreator de bancada utilizaram o meio de cultivo descrito no item 4.2.3 (Meio B).

Tabela 10 - Resultados obtidos nos experimentos realizados conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central para a análise da influência das variáveis agitação e aeração na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada.

Ensaio	Agitação (rpm) (X_1)	Aeração (vvm) (X_2)	Kla (h^{-1})	Consumo de Xilose em 96 h (%)	Concentração de células no meio (g/L) em 96 h	pH final (em 96 h)	I.E.$_2$ (%)	I.E.$_{24}$ (%)	T.S. (mN/m)
1	150 (-1)	0,5 (-1)	2,79	84,39	1,44	5,26	58,8	55,9	60,8
2	250 (+1)	1,0 (+1)	5,79	91,87	4,34	5,09	60,0	54,2	62,5
3	250 (+1)	0,5 (-1)	3,05	57,42	3,68	3,93	69,4	69,4	57,8
4	200 (0)	0,75 (0)	4,07	60,25	2,16	4,66	69,5	63,9	63,3
5	150 (-1)	1,0 (+1)	5,29	71,35	1,34	4,27	65,7	62,9	64,2
6	200 (0)	0,75 (0)	4,20	84,56	0,82	3,36	65.7	61,8	62,0
7	200 (0)	0,75 (0)	4,07	55,38	2,04	3,9	60.0	60,0	61,1

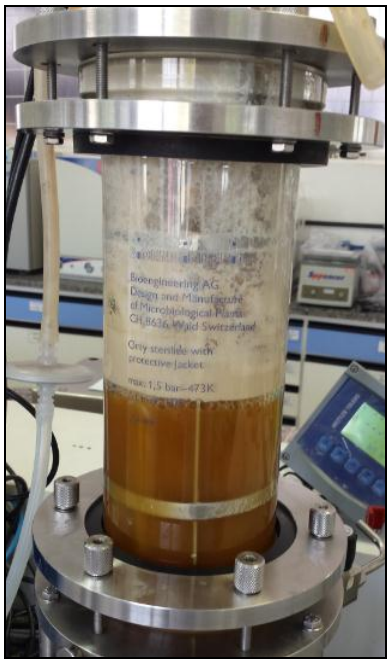
X_1 = Agitação (rpm); X_2 = Aeração (vvm); Valores codificados entre parênteses (-1, 0, +1) kla: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio; I.E.$_{24}$: Índice de Emulsificação 24 h após o teste; T.S.: Tensão Superficial.

Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar, pelos resultados da Tabela 10, que em 96 h de fermentação, mais de 55 % da xilose havia sido consumida em todos os experimentos, e que no ensaio nº 2, conduzido com a maior agitação (250 rpm) e a maior aeração (1,0 vvm), o consumo de xilose atingiu o maior valor (91,87%), a concentração de células presente no meio de fermentação foi a maior (4,34 g/L), entretanto, neste caso, o valor de I.E.$_{24}$ do meio foi o

mais baixo ($I.E._{24}$ = 54,2 %), se comparado aos resultados das demais fermentações. Em outros trabalhos realizados em biorreator, porém com levedura *Aureobasidium pullulans*, em meio sintético utilizando sacarose como fonte de carbono, foi constatada uma correlação entre o crescimento celular e a produção de biossurfactante, sendo que quanto maior a concentração celular, em geral, maior a produção de biossurfactante (LEATHERS et al., 2015). Há relatos também de que quanto maior a disponibilidade de oxigênio no meio, maior o crescimento celular e a produção de biossurfactante (SILVA; MUSSATO; ROBERTO, 2010; BRUMANO et. al., 2017), no caso de experimentos utilizando a levedura *Aureobasidium pullulans*. Entretanto, no caso do presente estudo, a baixa produção de biossurfactante no ensaio n° 2 ($I.E._{24}$ = 54,2 % e T.S. = 62,5 mN/m), no qual foi empregada a maior agitação (250 rpm) e maior aeração (1,0 vvm), pode ser explicada pela grande formação de espuma verificada durante o experimento, o que pode ter ocasionado a migração de células e do bioproduto para a espuma, diminuindo a presença de biossurfactante no meio. Em geral, durante a condução dos ensaios em biorreator de bancada foi observada grande formação de espuma, sendo que no experimento realizado com maior agitação e maior aeração (ensaio nº 2) observou-se uma quantidade maior da mesma, conforme Figura 15.

Figura 15 – Espuma formada no ensaio nº 2 conduzido em biorreator de bancada com agitação de 250 rpm e aeração de 1,0 vvm, no tempo final (96h).

