

GÉSSIKA MARÇAL NAGY

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE DE BAIXO CUSTO A PARTIR DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Solos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Beno Wendling

Co-orientador

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

GÉSSIKA MARÇAL NAGY

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE DE BAIXO CUSTO A PARTIR DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Solos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
(Co-orientador)

UFU

Prof. Dr. Lucas Carvalho Basílio de Azevedo

UFU

Prof. Dr. Sérgio Marcos Sanches

IFTM

Prof. Dr. Beno Wendling
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

N152p
2018

Nagy, Géssika Marçal, 1992

Produção de biossurfactante de baixo custo a partir de resíduos agroindustriais / Géssika Marçal Nagy. - 2018.

71 f. : il.

Orientador: Beno Wendling.

Coorientador: Edgar Silveira Campos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.778>

Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Resíduos industriais - Teses. 3. Levedos - Teses. 4. Biossurfactantes - Teses. I. Wendling, Beno. II. Campos, Edgar Silveira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU: 631

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Luiz Alexandre, aos meus pais Luciane e Elio, ao meu irmão Matheus e aos familiares que me deram apoio e incentivo nesta etapa importante da minha vida, dedico esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luciane e Elio, por todo amor, incentivo e pelos esforços que realizaram para que eu pudesse concluir essa etapa.

Ao meu querido esposo Luiz Alexandre pela presença, amor e apoio.

Ao meu irmão Matheus pelo apoio e amizade.

À Deus, por toda força, proteção e por ter permitido completar mais essa etapa da vida.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Beno Wendling e Prof. Dr. Edgar Silveira Campos, pela oportunidade de realizar este trabalho e pelos ensinamentos sempre essenciais, principalmente pela confiança e também por abrir as portas do laboratório para realização deste trabalho.

Ao meu amigo e parceiro de trabalho Pedro Henrique.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, Gabriella, Camila, Jorge e Augusto.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Ciências Agrárias, que contribuíram para minha formação.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	4
3.1. Surfactantes químicos e biológicos.....	4
3.1.1. Propriedades particulares dos biossurfactantes.....	9
3.2. Produção biotecnológica microbiana	10
3.2.1. Métodos de produção	11
3.2.1.1. Fatores que afetam a produção	12
3.2.2. Parâmetro de avaliação	14
3.2.2.1. Tensão superficial	144
3.2.3. Microrganismos	15
3.2.3.1. Leveduras.....	16
3.2.3.2. Leveduras da Antártida.....	16
3.2.3.3. <i>Cryptococcus victoriae</i>	177
3.2.4. Meios de cultivo.....	18
3.2.5. Resíduos industriais	19
3.3. Planejamento e otimização	200
3.3. Aplicações.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Resíduos agroindustriais	25
4.1.1. Caracterização dos resíduos agroindustriais	25
4.2. Microrganismos e conservação.....	26
4.3. Condições fermentativas.....	26
4.4. Preparo das amostras	26
4.5. Avaliação da composição do meio	26

4.5.1. Tensão superficial	28
4.5.2. Índice de emulsificação	288
4.5.3. Produção de biomassa.....	299
4.6. Planejamento fatorial e composto central	299
4.7. Análise dos resultados	332
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Caracterização dos resíduos agroindustriais	34
5.2. Avaliação da composição do meio	366
5.2.1. Seleção das fontes C e N.....	366
5.2.2. Planejamento experimental 2^{5-1}	40
5.2.3. Delineamento composto central.....	45
6. CONCLUSÕES	588
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	599
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> – Principais biossurfactantes produzidos por microrganismos.....	9
<i>Tabela 2</i> – Fontes de carbono e nitrogênio dos meios avaliados.....	27
<i>Tabela 3</i> – Fatores e níveis codificados para o planejamento 2^{5-1}	30
<i>Tabela 4</i> – Meios de cultivo com componentes codificados para planejamento experimental 2^{5-1}	30
<i>Tabela 5</i> – Fatores e níveis utilizados no CCD.....	31
<i>Tabela 6</i> – Meios de cultivo com componentes codificados para CCD	32
<i>Tabela 7</i> – Teores de açucares redutores para as amostras de abacaxi e caju.....	35
<i>Tabela 8</i> – Analise de variância para o parâmetro densidade óptica.....	36
<i>Tabela 9</i> – Analise de variância para o parâmetro massa seca.....	36
<i>Tabela 10</i> – Analise de variância para o parâmetro índice de emulsificação.....	37
<i>Tabela 11</i> – Analise de variância para o parâmetro tensão superficial.....	37
<i>Tabela 12</i> – Parâmetros avaliados na seleção das fontes de C e N	38
<i>Tabela 13</i> – Meios de cultivo e tensão superficial avaliada no planejamento experimental 2^{5-1}	40
<i>Tabela 14</i> – Analise de variância da tensão superficial no planejamento fatorial 2^{5-1} ..	41
<i>Tabela 15</i> – Concentrações dos reagentes utilizados na avaliação do ponto máximo da função escalar.....	43
<i>Tabela 16</i> – Fatores e níveis utilizados no CCD.....	45
<i>Tabela 17</i> – Meios de cultivo com componentes codificados e tensão superficial do CCD.....	45
<i>Tabela 18</i> – Analise de variância da tensão superficial sem diluição no planejamento composto central.....	46
<i>Tabela 19</i> – Analise de variância da tensão superficial 1:10 no planejamento composto central.....	47

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> – Estrutura química do dodecilbenzenossulfonato de sódio (princípio ativo do detergente doméstico) e representação de uma micela	5
<i>Figura 2</i> – Estrutura química de biosurfactantes a) ramnolipídeo e b) surfactina.....	7
<i>Figura 3</i> – Gráficos do teor de açúcares redutores em relação à absorbância de solução padrão de glicose	34
<i>Figura 4</i> – Analise de Pareto do planejamento fatorial 2^{5-1}	42
<i>Figura 5</i> – Curva obtida pelo método steepest descente para extrato de caju.....	43
<i>Figura 6</i> – Curva obtida pelo método steepest descente para extrato de levedura.....	44
<i>Figura 7</i> – Analise de Pareto do planejamento composto central para tensão superficial sem diluição.....	47
<i>Figura 8</i> – Analise de Pareto do planejamento composto central para tensão superficial na diluição 1:10.....	48
<i>Figura 9</i> – Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial sem diluição Extrato de levedura x Citrato de amônio.....	49
<i>Figura 10</i> – Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial sem diluição Extrato de levedura x Extrato de caju.....	49
<i>Figura 11</i> – Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial sem diluição Extrato de caju x Citrato de amônio.....	50
<i>Figura 12</i> – Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 Extrato de levedura x Citrato de amônio.....	50
<i>Figura 13</i> – Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 Extrato de levedura x Extrato de caju.....	51
<i>Figura 14</i> – Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 Extrato de caju x Citrato de amônio.....	51
<i>Figura 15</i> – Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 após ajuste Extrato de levedura x Citrato de amônio.....	53
<i>Figura 16</i> – Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 após ajuste Extrato de levedura x Extrato de caju.....	53
<i>Figura 17</i> – Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 após ajuste Extrato de caju x Citrato de amônio.....	54

RESUMO

MARÇAL NAGY, GÉSSIKA. **Produção de biossurfactante de baixo custo a partir de resíduos agroindustriais.** 2018. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

Os biossurfactantes são compostos ativos redutores da tensão superficial, metabólitos produzidos por microrganismos, além de serem compostos estáveis às diferentes condições ambientais. As principais características desses compostos estão relacionadas à biodegradabilidade à ausência de toxicidade. Nos últimos anos, uma gama de trabalhos têm sido desenvolvidos visando à inclusão de resíduos agroindustriais nos meios de cultivo para a produção de biossurfactantes. O objetivo deste trabalho foi testar os resíduos de abacaxi e caju, na formulação de meio de cultivo para a levedura *Cryptococcus victoriae*, reduzindo o custo de produção do biossurfactante. Deste modo, avaliaram-se os teores de açúcares redutores dos extratos de abacaxi e caju pela metodologia de Miller, 1959. Foram selecionadas as melhores fontes de carbono e nitrogênio por planejamento fatorial e as suas concentrações ideais para o meio de cultivo foi determinada utilizando metodologia de superfície de resposta e o software R. Os resultados de açúcares redutores mostraram que o extrato de caju, possui teores aproximadamente quatro vezes superiores ao extrato de abacaxi, com valores médios iguais a $77,24 \text{ g L}^{-1}$ e $18,87 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Além dos extratos, utilizaram-se diferentes fontes de carbono e nitrogênio para avaliar a produção de biossurfactante. Após seleção de extrato de caju, extrato de levedura, citrato de amônio e acetato de sódio, como as melhores fontes, fez-se o planejamento experimental. Este planejamento forneceu os três fatores significativos para a redução da tensão superficial nos meios extrato de caju, extrato de levedura e citrato de amônio, sendo que, ao se formular meios utilizando esses substratos, valores de tensão superficial variando entre 40 e 55 mN m^{-1} foram observados. Realizou-se a análise da metodologia de superfície de resposta, e avaliação das equações individuais para obtenção da equação geral e, dessa forma, das concentrações ideais para a redução da tensão superficial. Sendo assim, confirmou-se a capacidade produtiva da *Cryptococcus victoriae* isolada do ambiente antártico, utilizando resíduo agroindustrial. Em geral, o meio composto por $19,24 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de caju, $6,70 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura e $3,30 \text{ g L}^{-1}$ de citrato de amônio, apresenta os melhores resultados, reduzindo a tensão superficial ($54,87 \text{ mN m}^{-1}$), podendo ser de grande interesse industrial e ambiental.

Palavras-chave: Biossurfactantes. Resíduos agroindustriais. Leveduras. *Cryptococcus*. Antártida.

¹Comitê Orientador: Beno Wendling – UFU (Orientador) e Edgar Silveira Campos – UFU (Co-orientador).

ABSTRACT

MARÇAL NAGY, GÉSSIKA. **Production of low-cost biosurfactants from agroindustrial residue.** 2018. 71 p. Uberlândia: UFU, 2018. 71 p. Dissertation (Master Program Agronomy/ Crop Science) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia.¹

Biosurfactants are actives compounds reducers of the surface tension, metabolites extracted from microorganisms, as well as are stable compounds at different environment conditions. The main characteristics of these compounds are related to biodegradability and to absence of toxicity. In the last few years, a range of studies have been developed in order to include agroindustrial residues in the culture medium for the biosurfactants production. The objective of this study was to evaluate pineapple and cashew residues in a culture medium formulation for the yeast *Cryptococcus victoriae*, reducing, consequently, the value of the biosurfactant production. In this way, the sugar content of pineapple and cashew extracts was evaluated by the methodology of Miller, 1959. The best carbon and nitrogen sources were selected by factorial design and their ideal concentrations for the culture medium were determined using methodology of response surface and software R. Results showed that the cashew extract had approximately four times more reducing sugars than the pineapple extract, with values of 77.24 g L^{-1} and 18.87 g L^{-1} , respectively. In addition to the extracts, differents carbon and nitrogen sources were used to evaluate the biosurfactant production. After the selection of the best sources (cashew extract, yeast extract, ammonium citrate and sodium acetate), the experimental planning was performed. This planning provided three significant factors for surface tension reducers in the cashew extract, yeast extract and ammonium citrate culture medium. When the culture medium using these substrates were formulated, surface tension values ranged from 40 to 55 mN m^{-1} . The analysis of the response surface methodology was performed, and evaluation of the individual equations to obtain the general equation and, therefore, the ideals concentrations for reduce the surface tension. Thus, the productive capacity of *Cryptococcus victoriae* isolated of the Antarctic environment, using agroindustrial residue, was confirmed. In general, better results were observed when the culture medium composed by 19.24 g L^{-1} of cashew extract, 6.70 g L^{-1} of yeast extract and 3.30 g L^{-1} of ammonium citrate was used, reducing the surface tension (54.87 mN m^{-1}) and being a potential medium for industrial and environmental application.

Keywords: Biosurfactants. Agroindustrial residues. Yeast. *Cryptococcus*. Antarctica.

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem uma fração polar, também denominada hidrofílica, e outra apolar, hidrofóbica. A parte apolar é formada por hidrocarbonetos de cadeia alifática, grupos aromáticos e policíclicos. A parte polar pode ser iônica, não iônica e anfotérica (GEORGIOU, et al., 1992; JOHNSEN, et al., 2005). Esta característica promove aos tensoativos a propriedade de redutor da tensão superficial e interfacial de líquidos imiscíveis, fazendo-os alvos de pesquisas e de grande interesse a muitas indústrias, como: agroquímicas, ambientais, petroquímicas, farmacêuticas, mineração, entre outras (GHOJAVAND, et al., 2008, BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Os surfactantes sintéticos são compostos não biodegradáveis, podendo ser tóxicos para o ambiente, são produzidos utilizando derivados de petróleo. Devido a crescente conscientização da necessidade de proteção do ambiente e a criação de novas legislações de controle ambiental (NITSCHKE e PASTORE, 2002), os surfactantes podem ser de origem sintética ou natural, sendo denominados biosurfactantes. Por isso, tem-se estudado com maior frequência essas biomoléculas. Contudo, a produção destes ainda não é economicamente viável se comparada à produção do surfactante sintético (NITSCHKE e COSTA, 2007).