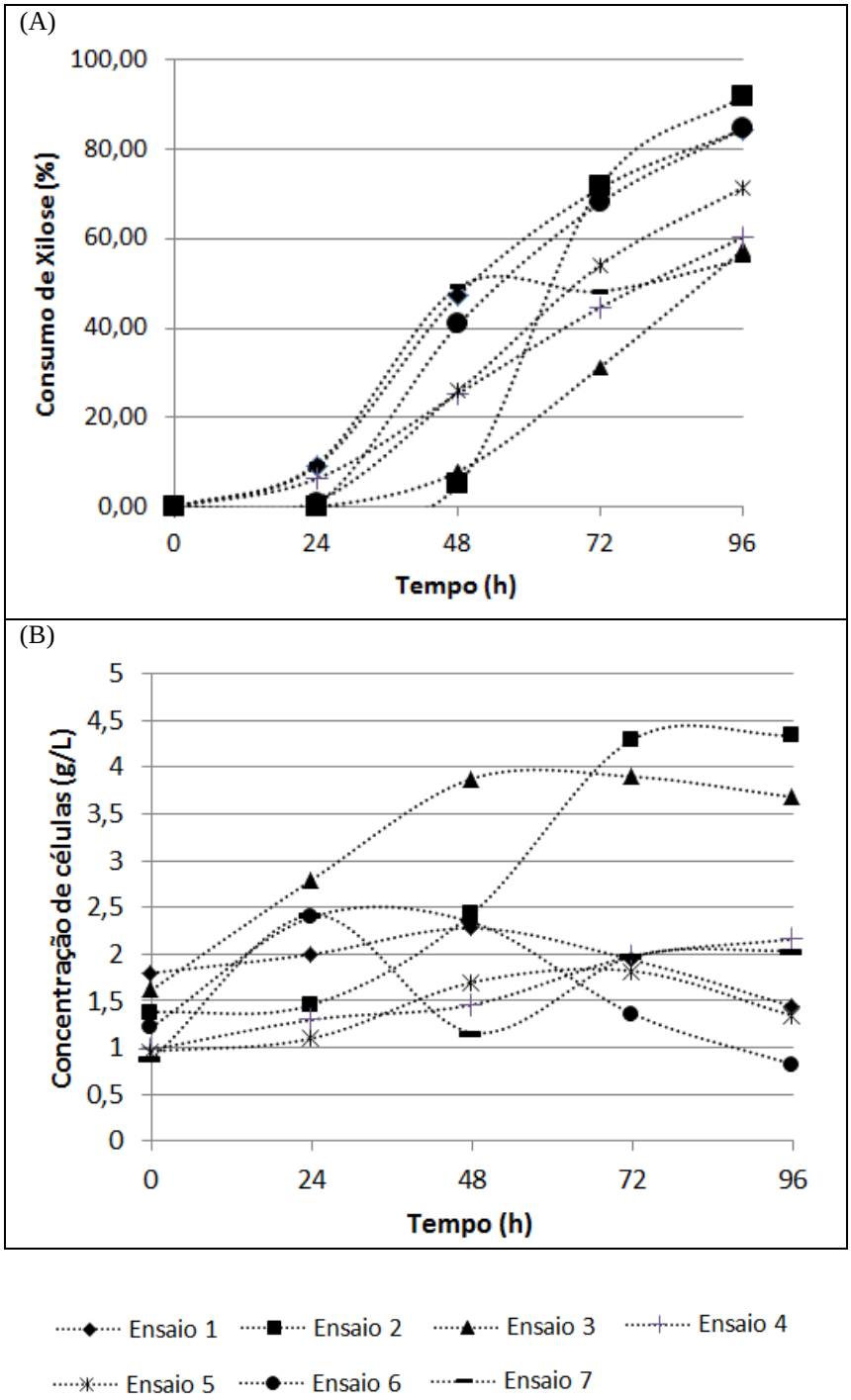


Fonte: Autoria própria.

Os ensaios nº 1, 4, 5, 6 e 7 tiveram resultados intermediários aos ensaios nº 2 e nº 3, no que diz respeito ao crescimento celular (1,44; 2,16; 1,34; 0,82 e 2,04 g/L, respectivamente) , consumo de xilose (84,39%; 60,25%; 71,35%; 84,56% e 55,38%, respectivamente), I.E.$_{24}$ (55,9%; 63,9%; 62,9%; 61,8% e 60,0%, respectivamente) e T.S. (60,8; 63,3; 64,2; 62,0 e 61,1 mN/m, respectivamente).

A Figura 16 apresenta os gráficos de consumo de xilose e crescimento celular da levedura *C. mucoides* ao longo dos ensaios realizados em biorreator, em meio formulado com HHBCA suplementado com nutrientes.

Figura 16 - Perfil de consumo de xilose (A) e de concentração de células (B) durante as fermentações realizadas com levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* utilizando meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada.



Fonte: Autoria própria.

Pelos dados da Tabela 10 e da Figura 16, verifica-se que o ensaio nº 3, no qual foi empregada a agitação de 250 rpm, porém a um nível menor de aeração (0,5 vvm), apresentou consumo de xilose bastante inferior (57,42 %) ao observado no ensaio nº 2 (91,87%) e crescimento celular pouco menor (3,68 g/L) que o observado no ensaio nº 2 (4,34 g/L). Entretanto, o ensaio nº 3 foi o que apresentou maior presença de biossurfactante

no meio ($I.E._{24}$ = 69,4 % e T.S. = 57,8 mN/m). Verifica-se também, pela Figura 16, que alguns ensaios alcançaram picos de concentração celular em diferentes tempos do bioprocesso, ou seja, tiveram crescimento mais ou menos rápido, dependendo das combinações de agitação e aeração a que foram submetidas, sendo que nos ensaios nº 2 e 3, submetidos à maior agitação, o crescimento celular foi similar. Entre 72 e 96h de fermentação o crescimento celular se estabiliza ou aparenta estar em declínio, o que pode ser um indicativo de migração de células para a espuma.

A fim de aulixiar no entendimento quanto à baixa produção de biossurfactante em alguns casos, se de fato ocorreu ou se os resultados estavam sendo falso-negativos devido à migração de células e do biossurfactante para a espuma, amostras da espuma foram retiradas conforme metodologia descrita no item 4.6.10 e análises da concentração de células e do I.E. foram realizadas, a partir do segundo ensaio. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados dos testes de concentração de células (g/L) e Índice de Emulsificação realizados nas amostras de espuma formada durante os ensaios conduzidos em biorreator de bancada.

Ensaio	Concentração de células na espuma (g/L) em 96 h	$I.E._2$ (%) da espuma	$I.E._{24}$ (%) da espuma
1	NR	NR	NR
2	1,29	58,8	40,6
3	0,44	18,8	ND
4	1,7	41,2	29,4
5	0,92	25	25
6	2,18	ND	ND
7	2,7	11,8	11,8

NR – não realizado o teste; ND – não detectado.

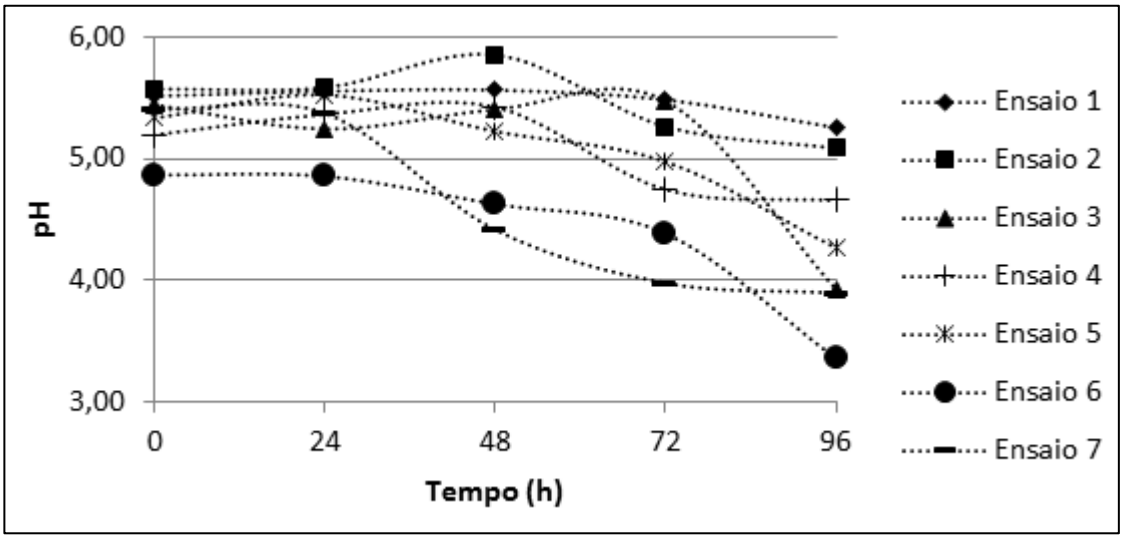
Fonte: Autoria própria.

Observa-se na Tabela 11, que a espuma resultante do ensaio nº 2 (250 rpm e 1,0 vvm) apresentou concentração de células de 1,29 g/L, $I.E._2$ igual a 58,8% e de $I.E._{24}$ igual a 40,6%, podendo-se inferir que em condição de alta agitação e alta aeração, parte das células e do bioproduto pode realmente migrar para a espuma formada. No ensaio nº 3 (250 rpm e 0,5 vvm), a espuma formada continha uma concentração celular menor (0,44 g/L) que a do ensaio nº 2 (1,29 g/L) e um $I.E._2$ também menor (18,8 %) do que o ensaio nº 2 (58,8%). Estes resultados indicam que a condição de transferência de oxigênio e de

massa no meio, resultante da combinação dos parâmetros de agitação e aeração no ensaio nº 3, foi eficiente para a produção do biossurfactante e que houve, neste caso, uma migração menor de células para a espuma formada durante a fermentação, sendo que, aparentemente, a maior parte do bioproduto se manteve no meio de fermentação após 96h. Nos demais ensaios também foi constatada a presença de células e de biossurfactante na espuma formada no biorreator, exceto no ensaio nº 6, no qual não foi constatada a formação de emulsão com a amostra da espuma retirada.

O perfil da variação do pH do meio de cultivo durante as fermentações é mostrado na Figura 17.

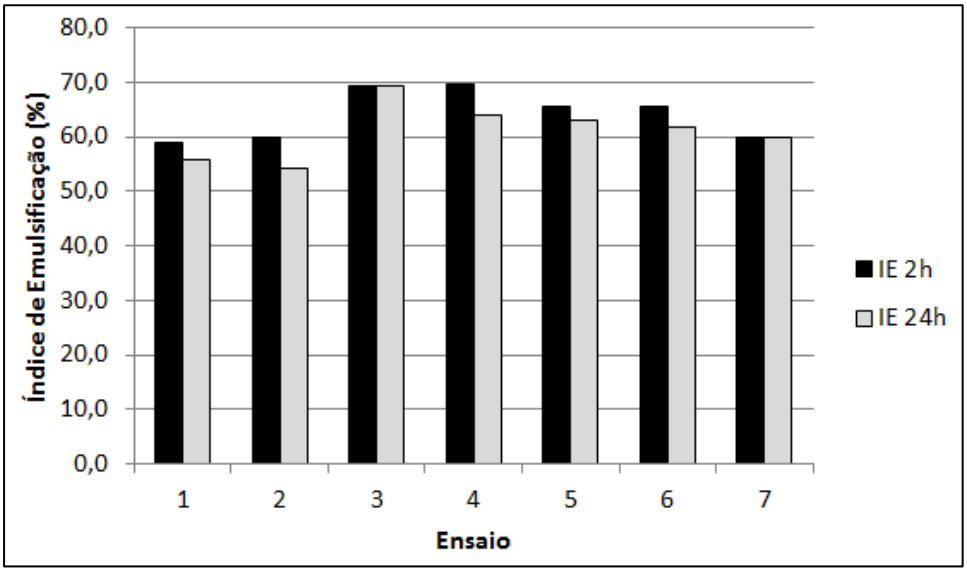
Figura 17 - Perfil de variação de pH durante as fermentações realizadas com levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* utilizando meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada.



Fonte: Autoria própria.

Observa-se na Figura 17 que ocorreu um decréscimo do pH do meio de cultivo durante as fermentações, porém, a queda do pH aparentemente não impossibilitou a produção do biossurfactante, pois os resultados obtidos no teste de índice de emulsificação (I.E.) realizado com os sobrenadantes das amostras retiradas ao final da fermentação (96 h) indicaram a presença de biossurfactante no meio, conforme a Figura 18.

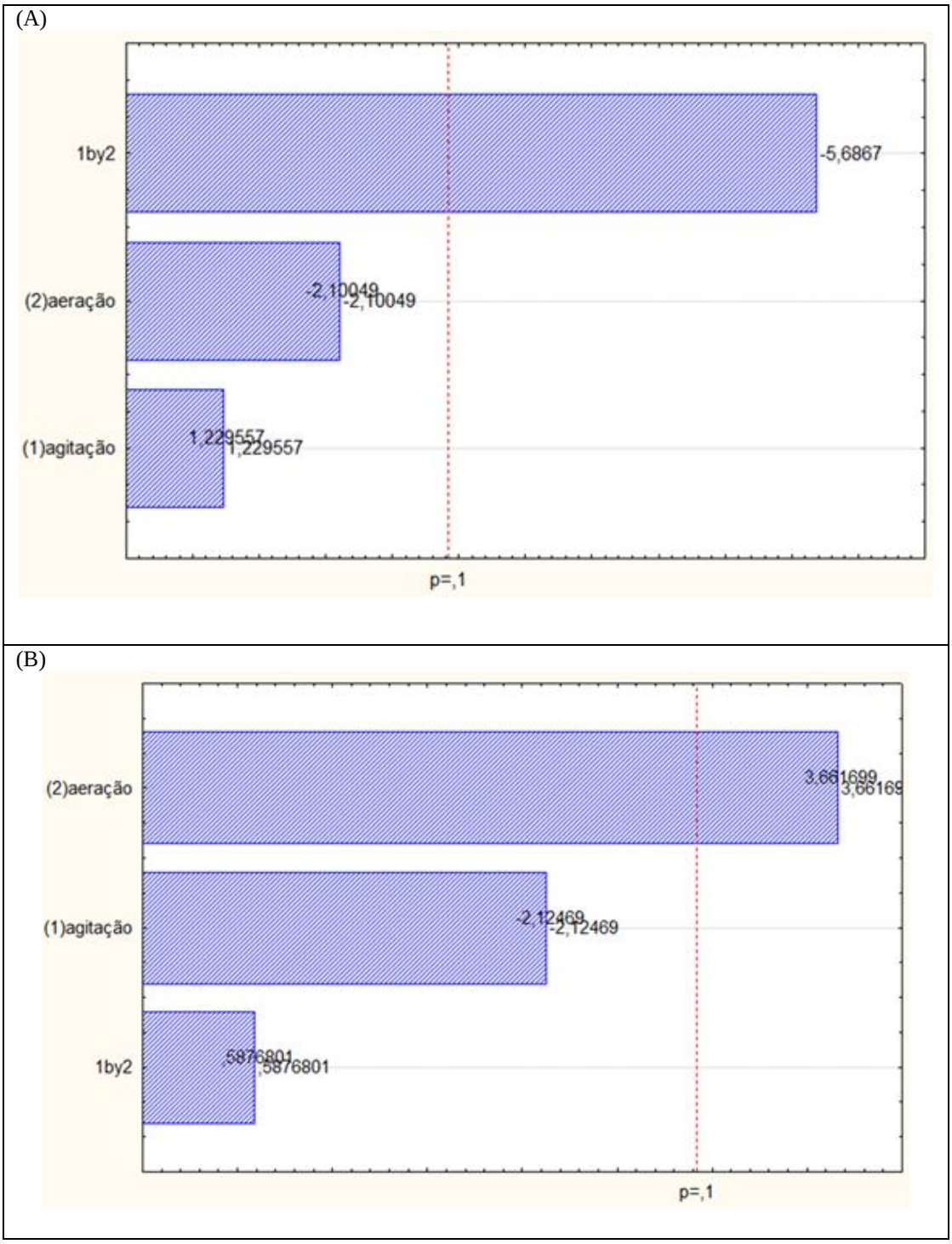
Figura 18 - Índice de Emulsificação (I.E.) das amostras do tempo final (96 h) das fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada após 2 e 24 h da realização do teste.