Biosurfactantes são compostos com propriedades semelhantes aos surfactantes sintéticos, no entanto, ainda apresentam baixa ou nenhuma toxicidade, elevada biodegradabilidade e especificidade, e podem conservar-se estáveis em diferentes faixas de pH, temperatura e salinidade (DESAI e BANAT, 1997). Esses biosurfactantes promovem a emulsificação dos hidrocarbonetos, tornando-os miscíveis em água, isso reduz a tensão superficial e eleva o deslocamento de compostos oleosos (BANAT, 1995). Portanto, propiciam a biodegradação de contaminantes por aumentarem o contato deste com os microrganismos (JOHNSEN, et al., 2005).

Os biotensoativos são produzidos por diferentes organismos, como: microrganismos, plantas e também pelos seres humanos. Para produção dos biosurfactantes, os microrganismos utilizam substratos importantes, como açúcares, hidrocarbonetos e resíduos agroindustriais (NITSCHKE e PASTORE, 2002). A utilização de resíduos industriais tem sido muito relatada em artigos, pois a geração mundial destes é maior que 3,5 bilhões de toneladas de resíduos a cada ano. Por isso, é

necessário destino apropriado para estes resíduos, evitando descarte incorreto e danos ambientais (GRAMINHA, et al., 2008).

Em síntese, a formação dos biossurfactantes faz com que se reduza a tensão superficial na interface água e hidrocarboneto e, ainda, pode resultar na pseudossolubilização desse hidrocarboneto pela formação de micelas ou vesículas. Isso leva ao aumento de mobilidade, biodisponibilidade e a subsequente degradação pelo microrganismo (BODOUR e MAIER, 2002).

A fim de substituir o uso do surfactante sintético por um composto biológico, é indispensável que se consiga a produção de uma substância mais efetiva e adequada para dada aplicação industrial, além de ter custos menores (ARAUJO, et al., 2013). Sabendo que o custo do meio de cultivo representa 30% do valor final da produção do biossurfactante, existe grande interesse em reduzir estes custos com a associação de material de baixo custo, como os resíduos agroindustriais.

Desta forma, o presente trabalho justifica-se devido ao seu interesse industrial e ambiental pela biomolécula a ser obtida. O interesse industrial visa à redução dos custos de produção dos biossurfactantes para torná-los competitivos quando comparados à produção por rota química convencional, visto que são biodegradáveis e não tóxicos. Já o interesse ambiental visa à redução do excedente de resíduos gerados na agroindústria nacional e também aplicação dos biossurfactantes nos processos de biorremediação e tratamento de resíduos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir bioassurfactante de baixo custo para aplicação industrial e ambiental.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1. Produzir bioassurfactante utilizando resíduos de abacaxi e/ou caju.
- 2.2.2. Selecionar a melhor fonte de nitrogênio e carbono para produção do bioassurfactante.
- 2.2.3. Aperfeiçoar a produção de bioassurfactante utilizando meio de cultivo de baixo custo.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1. Surfactantes químicos e biológicos

Surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem uma fração polar, também denominada hidrofílica, e outra apolar, hidrofóbica. A parte apolar é formada por hidrocarbonetos de cadeia alifática, grupos aromáticos e policíclicos, que pode variar de 8 a 18 átomos. A parte polar pode ser iônica, não iônica e anfotérica. Quanto à característica iônica, pode ser catiônica ou aniónica. O catiônico é caracterizado por apresentar cargas positivas quando em solução aquosa, apresentando atividade antibacteriana. O aniónico apresenta carga negativa em solução aquosa, é utilizado na fabricação de cosméticos.

Os biosurfactantes não iônicos podem ser utilizados em produtos destinados a uso infantil ou para peles com sensibilidade. Por fim, a característica anfotérica que apresenta dois sítios com cargas opostas, o que define a função acido base é a carga apresentada é o pH da solução (GEORGIOU, et al., 1992; JOHNSEN, et al., 2005). Os tensoativos, como também são chamados os surfactantes, espalham-se pela interface dos líquidos que possui polaridades diferentes, isso ocorre devido à presença de porções polares e apolares no mesmo composto. Este espalhamento provoca redução da força de coesão entre as moléculas do solvente, formando microemulsões que permitem a dispersão de hidrocarbonetos em soluções aquosas, o que faz com que diminua a tensão superficial (BEHRING, et al., 2004).

A partir de certa concentração, as moléculas de surfactante desenvolvem aglomerados denominados de micelas, que são gotículas de óleo envoltas por um filme de surfactante, que gera uma cobertura polar ou hidrofílica ao redor das gotículas de óleo, como representado na Figura 1. A Concentração micelar crítica (CMC) representa a menor concentração em que começa a ocorrer à formação das micelas, característica extremamente importante para análise do surfactante, quanto menor a CMC, mais eficiente é o tensoativo, visto que necessita de menor quantidade para reduzir a tensão superficial ao máximo (MULLIGAN, 2004). Abaixo da CMC os surfactantes apresentam-se na forma de monômeros, quando próximo da CMC há um equilíbrio entre os monômeros e micelas (HINZE e PRAMAURO, 1993). Dependendo da

estrutura e das condições experimentais, a CMC varia para cada biomolécula (MESQUITA, 2004).

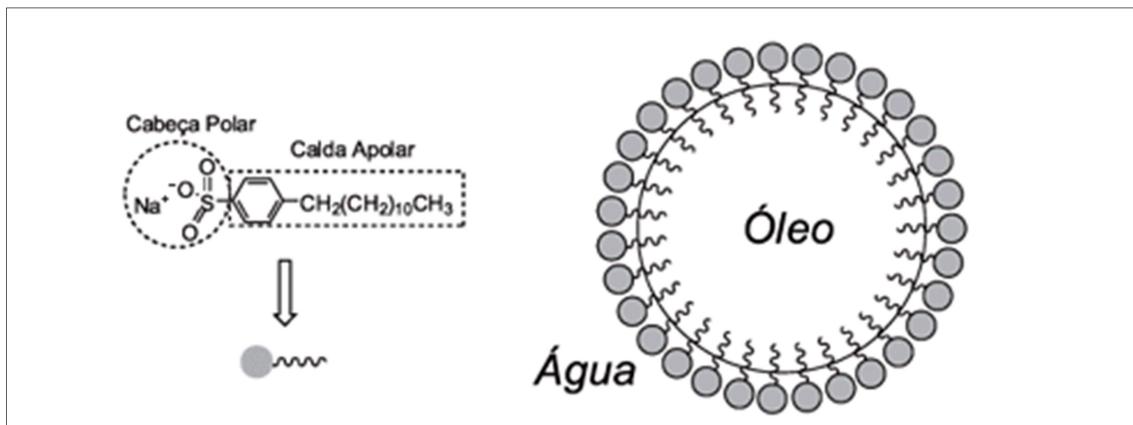


FIGURA 1: Estrutura química do dodecilbenzenossulfonato de sódio (princípio ativo do detergente doméstico) e representação de uma micela (RINALDI, et al., 2007).

As características acima citadas são interessantes comercialmente para diferentes aplicações, como na produção de emulsificantes, detergentes, capacidade espumante e lubrificante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Os surfactantes podem ser obtidos de duas formas: sinteticamente por reações químicas, ou por microrganismos específicos. Surfactantes sintéticos são compostos não biodegradáveis, ou seja, não se decompõe de forma natural, podendo ser tóxicos para o ambiente. Grande parte dos surfactantes comerciais são sintetizados utilizando derivados de petróleo ou fontes oleoquímicas, o que causa grande preocupação ambiental nos consumidores (BUENO, 2008; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

As novas legislações de controle do meio ambiente levaram à busca por surfactantes naturais com finalidade de substituir os produtos existentes no mercado (DESAI e BANAT, 1997). A produção mundial de surfactantes, em 2004, superava 11 milhões de toneladas por ano, considerando surfactantes e biosurfactantes. Visto que, grande parte dos tensoativos químicos é empregada como matéria-prima para fabricação de detergentes domésticos (CAMEOTRA e MAKKAR, 2004).

As leis ambientais estão sendo aprovadas para que as indústrias poluentes sejam responsabilizadas e paguem pelos danos ambientais (MEYER, et al., 2014). Com a finalidade de substituir o uso do surfactante sintético por um composto biológico, é imprescindível ter um agente apropriado e eficaz para aplicação industrial e que possa ser produzido a menores custos (ARAUJO, et al., 2013).

Desta forma, torna-se viável a utilização de biosurfactantes, sendo eficaz e de baixa toxicidade (BANAT, 1995). Além disso, estes compostos têm demonstrado crescente interesse devido sua capacidade de biodegradação, produção a partir de materiais brutos e de baixo custo e eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (BODOUR e MAIER, 2002).

Surfactantes naturais, também denominados biosurfactantes ou biotensativos, são compostos com propriedades emulsificantes semelhantes aos surfactantes sintéticos. No entanto, ainda apresentam baixa ou nenhuma toxicidade, elevada biodegradabilidade e especificidade, e podem conservar-se estáveis em diferentes faixas de pH, temperatura e salinidade (DESAI e BANAT, 1997). São produzidos a partir do metabolismo dos microrganismos (CAMEOTRA e MAKKAR 2004; BOGNOLI, 1999; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Esses biosurfactantes promovem a emulsificação dos hidrocarbonetos, tornando-os miscíveis em água, o que reduz a tensão superficial e eleva o deslocamento de compostos oleosos (BANAT, 1995). Propiciando a biodegradação do contaminante por aumentarem o contato deste com os microrganismos, o que torna o contaminante com maior disponibilidade (JOHNSEN, et al., 2005).

Denomina-se biosurfactantes àqueles Jarvis e Johnson (1949) iniciaram a utilização de biosurfactantes, quando descobriram atividades antibióticas e hemolíticas de um rammolípídeo. Depois, foi desvendada a produção da surfactina, um biosurfactante muito estudado, produzido por *Bacillus subtilis* (ARIMA, et al., 1968). Posteriormente, pesquisadores descobriram a produção de biosurfactantes em meios hidrofóbicos, o que permitiu o estudo de microrganismos produtores de surfactantes, para aplicações em tratamento de resíduos oleosos, recuperação de petróleo, e biorremediação de áreas contaminadas (BARROS, et al., 2007).

As estruturas dos tensoativos microbianos, são iguais aos surfactantes sintéticos: polímeros com moléculas anfipáticas contendo porções polares e apolares que possibilitam a formação de micelas que se depositam na interface entre líquidos de polaridades distintas. A porção lipofílica geralmente é composta por cadeia de

hidrocarbonetos de um ou mais ácidos graxos que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados. A parte solúvel em água pode ser formada por um carboxilato, grupo hidróxi ou uma estrutura mais complexa como aminoácidos, carboidrato, fosfato, dentre outros (DESAI e BANAT, 1997). A grande parte a carga elétrica dos biossurfactantes é neutra ou carregada negativamente, variando de pequenos ácidos graxos a polímeros. Os biossurfactantes aniónicos possuem um carboxilato e/ou fosfato, mais raro, um grupo sulfato. Por outro lado, os biossurfactantes catiônicos apenas parte possuem grupamento amino (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes são moléculas complexas que possuem diferentes estruturas sendo elas, glicolipídios, fosfolipídios, ácidos graxos, complexos proteicos de polissacarídeo e lipopeptídios (CHANDRAN e DAS, 2011). Exemplos de biossurfactantes bastante estudados são os rammolipídeos e as surfactinas, produzidos por *Pseudomonas sp.* e *Bacillus sp.*, respectivamente (NITSCHKE, et al., 2005; LIU, et al., 2010), representados na Figura 2.