Fonte: Autoria própria.

Observa-se pela Figura 18 que os menores índices de emulsificação foram obtidos no ensaio nº 1 (150 rpm e 0,5 vvm) e nº 2 (250 rpm e 1,0 vvm). No caso do ensaio nº 1, os baixos níveis de agitação e aeração podem não ter proporcionado homogeneização e condições de transferência de oxigênio e de nutrientes necessários para as células produzirem o bioproduto desejado. Já no caso do ensaio nº 2, que utilizou altos níveis de agitação e aeração, a formação de espuma pode ter levado à migração das células para a mesma e prejudicado a produção do biossurfactante. Os ensaios nº 3 e 4 tiveram resultados de $I.E._2$ semelhantes, porém foi no ensaio nº 3 que a emulsão se manteve estável após 24h da realização do teste ($I.E._{24}$) e, portanto, a combinação entre alta agitação (250 rpm) e baixa aeração (0,5 vvm) se mostrou mais eficiente ao processo. Tal constatação pode ser confirmada pela análise estatística, realizada com o auxílio do software *Statistica* 7.0, para as variáveis resposta $I.E._{24}$ e T.S., utilizando-se os dados mostrados na Tabela 10. Os gráficos de Pareto obtidos são mostrados na Figura 19A-B.

Figura 19 - Gráfico de Pareto para efeitos padronizados das variáveis agitação e aeração nas variáveis resposta I.E.$_{24}$ e T.S. correspondentes às fermentações realizadas utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* cultivada em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, em biorreator de bancada. A - considerando a resposta I.E.$_{24}$; B – considerando a resposta T.S..



Fonte: Autoria própria.

Verifica-se pela Figura 19 A que, para a resposta I.E.$_{24}$, somente a interação entre agitação e aeração é significativa e, pela Figura 19 B, que, para a resposta T.S., somente a aeração é significativa para a produção de biossurfactante.

Buscou-se então a composição de modelos de primeira ordem para as variáveis resposta consideradas em função da agitação e aeração, sendo este apresentado na Equação 5 e a análise de variância (ANOVA) correspondente na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) para os modelos de primeira ordem ajustados para as respostas I.E.$_{24}$ e T.S. considerando-se os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central conduzido em biorreator de bancada para avaliação do efeito das variáveis agitação e aeração na produção de biossurfactantes pela levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes.

Fatores	**I.E.$_{24}$ (%)**					**T.S. (mN/m)**				
	SQ	**GL**	**QM**	**F**	**p-valor**	**SQ**	**GL**	**QM**	**F**	**p-valor**
Modelo	145,78	3	48,59	12,75	0,0736*	22,35	3	7,45	6,09	0,1443
X_1	5,76	1	5,76	1,51	0,3439	5,52	1	5,52	4,51	0,1675
X_2	16,81	1	16,81	4,41	0,1705	16,40	1	16,40	13,41	0,0672*
X_1 X_2	123,21	1	123,21	32,34	0,0296**	0,42	1	0,42	0,35	0,6163
Falta de Ajuste	2,90	1	2,90	0,76	0,4751	1,12	1	1,12	0,92	0,4396
Erro Puro	7,62	2	3,81			2,45	2	1,22		
Total	156,30	6				25,91	6			
R^2	0,9503					0,9013				

X_1 – Agitação (rpm); **X_2** – Aeração (vvm); **X_1X_2** – interação entre os fatores; **SQ** – soma dos quadrados; **GL** – graus de liberdade; **QM** – quadrado médio; **F –** teste F; *p-valor < 0,1: significativo para intervalo de 90% de confiança; **p-valor < 0,05: significativo para intervalo de 95% de confiança.
Fonte: Autoria própria

Pela Tabela 12, pode-se verificar que o modelo obtido para a resposta I.E.$_{24}$ foi significativo para um intervalo de 90% de confiança (p-valor igual a 0,0736, ou seja, menor do que 0,1) e que, no intervalo estudado, o modelo explica 95,03% da variabilidade dos dados experimentais, pois possui um R^2 de 0,9503. Para esta mesma resposta, a interação entre agitação e aeração (X_1X_2) é significativa para um intervalo de 95% de confiança, pois possui p-valor igual a 0,0296, ou seja, menor do que 0,05. Já o modelo obtido para a resposta T.S. não foi significativo, pois possui um p-valor igual a 0,1443, ou seja, maior do que 0,1. Sendo assim, o modelo referente à resposta I.E.$_{24}$ pode ser representado algebricamente pela equação polinomial com valores reais abaixo (Equação 5):

$$\mathbf{I.E._{24}\,(\%)} = 60{,}60 + 1{,}20X_1 - 2{,}05X_2 - 5{,}55X_1X_2 \quad \text{(Equação 5)}$$

Em que:

$\mathbf{X_1}$ – agitação (valor real em rpm);

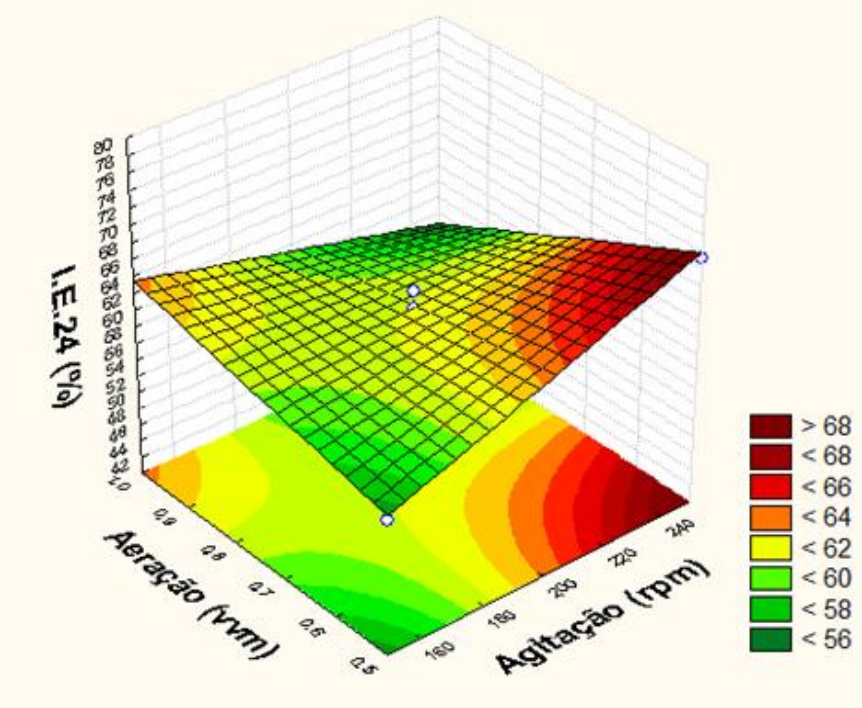
$\mathbf{X_2}$ – aeração (valor real em vvm);

$\mathbf{X_1X_2}$ – interação entre os fatores.

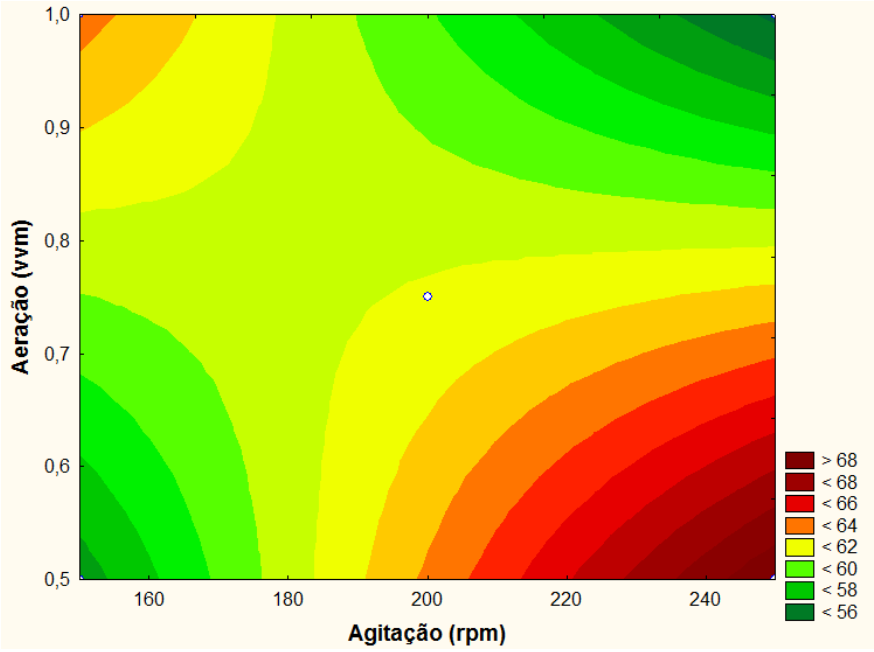
A superfície de resposta e curvas de nível correspondentes ao modelo obtido para a variável resposta $I.E._{24}$ é mostrada na Figura 20.

Figura 20 - Superfície de resposta (A) e curvas de nível (B) para a variável resposta I.E.$_{24}$ correspondentes ao modelo ajustado com base nos dados obtidos para produção de biossurfactantes utilizando a levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* cultivada em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, conforme planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, em reator de bancada.

(A)



(B)



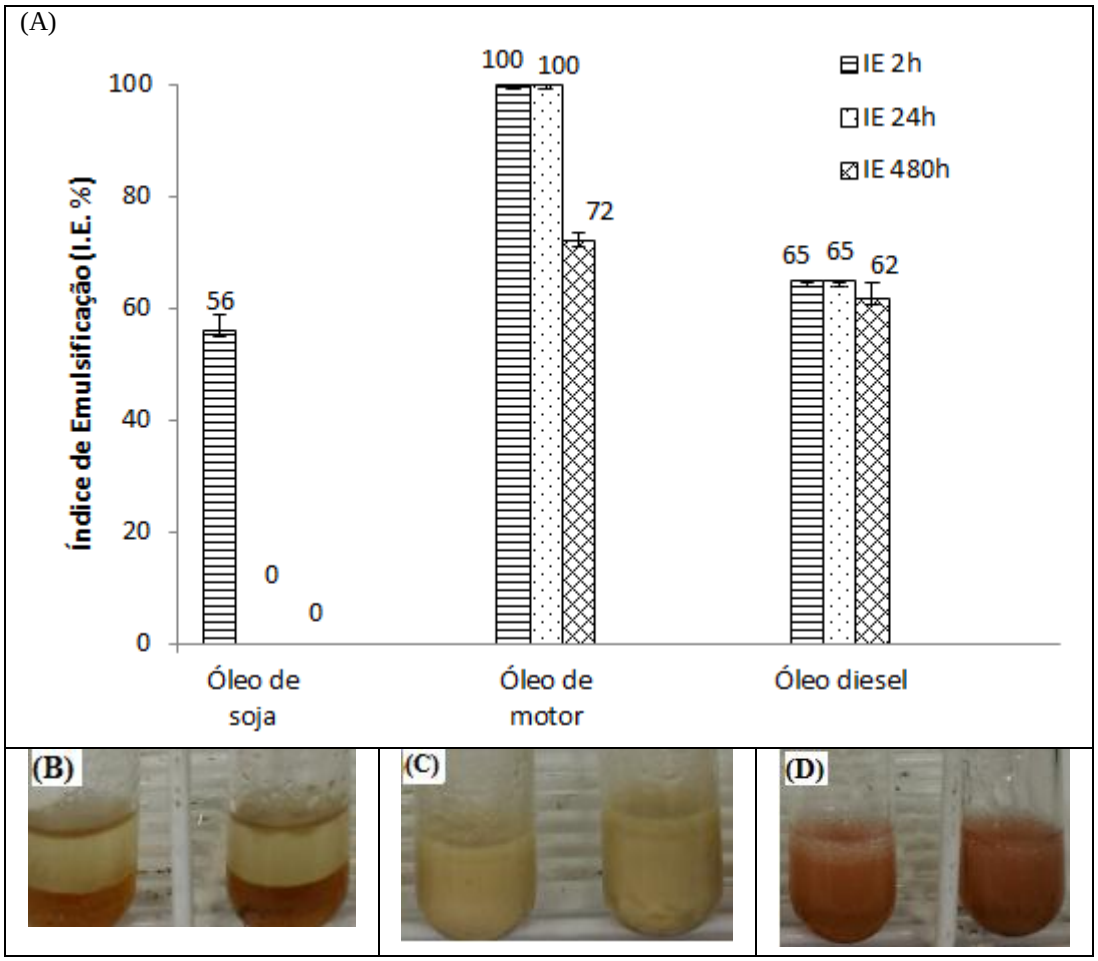
Fonte: Extraído do software *Statistica*.