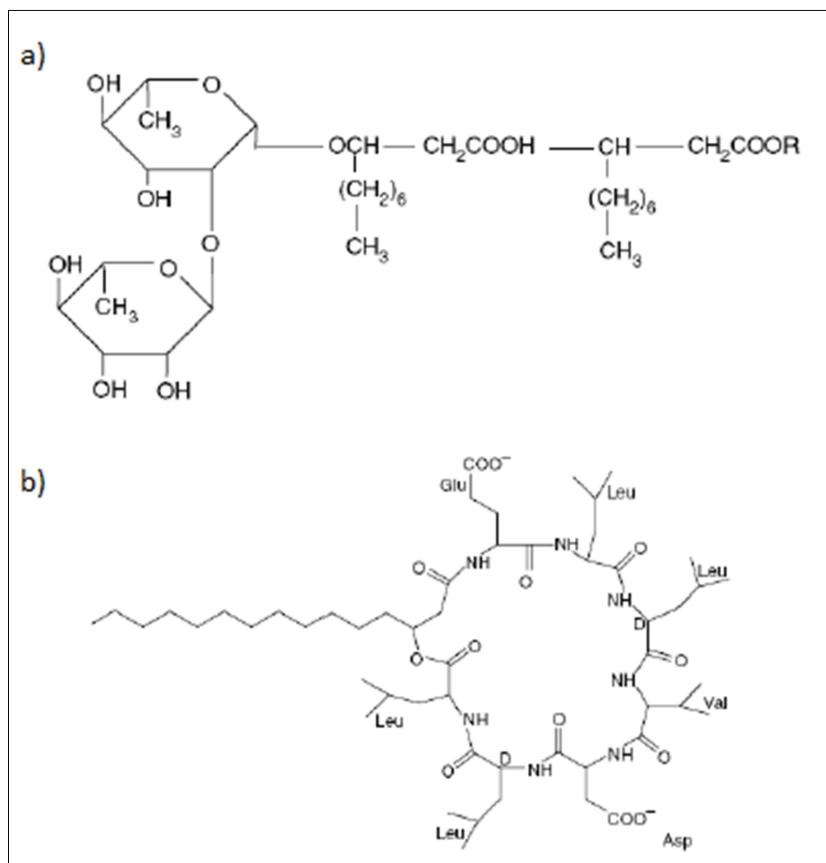


FIGURA 2: Estrutura química de biossurfactantes a) rammolipídeo e b) surfactina (adaptado de CHRISTOFI e IVSHINA, 2002).

Os ramnolipídeos e as surfactinas são alguns dos biossurfactantes mais estudados. Ramnolipídeos são biossurfactantes da classe glicolipídica, diferenciando sua estrutura química em uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (ácido caprílico). Enquanto a surfactina está na classe dos lipopeptídeos, sua estrutura é caracterizada por um anel formado por sete aminoácidos (Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) e a parte apolar composta por um ácido graxo β -hidroxilado de 13 a 15 carbonos (ARAUJO, 2013).

Os tensoativos microbianos são classificados conforme sua composição química e origem microbiana, enquanto os surfactantes sintéticos são divididos pelos grupos polares (ARAUJO, 2013). Os surfactantes lipoproteícos são os principais representantes, suas principais funções são atividades antibióticas, antivirais, antitumorais, imunomoduladores ou inibidores de enzimas e toxinas, tendo como exemplo, surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina.

Os biotensoativos podem ser classificados também de acordo com a massa molecular. Aqueles que apresentam elevada massa molecular são particulados e poliméricos, a principal propriedade é capacidade de emulsão, enquanto os de baixa massa molecular, representados pelos glicolipídeos, lipopeptídeos e ácidos graxos, possuem capacidade de reduzir a tensão interfacial (ROSENBERG e RON 1997; ROSENBERG e RON, 1999).

Muitos microrganismos são capazes de sintetizar biossurfactantes, mas os produzidos por bactérias, que são os mais estudados, não são utilizados na indústria alimentícia, pois apresentam patogenicidade. Desta forma, tem-se um grande interesse em se estudar as leveduras produtoras de biossurfactantes, pois estas possuem baixo ou nenhum riscos de toxicidade e patogenicidade. Algumas espécies de leveduras como *Candida sp.* e *Yarrowia sp.* são muito estudadas e possuem positiva produção de biossurfactantes (AMARAL, et al., 2010).

Na maioria dos casos, é na fase estacionária do crescimento que a produção do biossurfactante ocorre (RON e ROSENBERG, 2001). Em alguns microrganismos, em que a produção ocorre na fase exponencial, a atividade de emulsificação com maior representatividade ocorre na fase estacionária. A Tabela 1 representa alguns dos principais tipos de biossurfactantes e microrganismos produtores.

TABELA 1: Principais bioassurfactantes produzidos por microrganismos.

TIPO DE BIOSSURFACTANTE	MICRORGANISMO
Glicolipídeos	
* Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa; Serratia rubidea</i>
* Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola; Candida bombicola</i>
Ácidos graxos e Fosfolipídeos	
* Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
* Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
* Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
* Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
* Surfactina	<i>Bacillus subtilis; Bacillus pumilus</i>
* Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
* Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
* Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Surfactantes poliméricos	
* Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
* Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
* Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Surfactantes particulados	
* Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
* Células	Diversas bactérias

Fonte: MULLIGAN, 2004.

3.1.1. Propriedades particulares dos bioassurfactantes

Os biotensativos, quando avaliada a redução da atividade superficial e interfacial, são mais efetivos que os surfactantes sintéticos convencionais, visto que para reduzir a tensão superficial dos líquidos é necessário menor quantidade de bioassurfactante (BANAT, 1995; MULLIGAN, 2004).

A estabilidade funcional dos surfactantes biológicos, propriedade extremamente interessante em aplicações industriais, apresenta uma faixa mais ampla que os surfactantes químicos, para diferentes parâmetros como temperatura, pH e salinidade.

Os surfactantes químicos tornam-se inativos quando submetidos variações extremas de temperatura, pH e concentrações de cloreto de sódio (HOROWITZ; GILBERT; GRIFFIN, 1990; ROCHA, et al., 1992; BOGNOLI, 1999).

Ainda os bio surfactantes são biomoléculas biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade. Essas propriedades tornam esse composto extremamente interessante devido à conscientização da preservação do ambiente e também ao cuidado da utilização destes em cosméticos, medicamentos e produtos alimentícios (FLASZ, et al., 1998; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

3.2. Produção biotecnológica microbiana

Vários organismos vivos têm capacidade de sintetizar compostos com propriedades surfactantes, como plantas, que produzem saponinas, microrganismos, produtores de surfactina e, menos citado, o organismo humano, com sais biliares (NITSCHKE e PASTORE, 2006). Tensoativos de origem microbiana podem ser subprodutos metabólicos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CHANDRAN e DAS, 2011).

O bio surfactante produzido pelos microrganismos é específico de cada grupo, variando de espécie para espécie. Os microrganismos que produzem bio surfactantes pertencem a diversos gêneros microbianos, sendo a grande maioria produzida por bactérias (DENSAI e BANAT, 1997).

A maior parte dos bio surfactantes citados na literatura é originada de bactérias como *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Arthrobacter sp.* (GOUVEIA, et al., 2003). Contudo, grande maioria dos surfactantes microbianos de origem bacteriana não é adequada para ser aplicada na indústria de alimentos, pois é de natureza patogênica (SHEPERD, et al., 1995).

Sendo assim, houve um aumento no interesse em se estudar as leveduras produtoras de bio surfactantes, pois estas não possuem riscos de toxicidade e patogenicidade (AMARAL, et al., 2010). Devido a estas características, os bio surfactantes atraíram a atenção dos pesquisadores em diversos campos de estudo, podendo ser considerado um material multifuncional (KITAMOTO, et al., 2001). Porém, não são utilizados amplamente, visto que existe ainda um alto custo de produção, que é ainda mais prejudicado com os métodos ineficazes de recuperação dos produtos e a utilização de substratos caros (ROCHA, et al., 2006).

Com esses empecilhos, surgiu a possibilidade de utilizarem-se substratos alternativos como resíduos agroindustriais, que podem contribuir com a redução dos custos de produção do meio de cultivo, visto que este representa, aproximadamente, 30% dos custos do produto final do processo fermentativo (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). Com a utilização de resíduos agroindustriais surge o problema da seleção de substratos que possuem balanços corretos de nutrientes que suportem o crescimento celular e a produção dos compostos alvo (NISTCHKE e PASTORE, 2006).

Quando se trata da forma de disponibilização do biossurfactante, às vezes a célula microbiana pode apresentar significativa capacidade emulsificante e comportar-se como biossurfactante, na qual a ação solvente de hidrocarboneto na superfície lipofílica da célula, causa perda da incolumidade estrutural, o que promove liberação dos componentes tensoativos para o meio externo. Contudo, somente os biossurfactantes de origem extracelular possuem capacidade de diminuir a tensão superficial de uma fase aquosa (FRANCY, et al., 1991).

3.2.1. Métodos de produção

A produção dos biossurfactantes pode ocorrer de duas formas, espontânea ou induzida. Quando a forma é induzida, utilizam-se fatores como adição de compostos lipofílicos, alterações de temperatura, pH, aeração e agitação, ou sob condições de estresse sendo as fontes de nitrogênio baixas (DESAI e BANAT, 1997).

A forma de condução do processo é muito importante. Processos fermentativos para produção de produtos industriais têm as principais vantagens: obtenção em qualquer época do ano, baixo custo, reduzida toxicidade em relação a outros surfactantes, permite utilizar substratos baratos, espaço utilizado relativamente pequeno, e controle das condições de cultivo (BARBIERI, et al., 2012).

Dentre as várias formas de cultivo para leveduras, é comumente utilizado o processo de batelada (sem adição de substrato e sem retirada de produto durante a fermentação) ou batelada alimentada (com adição de substrato durante a fermentação e com retirada de produto somente no final do processo) (SYLDATK e WAGNER, 1987).

As diferenças nas características do processo de batelada e batelada alimentada fazem com que suas aplicações sejam atrativas para uma grande gama de processos fermentativos, uma vez que exigem menos em termos de equipamentos e manutenção.

São mais seguros em relação à manutenção das condições de assepsia, pois a cada batelada o reator é esterilizado junto ao novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo responsável pelo processo (SYLDATK e WAGNER, 1987).

Durante o processo por batelada simples apenas é acrescentado, exceto oxigênio em processos aeróbicos, antiespumante e ácido ou base para controle do pH. No entanto, no processo de batelada alimentada, os nutrientes, ou parte deles, são acrescidos ao biorreator por um fluxo de alimentação que, por não haver retirada, gera um contínuo acréscimo do volume tomado no reator. Desta forma, a escolha apropriada da forma de condução do processo é importante, podendo alterar a produtividade do produto esperado (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

3.2.1.1. Fatores que afetam a produção

As características dos biosurfactantes podem ser influenciadas por diversos fatores, como pela fonte de carbono ou de nitrogênio para os microrganismos, bem como pela concentração de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de cultivo. Outros fatores que podem influenciar são pH, temperatura, agitação ou a forma na qual se conduz o processo. Todas estas características são fundamentais na qualidade e na quantidade do biosurfactante produzido (BANAT, 1995). A otimização do processo e do meio de cultura utilizado é muito importante para obter o máximo rendimento com menor custo, tornando o biosurfactante economicamente mais competitivo que os surfactantes químicos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Desai e Banat (1997) citam uma forma de produção de biosurfactante na qual não há multiplicação celular, chamada de *resting cells*, em que as células presentes utilizam de uma fonte de carbono para produzir o biosurfactante. Existem algumas citações de produção de biosurfactantes por *resting cells* de leveduras, por exemplo, Kitamoto, et al. (1992) citam a produção de manosíleritritol por *Candida antarctica*, produção de soforolipídeos produzida por *Torulopsis bombicola* (CASAS e GARCIA-OCHOA, 1999).

Sarubbo e colaboradores (2001) utilizaram glicose como fonte de carbono e produziram biosurfactante, em uma fermentação com a levedura *Candida lipolytica*, que resultou em uma elevada atividade de emulsificação. Demonstraram que não é preciso introduzir hidrocarbonetos para a geração de biosurfactantes. Ainda, Amaral, et al. (2006) utilizaram da mesma fonte de carbono para sintetizar biosurfactante, a partir

do microrganismo *Yarrowia lipolytica*, o qual mostrou-se com elevada atividade de emulsificação dos compostos óleo-água. Enquanto Lukondeh, et al. (2003) utilizaram meio de cultura com lactose, no qual a levedura *Kluyveromyces marxianus* produziu manoproteínas com propriedades emulsificantes.

Além da produção de biossurfactantes utilizando-se fontes de carbono solúveis em água, podemos encontrar estudos que revelaram maiores produções quando adicionado substratos hidrofóbicos (HOMMEL, et al., 1994). Outros trabalhos citam a importância de utilizar ambos os substratos, insolúvel em água e carboidrato, na composição do meio de cultivo.

Farias e Sarubbo (2006) utilizando *Candida lipolytica*, fizeram uma otimização da produção de biossurfactante utilizando óleo de canola (100 g L^{-1}) e glicose (100 g L^{-1}). O biossurfactante obtido reduziu a tensão superficial de 71 mN m^{-1} para, aproximadamente, 30 mN m^{-1} .

Outro componente muito estudado e essencial para o crescimento celular é o nitrogênio, visto que é extremamente importante na síntese de proteínas e enzimas. Diversas fontes de nitrogênio podem ser utilizadas na produção de biossurfactantes, como a milhocina (SANTANA, et al., 2005), peptona (KIM, et al., 2006), extrato de levedura (CASAS e GARCIA-OCHOA, 1999), dentre outros substratos. A fonte de nitrogênio comumente utilizada na produção de biossurfactante é o extrato de levedura, o qual a concentração a ser utilizada varia conforme o meio de produção e o microrganismo a ser utilizado.

Quando a fonte de nitrogênio está escassa, durante a fase estacionária do crescimento microbiano, é o principal momento da produção de biossurfactante (KIM, et al., 2006). Cooper e Paddock (1984) mencionaram a implicação da fonte de nitrogênio, como nitrato de sódio, cloreto de amônio, nitrato de amônio e extrato de levedura, na produção de biossurfactante, utilizando *Torulopsis bombicola* sob agitação. Notaram que o nitrato não é uma fonte de nitrogênio ideal, pois proporcionou redução na produção do biossurfactante. Enquanto, o extrato de levedura, na concentração de 5 g L^{-1} , melhorou a produção de biossurfactante, se substituído o extrato de levedura por peptona, a concentração de biossurfactante foi reduzida à metade e quando se substitui por ureia a produção foi extremamente baixa.

Quando, Zinjarde e Pant (2002) estudaram a produção de biossurfactante utilizando *Yarrowia lipolytica* com diferentes fontes de nitrogênio, como sulfato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio e ureia, obtiveram como resultado a

redução pela metade, da produção de biossurfactante, quando adicionado nitrato de amônio e ureia. Já a adição de sulfato de amônio e cloreto de amônio proporcionou elevada atividade de emulsificação.

Visto a relevante importância dos componentes do meio de cultivo, deve-se levar em consideração o controle das condições operacionais, sendo estas temperatura, pH e agitação, que são extremamente importantes no sucesso da ampliação de escala de produção dos biossurfactantes, o que vão torná-los ou não economicamente viáveis quando relacionados aos surfactantes químicos (BANAT, 1995).

Quando estudado o efeito do pH na produção de biossurfactante, utilizando *Candida antarctica*, empregando tampão fosfato em pHs de 4,0 a 8,0, os tampões demonstraram redução no rendimento se comparados à água destilada (KITAMOTO, et al., 2001). Zinjarde e Pant (2002) após estudar a influência do pH inicial na produção do biossurfactante, por *Yarrowia lipolytica*, concluíram que a maior produção foi em pH inicial igual a 8,0, que corresponde ao pH natural da água do mar.

Tratando-se do efeito da temperatura, quando Kitamoto, et al. (2001) estudaram a produção de manosileritritol por *resting cells* e por crescimento celular utilizando *Candida antarctica*, nas duas conduções a produção elevada foi observada a 25°C.

A agitação é um fator muito importante, visto que permite a transferência de oxigênio, da fase gasosa para aquosa, de forma mais fácil (SCHMIDELL, et al., 2001). Ainda, permite um contato homogêneo dos microrganismos com os substratos. E quando é possível utilizar-se de agitações mais baixas, pode-se auxiliar na redução de gastos e na prevenção do desgaste dos equipamentos.

Quando levado em consideração a acidez do meio de cultivo, Bednarski, et al. (2004) correlacionaram com a produção de glicolipídeos, por *Candida antarctica* e *Candida apícola*. O resultado em pH 5,5 foi o que demonstrou maior produção. Enquanto que quando o pH não foi ajustado, houve um efeito negativo na síntese de biossurfactante.

3.2.2. Parâmetro de avaliação

3.2.2.1. Tensão superficial

A tensão superficial surge nos líquidos como consequência do desequilíbrio entre as forças atuando sobre as moléculas da superfície em relação àquelas que se localizam

no interior da solução. A força que atrai as moléculas da superfície de um líquido para o seu cerne, é o principal obstáculo para o desenvolvimento de bolhas e gotas em líquidos.

As forças de coesão tendem a reduzir a área superficial ocupada pelo líquido, nota-se com frequência gotas tomarem a forma esférica. Esta força que atua na superfície dos líquidos possui o nome de tensão superficial, sendo quantificada determinando-se o trabalho necessário para aumentar a área superficial. Quanto menor a tensão superficial mais fácil de o líquido espalhar-se (ADAMSON e GAST, 1997).

Para demonstrar a eficiência de um surfactante, determina-se a capacidade deste em reduzir a tensão superficial do líquido em estudo. A tensão superficial é a medida de energia livre da superfície pela unidade de área, energia esta, necessária para mover uma molécula do interior para a superfície do líquido (MULLIGAN, 2004; PIRÔLLO, 2006). Mulligan (2004) estudando tensão superficial descreveu que com a presença de surfactantes, é necessária menor energia para mover uma molécula à superfície o que proporciona uma menor tensão superficial. Sendo assim, um surfactante de boa qualidade pode diminuir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN m⁻¹.

Os tensoativos em solução ocupam a superfície do líquido, reduzindo a força de coesão entre as moléculas do solvente e, por conseguinte, diminuindo a tensão superficial, isso ocorre devido à presença do grupo lipofílico nos tensoativos (BEHRING, 2004). Com a diminuição da tensão superficial têm-se os efeitos molhante, espalhante e penetrante e maior velocidade de absorção (IOST e RAETANO, 2010).

3.2.3. Microrganismos

As bactérias e leveduras são os microrganismos mais estudados como produtores de biossurfactante. Embora as pesquisas estejam focadas em estudar as bactérias, algumas espécies são patogênicas, o que prejudica a aplicação dos biossurfactantes produzidos em algumas indústrias como a alimentícia (SHEPHERD, et al. 1995). Enquanto a utilização de leveduras apresenta produção de biotensoativos não patogênicos e não tóxicos, desta forma é possível à aplicação destes microrganismos e seus metabólitos em diversos setores industriais (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

3.2.3.1. Leveduras

As leveduras são caracterizadas como microrganismos unicelulares, brancas ou avermelhadas, variam de tamanho de 1 a 5 μm de diâmetro e 5 a 30 μm de comprimento. Apresentando forma diversificada, como esféricas, elípticas, filamentosas (DE HOOG, et al., 2000). Em sua estrutura podemos nos deparar com uma membrana citoplasmática lipoproteica, que possui função de regular as trocas com o meio externo e apresentam parede celular rígida. São classificadas como células eucarióticas, se reproduzem de forma sexuada ou assexuada, sendo respectivamente, formação de esporos e brotamento ou divisão binária (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975).

3.2.3.2. Leveduras da Antártida

As leveduras do ambiente subglacial são capazes de tolerar extensa faixa de temperaturas e que por serem resistentes ao congelamento e descongelamento são classificadas como halotolerantes. Foram caracterizadas como incapazes de formar micélios e quanto ao tamanho, são relativamente menores quando comparadas as outras leveduras (BUTINAR, et al., 2005). Uma possível explicação para a aptidão de manter-se congeladas por longos períodos, estando ainda viáveis, pode ser esclarecida pela habilidade de as leveduras encontradas no gelo acionarem a reparação de danos macromoleculares quando necessário, como a reparação do DNA (CHRISTNER, 2000; BIDLE, et al., 2007).

As leveduras presentes em ambientes extremamente frios têm sido isoladas de neve fresca e gelos subglaciais no Ártico, antigo gelo de geleiras de diferentes locais do mundo e uma variedade de ambientes Antárticos (AMATO, et al., 2007; BUTINAR, et al., 2007; CHRISTNER, et al., 2000; VISHNIAC, 2006). Visto que se sabe pouco sobre os recursos genéticos das comunidades microbianas da Antártida, Duarte, et al. (2013) estudaram amostras de leveduras obtidas de ambientes terrestres e marinhos, bem como suas capacidades de produção de enzimas ativas em temperaturas baixas a moderadas. A levedura *Cryptococcus victoriae* se destacou como uma das espécies mais abundantes, encontrada em sedimentos marinhos, líquens e *Salpa sp.*

Os microrganismos extremófilos da região do continente antártico são adaptados às temperaturas baixas. Grande parte destes microrganismos está presente na água líquida, esta encontra-se presente em uma interação de capilares nos terminais dos

grãos, entre os cristais de gelo (PRICE, 2000). Estes microrganismos vivem em ambientes desfavoráveis para atividades metabólicas comuns, porém desenvolveram adaptações no sistema enzimático e membranas que fazem com que eles sobrevivam e proliferem em condições adversas (CORRADI DA SILVA, et al., 2006).

Os microrganismos que vivem nos locais com mais de uma limitação, como temperatura, nutrientes, luz, etc., são obrigados a produzir substâncias de defesa contra os efeitos nocivos do ambiente em que são expostos. As condições climáticas mais extremas do planeta são encontradas na Antártida, local seco, frio e ventoso. As populações microbianas presentes neste território são fontes potenciais de enzimas e metabólitos que podem ser aplicadas biotecnologicamente em diversas áreas da saúde, indústria e agricultura (ECUADOR, 2010).

Foram realizados alguns estudos com produção de biossurfactante a partir leveduras provenientes da antártica. Kimura e colaboradores (1975) avaliaram o efeito do biossurfactante *mannosylerythritol lipidico*, produzido pela levedura *Pseudozyma antarctica*, sobre a hidratação de peles danificadas, notaram que a aplicação dessas biomoléculas reverteu os danos na pele. Isso confirma a capacidade de leveduras antárticas produzirem biossurfactantes, com aplicabilidade em diferentes setores industriais, como na área dos cosméticos.

Outro estudo com levedura da Antártida foi a produção e caracterização do biossurfactante produzido por. Gesheva e colaboradores (2010), utilizando *Rhodococcus fascians*, descobriram que o tensoativo produzido é um glicolipídeo que contém ramnose, sendo capaz de reduzir a tensão superficial na interface água-ar para 27 mN m^{-1} . O mesmo biotensoativo foi capaz de inibir o crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e apresentou atividade hemolítica.

3.2.3.3. *Cryptococcus victoriae*

A levedura utilizada na pesquisa, *Cryptococcus victoriae* é um fungo que pertence ao filo Basidiomycota, do gênero *Cryptococcus*, primeiramente descrita por Montes e colaboradores (1999) e codificada por Duarte (2013) como L92. A origem ambiental foi em líquens presentes em rochas no ambiente antártico. Essas leveduras, na maioria das vezes, dão origem a colônias convexas, lisas, redondas, de coloração rosa clara ou pêssego, variando de acordo com a cepa. Sua reprodução ocorre de forma assexuada

através de brotação multilateral (FELL, et al., 2000). A temperatura de crescimento foi indicada entre 5 ° C e 20 ° C, com um ótimo a 15 ° C.

Todas as espécies do gênero *Cryptococcus*, podem assimilar glicose e galactose, e todas elas podem assimilar pelo menos vários outros tipos de açúcar, sugerindo um gênero de leveduras generalistas em vez de especialistas (BENHAM, 1956; KREGER-VAN RIJ, 1964). Os *Cryptococcus* também foram citados na literatura em relação ao seu uso na biotecnologia, por possuírem potencial para produzir novas enzimas e biomoléculas, como agentes para degradação xenobiótica ou novos produtos químicos farmacêuticos (SHIVAJI e PRASAD, 2009).

3.2.4. Meios de cultivo

Os componentes do meio de cultivo são fatores de importância na composição e características dos bioativos produzidos. Por exemplo, a escolha correta das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, ferro, manganês e magnésio são fatores extremamente especiais. Outros fatores como temperatura, agitação, pH e forma de se conduzir o experimento também são muito importantes, principalmente na determinação de quantidade e qualidade do bioativo a ser produzido (BANAT, 1995).

Para produção dos bioativos, os microrganismos utilizam substratos importantes, como açúcares, hidrocarbonetos, sais e resíduos agroindustriais (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Visto que podemos produzir os bioativos utilizando resíduos e sabendo que há uma dificuldade em se utilizar industrialmente os bioativos, sendo que na maioria dos casos os custos de produção são elevados e acompanha a aplicação de substratos onerosos. Os custos podem ser reduzidos utilizando fontes alternativas de nutrientes que, em alguns casos, pode elevar o rendimento do produto (GALLERT e WINTER, 2002). Uma das alternativas para resolver este empecilho seria reaproveitar os subprodutos industriais, como os resíduos agroindustriais. A utilização de resíduos industriais tem sido muito relatada em artigos, pois a produção mundial destes, relacionados a processos agroindustriais, é maior que 3,5 bilhões de toneladas de resíduos a cada ano. Sendo necessária a aplicação dos resíduos na produção de bioativos, auxiliando na redução do descarte inadequado (GRAMINHA, et al., 2008).