Pela superfície de resposta apresentada na Figura 20A pode-se verificar que, quanto maior a agitação e menor a aeração, maiores valores de $I.E._{24}$ são obtidos, ou seja, maior a quantidade de biossurfactante presente no meio de fermentação. Tal fato pode ser corroborado pelos resultados do ensaio n° 3, submetido ao maior nível de agitação (250 rpm) e à menor aeração (0,5 vvm), o qual obteve maior $I.E._{24}$. Diversos estudos demonstram que, em geral, a produção de biossurfactante aumenta com o aumento da agitação (SPENCER, 1979; DESAI; BANAT, 1997; FONTES et al., 2010). Yeh, Wei e Chang (2006) e Amaral, Silva e Lehocky (2006), também mencionaram que a produção de biossurfactante, tanto por bactéria, quanto por levedura, aumentou com o aumento da velocidade de agitação.

5.4 Teste de aplicação do biossurfactante obtido em biorreator de bancada

Amostras do sobrenadante do meio de cultivo obtido ao final do ensaio nº 3, realizado em biorreator de bancada, empregando a maior agitação (250 rpm) e a menor aeração (0,5 vvm), o qual teve maior valor de $I.E._{24,}$ foram utilizadas para a realização de testes de I.E., conforme item 4.6.8.1, porém em vez de querosene, foram utilizados diferentes compostos hidrofóbicos a fim de se verificar a eficácia de emulsionamento do biossurfactante produzido. A Figura 21 mostra o I.E. das emulsões formadas entre o biossurfactante e óleo de soja, óleo de motor automotivo e óleo diesel.

Figura 21 - Índice de Emulsificação (I.E.) das amostras do tempo final (96 h) do ensaio nº 3 realizado em biorreator de bancada utilizando levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, após 2, 24 e 480 h da realização do teste com diferentes óleos (A); Emulsões formadas entre a amostra e o óleo de soja (B), óleo de motor automotivo (C) e óleo diesel (D) após 24 h do teste.



Fonte: Autoria própria.

Verifica-se nas Figuras 21 A e B que no caso do teste realizado com óleo de soja, apesar de ter apresentado I.E.$_2$ de 56 %, a emulsão formou duas fases após 24 h do teste, demonstrando instabilidade. Já as emulsões resultantes do teste com óleo de motor automotivo e óleo diesel exibiram I.E.$_{24}$ médios de 100% e 65%, respectivamente, e, após 480 h da realização do teste, os I.E.$_{480}$ médios foram de 72% e 62%, respectivamente. Estes dados sugerem uma maior emulsificação e estabilidade formada pelo biossurfactante com hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa, evidenciando que o biossurfactante obtido possui propriedade importante, principalmente para a indústria petroquímica, podendo ser aplicado em processos de biorremediação, tratamento de efluentes industriais ou na lavagem de depósitos de petroderivados (MONTEIRO et al., 2009).

Confome Rufino, Sarubbo e Campos-Takaki (2007), a capacidade emulsionante do bioproduto depende diretamente da afinidade entre o biossurfactante e o substrato hidrofóbico, não tendo relação alguma com a tensão superficial do meio. Resultados semelhantes foram obtidos por Marcelino (2016), Barros, Quadros e Pastore (2008) e Monteiro et al. (2009) em trabalhos com biossurfactantes produzidos por bactérias (*Bacillus subtilis*) e leveduras dos gêneros T*richosporon* e *Candida*.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, podem-se elencar as seguintes conclusões:

- A utilização da combinação entre agitação e relação V_m/V_f para avaliar o efeito da disponibilidade de oxigênio sobre a produção de biossurfactante por *C. mucoides* em meio formulado com HHBCA suplementado com nutrientes, empregando frascos *Erlenmeyer*, permite constatar, em função dos valores de I.E. e T.S. obtidos, que o favorecimento deste bioprocesso ocorre com o aumento concomitante da agitação e da relação V_m/V_f;

- A utilização da combinação entre agitação e aeração para avaliar o efeito da disponibilidade de oxigênio sobre a produção de biossurfactante por *C. mucoides* em meio formulado com HHBCA suplementado com nutrientes, empregando biorreator de bancada do tipo STR, permite constatar, em função dos valores de I.E. e T.S. obtidos, que o favorecimento deste bioprocesso ocorre com o aumento da agitação e a diminuição da aeração;

7 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

Este trabalho apresenta diversas possibilidades de estudos a serem explorados no futuro:

- Realizar experimentos em frasco *Erlenmeyer* e em biorreator de bancada do tipo STR nas melhores condições de disponibilidade de oxigênio encontradas no presente trabalho, até que o consumo de xilose se aproxime ainda mais de 100% para verificar se o I.E. e T.S. são similares ou melhores do que os já obtidos e se justificariam uma possível extensão da fermentação;

- Realizar a extração do biossurfactante produzido em frasco *Erlenmeyer* na melhor condição de agitação e V_m/V_f e do produzido em reator de bancada na melhor condição de agitação e aeração para cálculo da produtividade do processo;

- Estudar uma forma de adaptar o reator de bancada do tipo STR utilizado no presente trabalho de maneira que seja possível realizar a retirada da espuma formada durante a fermentação e extrair as células e o biossurfactante presente na mesma, visando melhorar a produtividade do processo.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWAFA, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 329–345, 2009.

ABU-RUWAIDA, A.S.; BANAT, I.M.; HADITIRTO, S.; KHAMIS, A. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus bacterium*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 53-61, 1991.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida Antarctica*. **Biotechnology Letters**, 22, 313-316, 2000.

AGEITOS, J.M.; VALLEJO, J.A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T.G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1219-1227, 2011.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlativas. **Quimica Nova**, v.34, n.10, p.1729-1738, 2011.

ALBUQUERQUE , C.D.C., FILETI, A.M.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.. Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, X. Goiânia, Brasil, 2006.

ALVES, L.A.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; SILVA, S.S.; PRATA, A.M.R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 89–98, 1998.

AMARAL, P.F.F.; SILVA, J.M., LEHOCKY, M. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, vol. 41, n. 8, p. 1894-1898, 2006.

ARRUDA, P. V.; CHAUD, L. C. S.; FELIPE, M. G. A.; PIVETTA, L. R. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. **Nucleus**, v. 5, n. 1, p. 166 – 182, 2008.

ARRUDA, P. V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2011. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

ATKINS, P.W.; JONES, L. **Princípios de química:** questionando a vida moderna e o meio ambiente. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

ATWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Surfactants systems:** their chemistry, pharmacy and biology. London: Chapman and Hall, 1985.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 5, p. 1-12, 1995.

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

BANAT, P.I.M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, v. 2000, n. 198, p. 44–47, 2000.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BANAT, I. M.; SATPUTE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. Frontiers in Microbiology, 2014.

BAPTISTA, S. J. **Avaliação do emprego de biossurfactante na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel**. 2007. 146 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA Jr., M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

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

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

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v.97, n.6, p.868-875, 2006.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PŁASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, v. 95, p.15–18, 2004.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A:** Physicochemical and Engineering Aspects, v. 152, n. 1, p. 41-52, 1999.