Essa tática reduz os custos de produção do biossurfactante e como consequência reduz o potencial poluidor ocasionado pelos dejetos lançados no ambiente (MANEERAT, 2005). Grande parte das indústrias de alimentos emprega gorduras e óleos, o que origina grande quantidade de resíduos graxos. Visto que os resíduos estão se acumulando, tem crescido o interesse em dar melhor destino a esses materiais, para serem utilizados como fonte de nutrientes para os microrganismos (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

Thanomsub e colaboradores (2004) empregaram como fonte de carbono o óleo de soja queimado, derivado da fritura, para produção de biossurfactante glicolipídico a partir de *Candida ishwadae*, o biossurfactante obtido apresentou-se com elevada atividade de emulsificação.

A produção dos biossurfactantes ocorre quando se utiliza tanto fontes de carbono solúveis quanto insolúveis em água. No entanto, há relatos na literatura que é preferível a combinação de substratos insolúveis e carboidratos. Os carboidratos seriam utilizados para formação da parte polar da molécula, enquanto os compostos insolúveis formariam a parte apolar dos surfactantes biológicos (HOMMEL, et al., 1994).

Assim como a fonte de carbono é fundamental na produção do biotensoativos, o nitrogênio possui grande importância, sendo imprescindível para o crescimento celular e para a síntese de proteínas. De acordo com Fontes e colaboradores (2008) a principal fonte de nitrogênio estudada é o extrato de levedura, variando a quantidade aplicada de acordo com o microrganismo estudado.

A relação entre as fontes de carbono e nitrogênio é parâmetro de diversos estudos. Em pesquisa avaliando *Rhodotorula glutinis*, empregando diferentes razões C/N na produção de biossurfactantes, obteve-se um aumento da emulsificação com o incremento da relação C/N (ANDRADE, et al., 2006; FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

3.2.5. Resíduos industriais

Todos os anos são produzidos bilhões de toneladas de resíduos das indústrias de diversas áreas. Estes resíduos são prejudiciais ao ambiente e à saúde dos seres humanos. Dessa forma, a utilização desses rejeitos como matéria-prima de processos biotecnológica se torna um destino vantajoso, pois reduz os custos de produção das

biomoléculas e minimiza os impactos causados pelo descarte inadequado dos resíduos no meio ambiente (MANEERAT, 2005; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Devido à presença de elevada quantidade de carboidratos, lipídeos e sais nos resíduos agroindustriais, estes apresentam potenciais matérias-primas para a produção dos biossurfactantes (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Na agroindústria temos diversos resíduos que podem ser utilizados, muitos deles já descritos na literatura, óleo de soja, milho, coco, canola e outros; dejetos domésticos e comerciais, como o óleo de fritura; água de manipueira; milhocina; resíduos da fabricação de balas; águas residuais e vinhaça advindas do processamento de cana; vários outros (THOMPSON; FOX; BALA, 2000; MERCADÉ, et al., 1993; OHNO; ANO; SHODA, 1995; GALLERT e WINTER, 2002).

A principal barreira na utilização dos resíduos na formulação do meio de cultivo é o ajuste da composição dos nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo e desenvolvimento da biomolécula alvo. Podendo ser pouco interessante caso haja necessidade de gastos com transporte, armazenamento e tratamento antes do processamento, o que encarece o processo (NITSCHKE e PASTORE, 2003). Thavasi e colaboradores (2007) utilizando de fontes renováveis de baixo custo e disponíveis produziram biossurfactante testando três microrganismos, notaram que os três foram capazes de produzir um complexo glicopeptídico com capacidade de emulsionar diferentes hidrocarbonetos.

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) são utilizados apenas 15 a 20% da polpa de caju na fabricação de suco, doces, vinhos ou consumo *in natura*. Milhares de toneladas de pedúnculo são jogados fora, cada quilo de castanha de caju corresponde a nove quilos de pedúnculo. Desta forma estima-se que o Brasil desperdice mais de um milhão de toneladas de pedúnculo (OLIVEIRA, 2010).

3.3. Planejamento e otimização

O planejamento experimental e a otimização são passos importantes na metodologia trabalhada. Os métodos analíticos devem atender condições de qualidade como, confiabilidade e comparabilidade. Geralmente o processo é afetado por um grande número de variáveis ou fatores. A otimização é uma fase com o objetivo de se encontrar valores das variáveis que apresentam a melhor resposta provável. Existem duas estratégias de otimização: as técnicas univariada e multivariada. Na univariada,

varia-se um fator por vez, enquanto os demais fatores ficam constantes, não é levado em consideração as interações entre os fatores, nesta abordagem o número de experimentos é importante. Enquanto, na multivariada, diversos fatores são estudados simultaneamente em um número definido de experimentos, variando os níveis dos fatores envolvidos no processo (CANDIOTI et al., 2014).

De acordo com Oberoi, et al. (2014), design multivariado de experimentos (DOE) e a metodologia de superfície de resposta (MSR) são essenciais para o desenvolvimento, aprimoramento e melhoria dos processos. Visto que a otimização de múltiplos parâmetros é demorada, a MRS pode ser empregada na avaliação da significância de vários fatores, principalmente quando há interações entre fatores, sendo elas complexas de estipular.

Segundo Zhen e colaboradores (2013) a MSR é obtida baseado no planejamento experimental, que determina os valores dos fatores para a condução de experimentos e obtenção de dados. Os dados são utilizados no desenvolvimento de um modelo empírico que relaciona a resposta do processo com os fatores. *A posteriori*, o modelo auxilia a obtenção da melhor resposta do processo, sendo validada por meio de experimentos.

A MSR é constituída por três fases, a primeira denominada triagem, em que os experimentos são direcionados com o propósito de encontrar os fatores que causam efeitos estatisticamente significativos, positiva ou negativamente, a fim de atingir o objetivo do estudo; a segunda nomeada modelagem, em que os experimentos possuem a finalidade de modelar a característica de interesse em função dos fatores avaliados; a otimização, terceira fase, na qual o modelo de resposta é analisado para determinar os valores das variáveis nas quais são obtidas as condições ótimas do sistema (COSTA et al., 2011).

Em diversos estudos, as análises envolvem múltiplas respostas, estas devem ser otimizadas simultaneamente, uma vez que a análise univariada pode apresentar soluções incompatíveis. Esta análise simultânea é empregada na MSR, consiste em converter as respostas múltiplas em uma única resposta, combinando as respostas individuais em uma função composta acompanhada de sua otimização. A técnica de deseabilidade é uma das mais utilizadas, apresenta métodos fáceis de compreender e de empregar e possui flexibilidade para incorporar as preferências por decisões (pesos ou prioridades destinadas às respostas). O método de deseabilidade mais utilizado, proposto por Derringer e Suich (1980) está disponível em diferentes pacotes de software para análise de dados. A função de deseabilidade converte os modelos de resposta de segunda

ordem estimados em funções de deseabilidade individuais. Estas são agregadas em uma função composta (deseabilidade global). Na maioria das vezes, essa função é uma média geométrica ou aritmética, que será maximizada ou minimizada, respectivamente (COSTA et al., 2011).

Xiao, et al. (2006) observaram os efeitos da composição do meio e dos parâmetros de fermentação na produção de micélios e polissacarídeos intracelulares, usando funções de deseabilidade. Detectaram que o uso de funções de deseabilidade é eficiente na otimização de processos de fermentação com várias respostas, estando viável aplicação a outros sistemas de fermentação.

Em pesquisa, Gadhe, et al. (2013), empregaram a MRS e a função de deseabilidade, para obter a máxima produção de hidrogênio em lodo anaeróbio. Li, et al. (2007) traçaram um meio ideal para o processo de fermentação de L-glutamina, empregando metodologia de superfície de resposta. Utilizando os resultados da MSR, a função de deseabilidade foi introduzida prevendo a melhor condição do meio em relação à concentração de L-glutamina e ao custo de produção, as técnicas de otimização aplicadas demonstraram ser eficientes para aperfeiçoar o meio de fermentação para a produção de L-glutamina. Yang, et al. (2014) utilizaram métodos estatísticos sequenciais juntamente com a função deseabilidade e obtiveram êxito nos resultados confirmando a eficácia desta aplicação para modelagem matemática e análise fatorial do processo de otimização.

3.3. Aplicações

Considerando todas as propriedades dos surfactantes biológicos, temos uma vasta área de aplicação destas biomoléculas, nas indústrias, agricultura e no ambiente. No setor industrial, podem ser aplicados em produtos de limpeza, higiene, cosméticos, indústria petrolífera, de mineração, farmacêutica, alimentícia, dentre outras (DENSAI e BANAT, 1997; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; BOENOLO, 1999). Nas indústrias que possuem tanques de armazenamento de óleos, os biosurfactantes podem ser empregados reduzindo a viscosidade dos óleos e atuando na estabilidade das emulsões água-óleo (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002). Na agricultura, na formulação de adubos foliares e agrotóxicos, pois agem como espalhantes sobre a folha, apresentando grande importância na melhor absorção de nutrientes pela planta. Tem-se utilizado amplamente os biosurfactantes, em proteção ambiental, como aumento da recuperação e controle de

derramamento de petróleo, desintoxicação e biodegradação de efluentes industriais e de solos contaminados, com uma técnica denominada biorremediação, na qual o biossurfactante age sobre o hidrocarboneto tronando este disponível para a degradação dos microrganismos (PLAZA, et al., 2006).

A biorremediação utiliza microrganismos vivos ou enzimas produzidas por eles para remover ou neutralizar a ação deles no meio ambiente (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005). Pode ser feita em locais onde ocorrem acidentes com derramamento de óleo, resolvendo um problema ecológico e social (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Visto que os biossurfactantes aumentam a interação superficial, acelerando a degradação de diversos óleos por microrganismos, através da ação sob a superfície de contato, promovendo a biorremediação de águas e solos. Os biossurfactantes podem ser aplicados na biodegradação de pesticidas e na redução de contaminação por metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo (BANAT, 1995; ALEXANDER, 1999; GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005).

Além disso, a biorremediação tem sido amplamente investigada e recomendada pela comunidade científica e governamental, uma vez que é uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação (GAYLARDE, et al., 2005). Meyer e colaboradores (2014) realizaram uma avaliação da biodegradação de diesel, biodiesel e uma mistura de 20% biodiesel/diesel, utilizando biossurfactante, em latossolos do sul do Brasil utilizando duas diferentes estratégias de biorremediação: atenuação natural e bioaumentação/bioestimulação. Os resultados mostraram que a biodegradação do biodiesel puro foi maior para o bioaumento/bioestimulação do que a atenuação natural, sugerindo que as adições de consórcio microbiano juntamente com o ajuste proporcional de macronutrientes levaram ao aumento da degradação do biodiesel. Assim, essa foi considerada a estratégia com elevado potencial de limpeza de solos contaminados com diesel e misturas de biodiesel. Percebe-se, que os biossurfactantes microbianos são favoráveis às propostas de biorremediação (LOTFABAD, et al., 2009).

A surfactina possui diversas aplicações farmacêuticas, por exemplo, inibição da formação de coágulos, atividade antibacteriana e antifúngica, atividade antiviral e antitumoral, formação de canais iônicos em membranas. O lipopeptídeo, iturina, produzido por *Bacillus subtilis*, possui atividade antifúngica, que afeta a morfologia e estrutura da membrana celular de leveduras (ARIMA, et al., 1968).

Outra aplicação é na formulação de herbicidas e pesticidas, sabe-se que estes compostos são hidrofóbicos, o que torna necessário a inserção de agentes emulsificantes para que os herbicidas e pesticidas tornem-se solúveis em soluções aquosas (PATEL e GOPINATHAN, 1986).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais de abacaxi (*Ananas comosus*) foram obtidos de restaurantes próximos a Universidade Federal de Uberlândia (UFU), enquanto os de caju (*Anacardium occidentale*) foram adquiridos em fazendas locais. Os resíduos de abacaxi e caju in natura foram processados no Laboratório de Pedologia da UFU. Posteriormente, os extratos obtidos da centrifugação à 10.000 g, por 20 minutos, temperatura de 4 °C, foram autoclavados. Os resíduos de abacaxi são compostos basicamente de casca e folhas do abacaxizeiro. Os resíduos de caju compostos basicamente do pedúnculo do fruto do cajueiro.

4.1.1. Caracterização dos resíduos agroindustriais

Os açúcares redutores totais (ART) foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959). Elaborou-se uma curva de analítica com soluções padrões de glicose nas concentrações de 0, 100, 200, 300, 500 e 600 mg e em seguida fez-se a leitura da amostra do extrato de caju e abacaxi, utilizou-se como reagente o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que é o agente oxidante. A leitura é feita em espectrofotômetro a 540 nanômetros (nm). A partir de uma curva padrão foi possível determinar a concentração de ART em g L⁻¹.