BORSATO, D.; GALÃO, O. F.; MOREIRA, I. **Detergentes naturais e sintéticos:** um guia técnico. Londrina: Eduel, 2004.

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

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

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

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

CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. **Environmental Progress**, v. 27, n. 1, p. 51–57, 2008.

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

CHEN, C-Y.; BAKER, S.C.; DARTON, R.C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 503-510, 2007.

CHEN, G. Q. New challenges and opportunities for industrial biotechnology. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 111, 2012.

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M.; Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 747-750, 1984.

COMASSETO, J. V. A reunião da Química e da Biologia. In: MARSAIOLI, A, PORTO, A. L.. (Org.). **Biocatálise e Biotransformação Fundamentos e Aplicações**. Salto: Schoba, 2010, v. 1.

COOPER, D. G. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.

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

COUTTE, F.; LECOUTURIER, D.; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; JACQUES, HULSTER, P. New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtillis* in membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 25-32, 2013.

CRISTOFI, N.; ISHIVA, I. N. Microbial surfactants and their use in field of soil remediation**. Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

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

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their comercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Ed.) **Biosurfactants**: production, properties, applications. New York: CRC Press, 1993.

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, v.54, p.143–150, 1995.

DORAN, P.M., **Bioprocess engineering principles**. London: Academic Press, 1995.

DOUROU, M.; PANAGIOTIS, M.; PAPNIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabelina*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 7213 – 7226, 2017.

FAHIM,, S.; DIMITROV, K.; GANCEL, F.; VAUCHEL, P.; JACQUES, P.; NIKOV, I. Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 70-76, 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood**: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERREIRA, G.D.G.; BARRIÈRE, Y.; EMILE, J.C.; JOBIM, C.C. Caracterização morfo-anatômica do colmo de genótipos de milho. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 230, p. 237-246, 2011.

FERREIRA, A. D. **Processo eficiente de produção de etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: otimização das condições de cultivo e operacionais**. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

FLASZ, A.; ROCHA, C.A.; MOSQUERA, B.; SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Medical Science Research**, v. 26, n. 3, p. 181–185, 1998.

FONTES, G.C., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Quimica Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, M.A.Z. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 821306, 2010.

FRANÇA, I. W. L.; LEMOS, J.A.M.; NOVAIS, B.; LEMOS, C.G.; MELO, V.M.M.; SANTANA, H. B.; GONÇALVES, L.R.B. Planejamento experimental na produção de

biossurfactante do tipo lipopeptídeos em biorreator de bancada. In: Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20, Santa Catarina, p. 2304-2311, 2014. **[= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-1617-18413-147167

GANESH, K.C.; MAMIDYALA, S.K.; BISWANATH DAS, B.; SRIDHAR, B.; DEVI, G.S.; KARUNA, M.S. Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n.7, p. 1061–1068, 2010.

GEORGIOU, G.; LINS, S.C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Bio/Technology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

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

GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicellulose for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GLOBAL biosurfactants Market by product (rhamnolipids, sophorolipids, mês, apg, sorbitan esters, sucrose esters) expected to reach usd 2,308.8 million by 2020. Disponível em: https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-biosurfactants-market. Acesso: Junho de 2018.

GUILARDUCI, V.V.; MESQUITA, J.P.; MARTINELLI, P.B.; GORGULHO, H.F.. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. **Quimica Nova**, v. 29, n. 6, p. 1226–1232, 2006.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal Applied Microbiology**, v.88, p.379-387, 2000.

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

HATTI-KAUL R., TORNVALL U, GUSTAFSSON L, BORJESSON P. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. **Trends Biotechnol** v. 25, n. 3, p. 119-124. 2007.

HENKEL, M.; MULLER, M.M.; KUGLER, J.H.; LOVAGLIO, R.B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1207-1219, 2012.

HOMMEL, R.K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RIKE, O.; KLEBER, H.P. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 147-155, 1994.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J.N.; GRIFFIN, W.M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 243–248, 1990.

HUNTER, R.J. **Introduction to modern colloid science**. New York: Oxford University Press. 1992.

http://www.industrialbiotech-europe.eu/about/ (Acesso em Julho, 2016).

http://www.transparencymarketresearch.com/specialty-and-biosurfactants-market.html (Acesso em Julho, 2016).

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

JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V.S. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorulaglutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 6, p. 487-90, 1992.

KIM, H.S.; JEON, J.W.; KIM, B.H.; AHN, C.Y.; MOCK OH, H.; YOON, B.D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 391-396, 2006.

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

KITAMOTO, D.; IKEGAMI, T.; SUZUKI, G.T.; SASAKI, A.; TKEYAMA, Y.; IDEMOTO, Y.; KOURA, Y.; YANAGISHITA, H. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants mannosylerytritol lipids by *Pseudozyma (Candida antarctica*). **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1709-1714, 2001.

LANG, S.; WAGNER, F. Structures and properties of biosurfactants. In: KOSARIC, N.;CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (Ed**). Biosurfactants and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987, p. 21–45.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 1036–1043, 2010.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy,** v. 23, n. 5, p. 367–380, 2002.

LEATHERS, T.D.; PRICE, N.P.J.; BISCHOFF, K.M.; MANITCHOTPISIT, P.; SKORY, C.D. Production of novel types of antibacterial liamocins by diverse strains of *Aureobasidium pullulans* grown on different culture media. Biotechnology Letters, v. 37, p. 2075-2081, 2015.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica, 6ª ed. Editora Sarvier, São Paulo, Brasil, 2014.

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

LEE, B.S.; KIM, E.K. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 639-647, 2008.

LEE, J.W.; KIM, T.Y.; JANG, Y.S.; CHOI, S.; LEE, S.Y. Systems metabolic engineering for chemicals and materials. **Trends in Biotechnology,** v. 29, n. 8, p. 370-378, 2011.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 749-756. 2008.

LINDNER, A. **Síntese de surfactantes altamente biodegradáveis pela transesterificação de ésteres de ácidos graxos com sacarose.** 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

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

LYND, R.L. van ZYL, W.H.; McBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 577-583, 2005.

LYSSANT, K. Emulsions and Emulsions Technology. **Surfactant Science Series**, v. 6, New York: CRC Press. 1974.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Production biosurfactant at mesophilic and thermophilic by a strain *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Biotechnology**, v. 20, p. 48-52, 1998.

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

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; IBRAHIM, M.B. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB express**, v. 1, n. 5, p. 1 – 19, 2011.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 87–93, 2001.

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

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

MARTÍNEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; WELLS, M.L.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 2, p. 287–293, 2001.

MARTON, J.M.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; PESSOA JUNIOR, A. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 9-21, 2006.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, J.; TORRENS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. **Microbiological Research**, v. 155, n. 4, p. 249 – 256, 2001.

MONTEIRO, A.S.; COUTINHO JOPA, JÚNIOR A. C.; ROSA, C.A.; SIQUEIRA E. P.; SANTOS, V. L. Characterization of new biosurfactant produced by T*richosporon montevideense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, n. 6, p.553–563, 2009.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALES, B.; ELAND, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MOUSSA, T.A.A.; AHMED, G.M.; ABDEL-HAMID, M.S. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Nocardia amarae*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 2, p. 844-850, 2006.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Ed.) **Biosurfactants:** production, properties, applications. New York: CRC Press, p. 19-98, 1993.

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

NIGAM, P.S.; GUPTA, N.; ANTHWAL, A. **Pre-treatment of agro-industrial residues:** biotechnology for agro-industrial residues utilisation, v. 1, p. 13-33, 2009.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p.252-259, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova,** v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of Baker's yeast. I. Factors affecting the type of metabolism**. Biotechnology Bioengineering**, v. 16, n. 9, p.1197-1212, 1974.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17 – 24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000b.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management and Innovation**, v. 2, n. 1, 2007.

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

PIRT, J.S. **Principles of microbe and cell cultivation**. Oxford: Blackwell Scientific, 1975.

PORTER, M. R. **Handbooks of biosurfactants**. 2. Ed. New York: Champman & Hall, p. 324, 1994.

PORTILLA-RIVERA, O. M.; MOLDES, A. B.; TORRADO, A. M.; DOMÍNGUES, J. M. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1010 – 1020, 2007.

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

RAZA, Z. A.; REHMAN, A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, v. 18, p. 115-121, 2007.

RECKE, V.K.; GERLITZKI, M., HAUSMANN, R.; SYLDATK, C.; WRAY, V; TOKUDA, H.; NOBUTAKA SUZUKI, N.; LANG, S. Enzymatic production of modified 2-dodecyl sophorosides (biosurfactants) and their characterization. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 4, p. 452 – 463, 2013.

REILING, H. E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L.H.; HIRT, R.; KAPPELI, O.; FIETCHER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Apllied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 985-989, 1986.

RIZZATTI, I.M. **Construção de eletrodos de membrana seletiva para surfactante e eletrodos para brometo para aplicação em estudo potenciométrico de interações entre dodecilsulfato de sódio e polióxido etileno**. 2003. 100 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

RIZZATTI, I.M; ZANETTE, D.R.; MELLO, L.C Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química. **Química Nova**, v. 32, p. 518–521, 2009.

ROBERTO, I. C.; FELIPE, M.G.A.; LACIS, L.S.; SILVA, S.S..; MANCILHA, I.M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xilitol production. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 271-275, 1991.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; ARAÚJO, G.T.; CURVELO, A. A. S. A fast and accurate method for determination of celulose and polyoses by HPLC. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 5., v. 6, p. 3-8, 1997.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249–252, 2002.

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

RUFINO, R.; SARUBBO, L; CAMPOS-TAKAKI, G. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 729-734, 2007.

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

SANTANA, W.J.; RUFINO, R.D.; NETO, B.B.; PORTO, A.L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., Santos, Brasil, 2005.

SANTOS, J. C.; MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A. Continuous system of combined columns of ion exchange resins and activated charcoal as a new approach for the removal of toxics from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 53, p. 16494-16501, 2014.

SARUBBO, L.A., MARÇAL, M.C.; NEVES, M.L.C.; SILVA, M.P.C.; PORTO, A.L.F., CAMPOS-TAKAKI, G.M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** v. 95, n. 1, p. 59 - 67, 2001.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W ; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZAMI, W. **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. cap. 14, p.539 - 545.

SEKHON, K.K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production and potential correlation with esterase activity. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v.3, n.07, p. 1-10, 2012.

SHAFI, R., KHANNA, S. Biosurfactants. **Indian Journal of Microbiology**, v. 35, pp. 165-184, 1995.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microrganisms for use in food. **Journal of Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 207-217, 1995.

SILVA, P.K.L. **Remoção de óleo da água de produção por flotação em coluna utilizando tensoativo de origem vegetal**. 2008. 104 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SILVA S. S.; CHANDEL, A. K. **Biofuels in Brazil :** fundamental aspects, recent developments, and future perspectives. 1 ed: Springer, 2014.

SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R. B.; VON ZUBEN, C. J.; CONTIERO, J. Larvicidal activity of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 against *Aedes aegypti* larvae. In: SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, St. Louis, 2014.

SILVA, V.L.; LOVAGLIO, R.B.; VON ZUBEN, C. J.; CONTIERO, J. Rhamnolipids: solution against *Aedes aegypti*? **Frontiers in Microbiology,** v.6, p. 1-5, 2015.

SILVA-FERNANDES, T.; SANTOS, J. C.; HASMANN, F.; RODRIGUES, R.C.L.B.; IZARIO FILHO, H. J.; FELIPE, M. G. A. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 384-392, 2017.

SILVA, J. P. A.; MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. The influence of initial xylose concentration, agitation and aeration on ethanol production by *Pichia stipites* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 5, p. 1306 – 1315, 2010.

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

SOETAERT, W. Introduction to Biosurfactants. Berlim, Biosurfactants workshop – BioTic, 2014. (Comunicação Oral/Palestra).

SPENCER, J.F.T., SPENCER, D.M.; TULLOCH, A.P. **Economic microbiology**. New York: Academic Press, 1979. v. 3. p. 523-540.

SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of Biosurfactants. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. **Biosurfactants and Biotechnology**, New York: Marcel Dekker, 1987. cap. 3, p. 89-120.

THANOMSUB, B.; WATCHARACHAIPONG, T.; CHOTELERSAK, K.; ARUNRATTIYAKORN, P.; NITODA, T.; KANZADI, H. J. Monoacylflycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 588, 2004.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H. e TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 241–252, 1991.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, n. 12, p. 5095–5108, 2010.

VANCE-HARROP, M.H.V.; GUSMÃO, N.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 120, 2003.

VILLA, P. Influence of phenolic compounds on the bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 2. 1998, Porto-Portugal.

VILLARREAL, M.L.M. **Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de resíduos de eucalipto, com carvão ativo e resinas de troca iônica, para a produção de xilitol.** 2005. 132p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena, 2005.

WEBER, L.; DOGE, C.; HAUFE, G. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. **Biocatalysis**, v. 5, p. 267-272, 1992.

WEI, Y.H.; CHOU, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 2, p. 146-154, 2005.

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1799-1805, 2006.

ZINJARDE, S.S.; GHOSH, M. Production of surface active compounds by biocatalyst technology. In: RAMKRISHNA, S. (Ed). **Biosurfactants**. New York: Springer Science, 2010.

ZINJARDE, S.S.; PANT, A. J. Emulsifier from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, p. 67-73, 2002.