Os cálculos para a determinação dos açúcares redutores totais podem ser realizados por meio da Equação (1).

$$\text{ART (g L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Diluição da hidrólise} \times \text{Função da curva}}{1000} \quad (1)$$

4.2. Microrganismos e conservação

O microrganismo utilizado, *Cryptococcus victoriae*, codificada como L92 (DUARTE, et al., 2013) foi obtido durante uma expedição à Antártida no verão austral (2009 e 2010) pela equipe do Programa Antártico Brasileiro, veio da coleção de culturas da Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinas de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/Unicamp). A coleção é composta por 100 isolados de diferentes ambientes antárticos, tanto terrestres quanto marinhos. O *C. victoriae* foi preservado em frascos de penicilina contendo meio YPD (extrato de levedura 10 g L⁻¹; peptona 20 g L⁻¹ e glicose 20 g L⁻¹) e glicerol 50% (v/v) e conservado a -10 °C. Cada frasco de penicilina foi preenchido com a mesma cultura inicial, possibilitando utilizar-se da mesma geração durante todo o estudo.

4.3. Condições fermentativas

Para a fermentação inocularam-se 2 mL do meio contendo o microrganismo estoque em Erlenmeyer contendo 50 mL de meio YPD, que foi incubado em agitador de bancada a temperatura ambiente e 100 rotações por minuto (RPM), por 24 horas, esse é o tempo necessário para que a cultura atinja o fim da fase exponencial ou inicio da fase estacionária (CANGUSSU, 2003). Uma amostra contendo uma unidade de densidade óptica (600 nanômetros) foi utilizada para inocular as culturas subsequentes. Todas as fermentações foram realizadas em modo batelada.

4.4. Preparo das amostras

Após o cultivo, em condições fermentativas, foram centrifugados 30 mL do caldo fermentado a 10.000 g, 4 °C por 20 minutos, com o objetivo de separar as células da solução aquosa.

4.5. Avaliação da composição do meio

O microrganismo foi inoculado, após fermentação (item 4.3), em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de cada meio formulado para a seleção das fontes de carbono e nitrogênio. Para avaliar a composição do meio foram selecionadas

oito fontes de carbono e cinco fontes de nitrogênio no primeiro planejamento experimental, a escolha das fontes foi baseada em trabalhos anteriormente realizados por diversos autores com diferentes microrganismos.

A Tabela 2 apresenta as fontes de carbono que foram utilizadas, sendo estas na concentração de $10,0 \text{ g L}^{-1}$ e as fontes de nitrogênio na concentração de 2 g L^{-1} . No total foram avaliados 13 meios de cultivo, todos com a mesma concentração de sais sendo $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de cloreto de sódio (NaCl), $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), $2,0 \text{ g L}^{-1}$ fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

TABELA 2: Fontes de carbono e nitrogênio dos meios avaliados.

Meios	Fontes de Carbono (10 g L^{-1})	Fonte de Nitrogênio (2 g L^{-1})
1	Acetato de Sódio	
2	Citrato de Sódio	
3	Glicose	
4	Sacarose	Nitrato de Amônio
5	Peptona	
6	Extrato de Levedura	
7	Extrato de Abacaxi	
8	Extrato de Caju	
9		Citrato de Amônio
10		Nitrato de Amônio
11	Sacarose	Sulfato de Amônio
12		Peptona
13		Extrato de Levedura

Todos os meios foram avaliados, em triplicata, pelos seguintes parâmetros: quanto ao crescimento celular avaliou-se densidade óptica e massa seca; para produção de biossurfactante utilizou-se tensão superficial e índice de emulsificação.

4.5.1. Tensão superficial

A tensão superficial foi aferida pelo método do anel de Du Noüy (1925), utilizando tensiômetro modelo K6 (Krüss GmbH, Hamburgo, Alemanha), à temperatura ambiente. A calibração foi realizada conforme as especificações do fabricante descrito no manual do tensiômetro.

O meio contendo biossurfactante foi submetido à análise da tensão superficial e feita comparação dos resultados obtidos com a execução do mesmo teste utilizando álcool etílico. O valor de tensão obtido para cada levedura é multiplicado pela razão entre o valor teórico da tensão do álcool etílico, à 25 °C, e o valor do álcool etílico no momento em que as amostras foram aferidas (THAVASI, et al., 2011). Realizou-se esta etapa, pois as condições ambientais podem interferir nos valores avaliados, sendo necessário então um ajuste dos valores.

4.5.2. Índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi medido utilizando diferentes hidrocarbonetos, os quais foram querosene, óleo diesel e óleo motor, misturados ao biossurfactante, na proporção 1:1 em tubos de ensaio de 5 mL. Estes foram agitados por 2 minutos em vórtex e deixado em repouso por 24 horas. Para o índice de emulsificação utilizou-se óleo diesel, óleo de motor e querosene, que foram adquiridos em posto de abastecimento local.

O cálculo da capacidade de emulsificação do surfactante foi feita de acordo com a Equação (2), que representa a relação entre a altura da camada emulsificada (A_E) dividida pela altura total (A_T) multiplicada por 100 (CAI, et al., 2014).

$$E = \frac{A_E}{A_T} \cdot 100 \quad (2)$$

4.5.3. Produção de biomassa

Foram utilizados dois métodos para determinação da biomassa, sendo eles densidade óptica (DO) e massa seca. Após fermentação os meios foram centrifugados (10.000 g, 20 minutos, a 4°C) para as duas analises.

Para a análise por massa seca, foram centrifugados 30 mL de meio fermentado. O sobrenadante resultante foi utilizado nas avaliações de tensão superficial e índice de emulsificação e o pélete ressuspendido em água destilada é colocado em placas de petri e levado a estufa de 65 °C, por 24 horas. O resultado foi obtido pela diferença entre massa da placa pós-processo de secagem do pélete e massa da placa sem amostra (SARI, et al. 2014).

Na análise por DO, a absorbância foi medida antes da centrifugação e posteriormente foram centrifugados (10.000 g, 20 minutos, a 4°C) 1,5 mL de meio fermentado, feita leitura da absorbância novamente do sobrenadante, a 600 nm em espectrofotômetro. O resultado foi obtido pela diferença entre a absorbância antes da centrifugação e após a centrifugação (SILVEIRA et al., 2009).

4.6. Planejamento fatorial e composto central

O planejamento fatorial foi realizado para avaliar quais as fontes de carbono e nitrogênio e as concentrações destas, mais adequadas para a produção de biossurfactante pela levedura *Cryptococcus victoriae*, por meio da fermentação em meio líquido.

Então, para estudar a influência das variáveis: fontes de carbono e fontes de nitrogênio, na produção de biossurfactante, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^{5-1} (Tabela 3 com fatores e níveis codificados e Tabela 4 com os meios formulados), com quatro repetições no ponto central (PC), utilizando o software STATISTICA®, de acordo com a metodologia de Barros Neto, et al. (2001). Foram utilizadas duas fontes de carbono e duas de nitrogênio, sendo elas, respectivamente, extrato de caju, acetato de sódio, extrato de levedura e citrato de amônio, ainda foi avaliado o pH inicial do meio. Os sais utilizados em cada um dos meios foram os mesmos descritos no item 4.5.

TABELA 3: Fatores e níveis codificados para o planejamento 2^{5-1} .

Níveis/Fatores	-1	0	+1
Extrato de Caju (g L ⁻¹)	5	10	15
Acetato de Sódio (g L ⁻¹)	5	10	15
Extrato de Levedura (g L ⁻¹)	1	3	5
Citrato de Amônio (g L ⁻¹)	1	3	5
pH Inicial	4,00	6,00	8,00

TABELA 4: Meios de cultivo com componentes codificados para planejamento experimental 2^{5-1} .

Meios	Ext. Caju	Acet. Sódio	Ext. Levedura	Citr. Amônio	pH Inicial
1	1	-1	-1	1	1
2 (C)	0	0	0	0	0
3	-1	-1	-1	-1	1
4 (C)	0	0	0	0	0
5	-1	-1	-1	1	-1
6	1	1	1	1	1
7	-1	1	-1	-1	-1
8	-1	-1	1	-1	-1
9	1	-1	1	-1	1
10	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13 (C)	0	0	0	0	0
14	1	-1	-1	-1	-1
15	1	-1	1	1	-1
16	1	1	1	-1	-1
17	-1	1	1	1	-1
18	-1	1	1	-1	1
19	1	1	-1	-1	1
20 (C)	0	0	0	0	0

(C): ponto central

Posteriormente, foi feito o planejamento composto central (Tabela 5 com fatores e níveis codificados e Tabela 6 com os meios formulados), com quatro repetições no ponto central (PC) utilizando o mesmo software. As análises dos meios após a fermentação foram feitas conforme descrito no Item 4.5.

Foram utilizadas uma fonte de carbono e duas de nitrogênio, sendo elas, respectivamente, extrato de caju, extrato de levedura e citrato de amônio. Os sais utilizados em cada um dos meios foram novamente os mesmos descritos no item 4.5. A avaliação desta etapa foi um delineamento composto central (CCD) e utilizamos apenas os valores de tensão superficial como característica de avaliação, sendo avaliados os valores brutos e na diluição com água destilada um para dez (1:10).

TABELA 5. Fatores e níveis utilizados no CCD.

Níveis/Fatores	-1.414	-1	0	+1	+1.414
Extrato de Caju (g L ⁻¹)	10,7580	12,0	15,0	18,0	19,2420
Extrato de Levedura (g L ⁻¹)	3,3032	3,8	5,0	6,2	6,6968
Citrato de Amônio (g L ⁻¹)	3,3032	3,8	5,0	6,2	6,6968

TABELA 6: Meios de cultivo com componentes codificados para CCD.

Meios	Extrato de Caju	Extrato de Levedura	Citrato de Amônio
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9 (C)	0	0	0
10 (C)	0	0	0
11 (C)	0	0	0
12 (C)	0	0	0
13	-1.414	0	0
14	1.414	0	0
15	0	-1.414	0
16	0	1.414	0
17	0	0	-1.414
18	0	0	1.414

(C): ponto central

4.7. Análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo calculada a estimativa do desvio para cada amostra em particular. Foram realizadas análises de variâncias (ANOVA) entre as fontes de carbono e nitrogênio estudados. Os resultados obtidos nos desenhos experimentais foram analisados com o auxílio do software STATISTICA®.

A metodologia de superfície de resposta (RSM) descrita por Box, et al. (1978) foi utilizada no planejamento experimental e otimização, avaliando a tensão superficial, tendo em vista que estes são os desenhos experimentais de primeira-ordem mais populares. A otimização foi realizada utilizando as equações obtidas através da

metodologia superfície de resposta e obtendo-se o ponto ótimo dentro do intervalo estudado, através da biblioteca de algoritmos genéticos (GA) (SCRUCCA, 2013) do software R (R CORE TEAM, 2015), cujo princípio se baseia no uso de algoritmos genéticos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos resíduos agroindustriais

Os teores de açúcares redutores totais dos resíduos de abacaxi e caju foram obtidos a partir da equação representada pela Figura 3. O gráfico apresentou boa linearidade visto que o coeficiente de determinação (R^2) é bem próximo de 1,0, sendo assim temos um bom ajuste de modelo, apresentando um modelo que explica os valores obtidos.

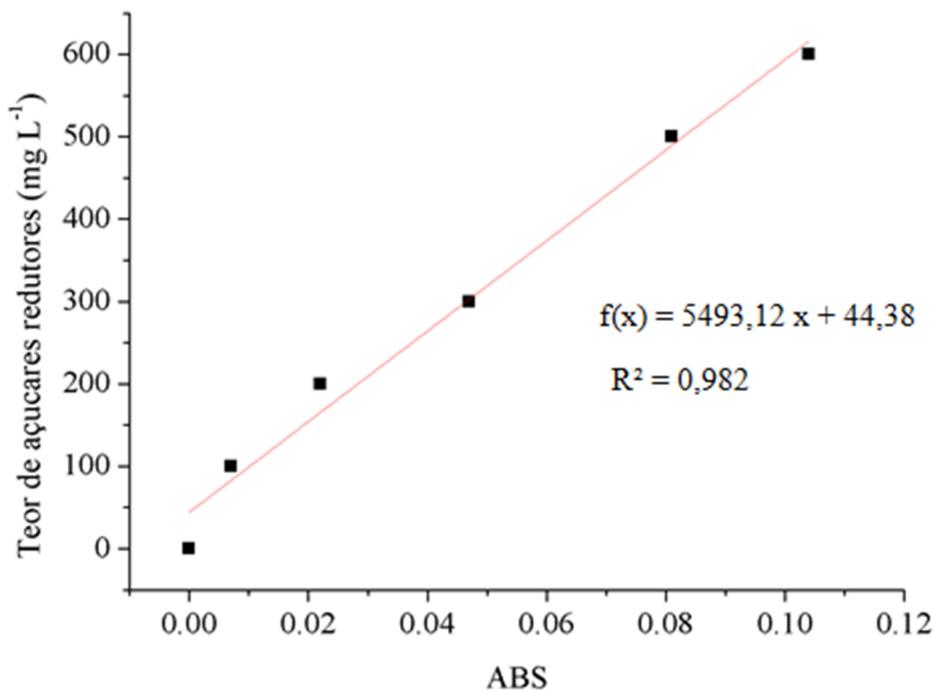


Figura 3: Gráfico do teor de açúcares redutores em relação à absorbância de solução padrão de glicose.

Após avaliar a absorbância (540 nm) nas soluções de caldo de abacaxi e caju, os valores obtidos foram aplicados na equação da Figura 3. As concentrações de açúcares redutores variaram de 18,87 a 75,89 g L⁻¹ (Tabela 7). O maior valor obtido foi para a terceira amostra de caldo de caju. Portanto, podemos afirmar que seria mais vantajoso utilizar do caldo de caju que o caldo de abacaxi, visto que o caju apresenta

aproximadamente quatro vezes mais açúcares redutores que o abacaxi, gastando menos mão de obra com o processamento do material, reduzindo desta forma os custos e ainda disponibilizando maiores teores de açúcares em menores quantidades de extrato.

TABELA 7: Teores de açúcares redutores para as amostras de abacaxi e caju.

Amostras	[Glicose] g L ⁻¹
Abacaxi	18,87
Caju (1)	82,48
Caju (2)	73,36
Caju (3)	75,89

As amostras Caju (1), (2) e (3) foram produzidas no mesmo tempo, porém centrifugadas em quantidades e frascos diferentes.

Os resíduos agroindustriais são potenciais componentes de meio de cultivo, além de substituírem os reagentes sintéticos eles reduzem o custo do meio, visto que são subprodutos rejeitados. Alguns autores obtiveram sucesso no crescimento celular utilizando diferentes resíduos e outros confirmaram a produção de biossurfactante quando introduzido os resíduos agroindustriais.

Rocha e colaboradores (2007) também utilizaram suco de caju em meio de cultivo para produção de biossurfactante. Na caracterização do suco de caju utilizado neste trabalho foi encontrada aproximadamente 55,99 g L⁻¹ de glicose e 47,89 g L⁻¹ de frutose, totalizando 103,88 g L⁻¹ de açúcares redutores. A metodologia utilizada no trabalho foi cromatografia líquida de alta eficiência.

Diferentes resíduos agroindustriais já foram descritos como podendo ser utilizados na produção de biossurfactantes, como resíduos de batata (THOMPSON et al., 2001; NOAH et al., 2005), melaço de cana (CORDEIRO, 2006; AL-BAHRY et al., 2013), soro de queijo (NITSCHKE e PASTORE, 2006) e manipueira (BARROS et al., 2008; COSTA et al., 2009; BEZERRA, 2012), sendo todas estas fontes de carbono de baixo custo.

5.2. Avaliação da composição do meio

5.2.1. Seleção das fontes C e N

Foram encontradas diferenças na densidade óptica (Tabelas 8), massa seca (Tabelas 9), índice de emulsificação (Tabelas 10) e tensão superficial (Tabelas 11), depois de avaliada as análises de variância (ANOVA) desses parâmetros.

TABELA 8: Analise de variância para o parâmetro densidade óptica.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	13	10,473807	0,805677	86,733	0,0000
erro	28	0,260097	0,009289		
Total corrigido	41	10,733905			
CV (%) =	18,29			Ftab = 2,09	
Média geral:	0,5270714				

FV: componentes; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrados médios; Fc: F calculado; Pr: probabilidade de significância; CV: coeficiente de variação; Ftab: F tabelado.

TABELA 9: Analise de variância para o parâmetro massa seca.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	13	0,003703	0,000285	27,457	0,0000
erro	28	0,000290	0,000010		
Total corrigido	41	0,003993			
CV (%) =	22,79			Ftab = 2,09	
Média geral:	0,0141333				

FV: componentes; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrados médios; Fc: F calculado; Pr: probabilidade de significância; CV: coeficiente de variação; Ftab: F tabelado.

TABELA 10: Analise de variância para o parâmetro índice de emulsificação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	13	4175,438095	321,187546	2,992	0,0073
erro	28	3005,833333	107,351190		
Total corrigido	41	7181,271429			
CV (%) =	18,77			Ftab = 2,09	
Média geral:	55,2142857				

FV: componentes; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrados médios; Fc: F calculado; Pr: probabilidade de significância; CV: coeficiente de variação; Ftab: F tabelado.

TABELA 11: Analise de variância para o parâmetro tensão superficial.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	13	1432,276114	110,175086	5,280	0,0001
erro	28	584,294400	20,867657		
Total corrigido	41	2016,570514			
CV (%) =	8,44			Ftab = 2,09	
Média geral:	54,1485714				

FV: componentes; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrados médios; Fc: F calculado; Pr: probabilidade de significância; CV: coeficiente de variação; Ftab: F tabelado.

De acordo com o teste F, foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 5 % de probabilidade, entre os meios formulados, com relação a todos os parâmetros avaliados. Visto que o $F_{calculado} > F_{tabelado}$ para todos os parâmetros estudados, sendo assim pelo menos a média de um dos meios avaliados difere dos demais. Podemos confirmar ainda esta afirmação pelos p-valores que em todos os parâmetros foram menores que 0,05.

A Tabela 12 apresenta as médias obtidas para cada meio de cultivo avaliado e o meio padrão (YPD) composto por glicose, peptona e extrato de levedura.

TABELA 12: Parâmetros avaliados na seleção das fontes C e N.

Fontes C/ Fontes N	Parâmetros Avaliados			
	Densidade Óptica (ABS)	Massa Seca (g)	Tensão Superficial (mN m ⁻¹)	Índice de Emulsificação (%)
1	0,036	0,0049	61,44	58,67
2	0,059	0,0047	62,08	36,00
3	0,134	0,0042	64,00	50,67
4	0,116	0,0093	62,08	50,13
5	0,554	0,0173	53,76	53,40
6	0,774	0,0257	52,48	49,27
7	0,736	0,0317	49,28	47,27
8	0,138	0,0160	50,88	58,93
9	0,251	0,0067	51,84	58,93
10	0,296	0,0086	54,72	56,30
11	0,316	0,0062	47,04	56,53
12	1,040	0,0111	51,84	56,20
13	1,827	0,0199	44,16	56,70
YPD	1,096	0,0312	52,48	84,00

ABS: absorbância a 600 nm; Meios 1 a 13 apresentados na Tabela 2 do item 4.5; YPD: meio padrão composto por glicose, peptona e extrato de levedura.

A escolha das duas fontes de carbono e nitrogênio foi baseada no parâmetro índice de emulsificação, que nos fornece mais claramente a presença de biossurfactante no meio de cultivo. As maiores médias para as fontes de carbono foram obtidas utilizando acetato de sódio e extrato de caju, enquanto as fontes de nitrogênio foram extrato de levedura e citrato de amônio. Os valores de índice de emulsificação obtidos foram 58,67 % para acetato de sódio, 58,93 % para extrato de caju, 58,93 % para citrato de amônio e 56,70 % para extrato de levedura. O fato de as fontes de carbono e nitrogênio escolhidas apresentarem presença de biossurfactante e não apresentarem elevado valor de crescimento celular, baseando-se na densidade óptica e na massa seca, pode ser justificado pela utilização das fontes de carbono e nitrogênio, pela levedura, para a produção de biossurfactante por rota metabólica e não para reprodução e crescimento.

A seleção do extrato de caju como fonte de carbono para a produção de biossurfactante, visto que apresentou bom índice de emulsificação, nos permite afirmar que é possível a reutilização dos resíduos de caju, dando destino adequado a estes compostos. Enquanto o extrato de abacaxi não apresentou destaque nesta pesquisa, no entanto é apresentado como potencial substrato para outros microrganismos em pesquisas com diferentes autores.

Cai, et al. (2014) avaliaram o desempenho de isolados quanto à produção de biossurfactante, caracterizando tensão superficial e índice de emulsificação. Relataram que espécies de *Acinetobacter* e *Rhodococcus* apresentaram camada emulsificada expressiva com n-hexadecano, sendo considerado um bom índice de emulsificação aquele acima de 50%. Chandran e Das (2011), estudando *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida rugosa*, constataram a capacidade de emulsão maior em temperatura ambiente, mesmo exibindo atividades com temperaturas entre 10 e 100 °C. Acima 60% de atividade emulsificante, nessas temperaturas, indica que os biossurfactantes produzidos podem ser favoráveis em ambientes extremos como compartimentos marinhos temperados e sistemas industriais, os quais são utilizados temperaturas extremas.

Thanomsu e colaboradores (2004) utilizaram óleo de soja queimado como fonte de carbono, para produção de um biossurfactante glicolipídico a partir de *Candida ishwadae*. O biotensoativo exibiu alta atividade de emulsificação.

Bednarski, et al. (2004) avaliaram a utilização de rejeitos gordurosos, os *soapstock* (resíduo da fábrica de sabão), como fonte de carbono para a produção de glicolipídeos por leveduras (*C. antarctica* ATCC 20509 e *C. apicola* ATCC 96134). Os autores relataram que a eficiência na síntese de glicolipídeos por leveduras utilizando *soapstock* foi 7,5 a 8,3 vezes melhor que em meio não suplementado com *soapstock*.

Almeida, et al. (2006) empregaram como substrato o resíduo de óleo e a milhocina, e por meio de planejamento fatorial evidenciaram que a milhocina apresenta resultado positivo na produção de biossurfactante, enquanto o resíduo de óleo efeito negativo.

A manipueira, água gerada na prensagem da mandioca, tóxico ao meio ambiente, foi utilizada como fonte de carbono para a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*. Neste trabalho realizou-se um planejamento fatorial completo avaliando estatisticamente os principais efeitos entre as variáveis: concentração de manipueira, de sulfato de amônio e de ureia. Andrade, et al. (2006) concluíram que a redução da tensão

superficial foi significativa em maior concentração de manipueira (10%) e menor concentração dos demais substratos.

O meio de cultivo para produção de biossurfactantes necessita de nitrogênio para o crescimento celular, sendo extremamente importante na síntese de proteínas e enzimas. Diferentes autores descrevem a utilização de compostos nitrogenados na produção de biossurfactantes, como peptona, licor de milho, extrato de levedura, milhocina, ureia, nitrato de sódio, sulfato de amônio, nitrato de amônio, extrato de carne, extrato de malte e farelo de soja (JING et al., 2006; CASAS e GARCIA-OCHOA, 1999; KIM et al., 2006; VANCE-HARROP et al., 2003; SANTANA et al., 2005; MATA-SANDOVAL et al., 2001). A fonte de nitrogênio mais utilizada descrita na literatura é o extrato de levedura, no entanto sua concentração varia de acordo com o microrganismo e o meio de produção.

5.2.2. Planejamento experimental 2^{5-1}

As médias obtidas para a tensão superficial variaram de 49,33 a 62,33 mN m⁻¹ (Tabela 13). A Tabela 14 apresenta a ANOVA dos dados de tensão superficial obtidos neste planejamento experimental, a qual apresenta diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, entre os fatores avaliados no planejamento experimental 2^{5-1} , com relação ao parâmetro avaliado tensão superficial. Como o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, pelo menos um dos fatores difere dos demais.

TABELA 13: Meios de cultivo e tensão superficial avaliada no planejamento experimental 2^{5-1} .

Meios	Tensão Superficial
1	55,00
2 (C)	55,00
3	62,33
4 (C)	54,33
5	56,00
6	49,33
7	58,33
8	54,00

Continuação Tabela 13

9	51,67
10	55,33
11	54,67
12	57,67
13 (C)	56,00
14	57,67
15	53,67
16	53,00
17	54,33
18	55,67
19	57,33
20 (C)	56,67

(C): ponto central

TABELA 14: Analise de variância da tensão superficial no planejamento fatorial 2^{5-1} .

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	19	413,066667	21,740351	8,755	0,0000
erro	40	99,333333	2,483333		
Total corrigido	59	512,400000			
CV (%) =	2,84			Ftab = 1,856	
Média geral:	55,400000				

FV: componentes; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrados médios; Fc: F calculado; Pr: probabilidade de significância; CV: coeficiente de variação; Ftab: F tabelado.

A Figura 4 fornece a analise de Pareto, a qual apresenta os efeitos de cada fator na variável tensão superficial. Neste planejamento foi avaliada apenas a tensão superficial visto que os índices de emulsificação não apresentaram emulsão para nenhum dos meios formulados. Podendo, este fato, ser explicado devido o biossurfactante produzido ter a característica de uma biomolécula de baixo tamanho molecular caracterizado por ser redutor da tensão superficial e apresentar emulsão de baixa atividade segundo Rosenberg e Ron (1999). Ainda, a utilização somente da tensão superficial é um método

válido, uma vez que a redução da tensão superficial e a capacidade de emulsificação não estavam necessariamente correlacionadas (CAI et al., 2014).

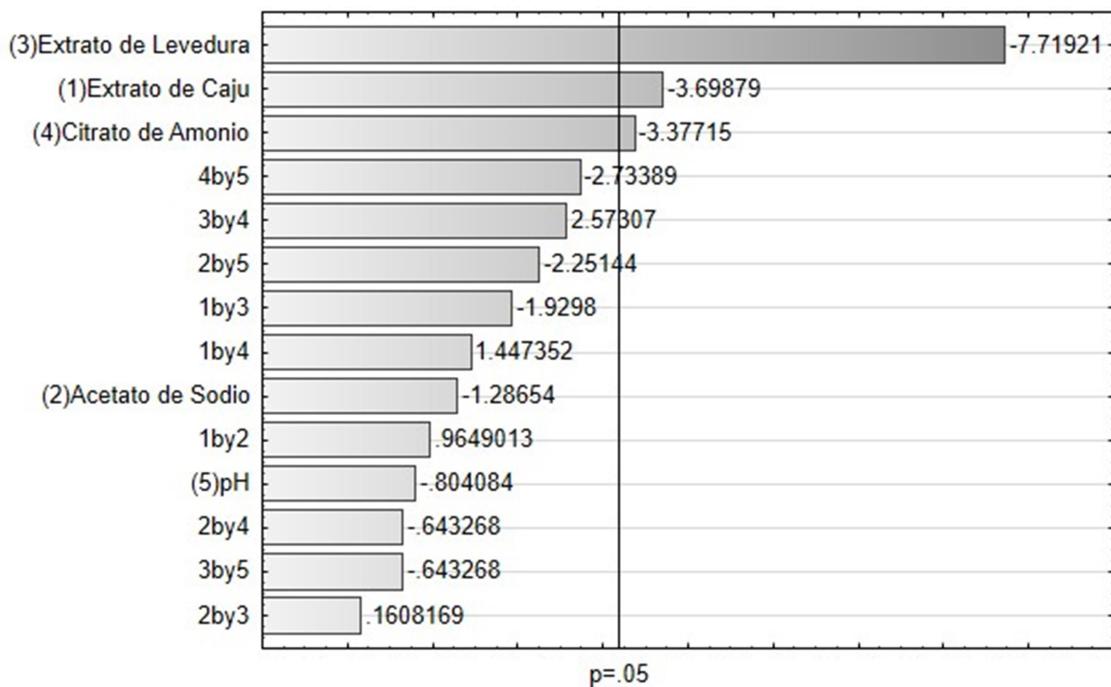


FIGURA 4: Analise de Pareto da tensão superficial no planejamento fatorial 2^{5-1} .

Extrato de Levedura, Extrato de Caju e Citrato de Amônio apresentam efeito positivo na redução da tensão superficial (Figura 4). Apesar do sinal negativo o efeito é positivo, pois são desejáveis os menores valores para a tensão superficial.

Com este resultado utilizou-se extrato de levedura, extrato de caju e citrato de amônio para verificar o ponto máximo da função escalar variando a concentração dos fatores utilizados. Nesta etapa foi avaliada também a tensão superficial, a Tabela 15 apresenta os valores em g L^{-1} dos reagentes e a tensão superficial em mN m^{-1} , os sais e suas respectivas concentrações também foram os mesmos das etapas anteriores.

TABELA 15: Concentrações dos reagentes utilizados na avaliação do ponto máximo da função escalar.

Meios	Extrato de Caju (g L ⁻¹)	Extrato de Levedura (g L ⁻¹)	Citrato de Amônio (g L ⁻¹)	Tensão Superficial
1	10,0	3,0	3,0	44,8
2	11,0	3,4	3,4	43,9
3	12,0	3,8	3,8	42,6
4	13,0	4,2	4,2	42,1
5	16,0	5,4	5,4	40,8
6	18,0	6,2	6,2	40,3
7	19,0	6,6	6,6	40,5

A Figura 5 apresenta a curva com equação obtida, para o extrato de caju, pela técnica de descida mais íngreme (steepest descente). Enquanto a Figura 6 apresenta a curva com equação obtida pela mesma técnica, que a anterior, porém para o extrato de levedura.

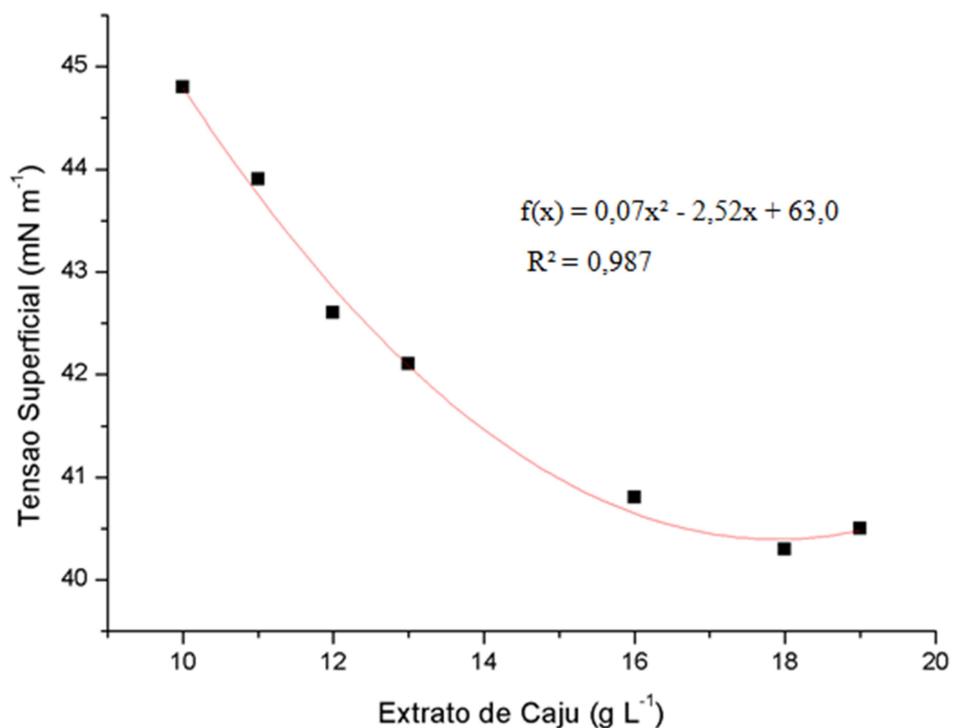


FIGURA 5: Curva obtida pelo método steepest descente para extrato de caju.

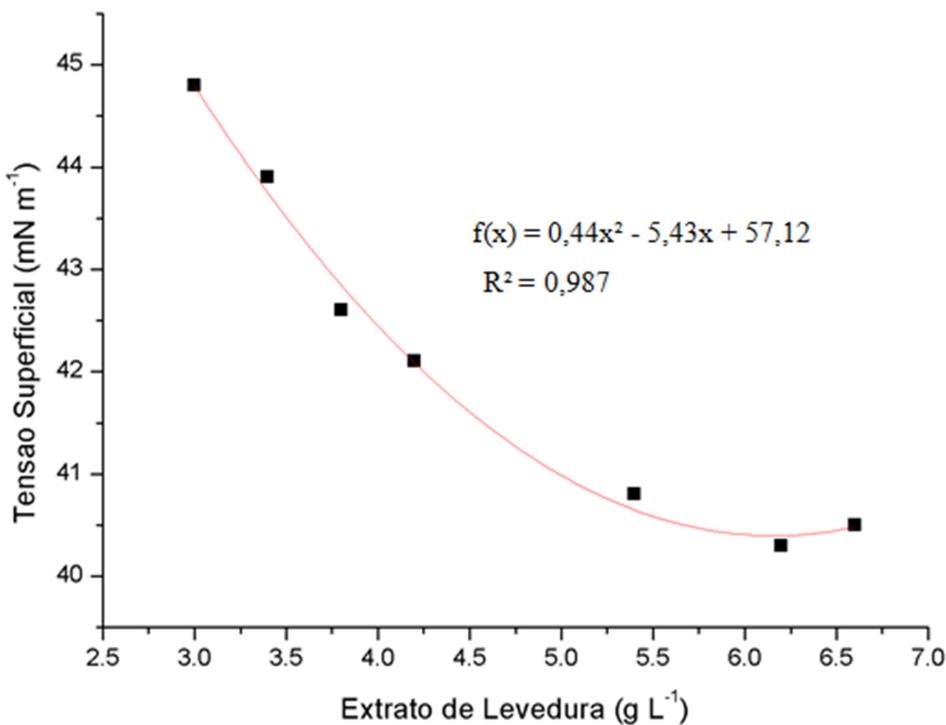


FIGURA 6: Curva obtida pelo método steepest descente para extrato de levedura.

Esta técnica de avaliação, descida mais íngreme, nos fornece pela equação quadrática as maiores concentrações de extrato de caju e extrato de levedura necessárias para obter o menor valor da tensão superficial. Utilizando a equação da Figura (5) temos que a concentração de extrato de caju para atingir a menor tensão superficial é 18,0 g L⁻¹, sendo nesse ponto o valor de tensão igual a 40,32 mN m⁻¹. Na equação da Figura (6) a concentração de extrato de levedura para atingir a menor tensão superficial é 6,17 g L⁻¹, sendo o valor de tensão igual a 40,36 mN m⁻¹.

Os gráficos apresentaram boa linearidade uma vez que o coeficiente de determinação (R^2) é bem próximo de 1,0, desta forma temos um bom ajuste de modelo, apresentando um modelo que explica os valores obtidos. Após a avaliação estatística do gráfico de Pareto do planejamento 2^{5-1} e do ponto máximo da função escalar, foi feito o planejamento composto central (CCD).

5.2.3. Delineamento composto central

Os níveis utilizados nesse planejamento estão apresentados na Tabela 16, os níveis utilizados foram baseados no ponto máximo da função escalar, utilizando o valor de 18 g L⁻¹ de extrato de caju e 6,2 g L⁻¹ de extrato de levedura e citrato de amônio como nível +1. Os valores utilizados nos níveis -1,414 e +1,414 representam a raiz positiva e negativa de dois, eles permitem obter um gráfico estrelado que fornecerá então a superfície de resposta. A Tabela 17 apresenta os níveis de cada meio formulado e os parâmetros avaliados nessa ultima fase, em mN m⁻¹, que foram tensão superficial sem diluição e com diluição 1:10.

TABELA 16. Fatores e níveis utilizados no CCD.

Níveis/Fatores	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Extrato de Caju (g L ⁻¹)	10,7580	12,0	15,0	18,0	19,2420
Extrato de Levedura (g L ⁻¹)	3,3032	3,8	5,0	6,2	6,6968
Citrato de Amônio (g L ⁻¹)	3,3032	3,8	5,0	6,2	6,6968

TABELA 17: Meios de cultivo com componentes codificados e tensão superficial do CCD.

Meios	Extrato de Caju	Extrato de Levedura	Citrato de Amônio	Tensão Superficial	Tensão Superficial 1:10
1	-1	-1	-1	51,1	60,9
2	1	-1	-1	52,9	58,7
3	-1	1	-1	52,4	58,7
4	1	1	-1	55,1	59,1
5	-1	-1	1	51,5	59,1
6	1	-1	1	47,5	63,6
7	-1	1	1	44,8	63,2
8	1	1	1	41,7	63,6
9 (C)	0	0	0	42,1	63,3

Continuação Tabela 17

10 (C)	0	0	0	40,3	64,5
11 (C)	0	0	0	41,5	64,2
12 (C)	0	0	0	40,6	63,9
13	-1.414	0	0	45,7	63,2
14	1.414	0	0	50,6	60,5
15	0	-1.414	0	52,0	62,7
16	0	1.414	0	44,8	62,3
17	0	0	-1.414	42,6	62,3
18	0	0	1.414	40,3	62,7

(C): ponto central

As Tabelas 18 e 19 representam, respectivamente as ANOVAs dos parâmetros tensão superficial sem diluição e tensão superficial na diluição de 1:10. A avaliação das ANOVAs nos permite inferir que existe diferença significativa, ao nível de 5 % de probabilidade, entre os fatores avaliados no planejamento composto central, com relação ao parâmetro avaliado tensão superficial e tensão superficial 1:10. Como o $F_{calculado} > F_{tabelado}$, pelo menos um dos fatores difere dos demais para ambos os parâmetros.

TABELA 18: Analise de variância da tensão superficial sem diluição no planejamento composto central.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	17	1658,870370	97,580610	34,328	0,0000
erro	36	102,333333	2,842593		
Total corrigido	53	1761,203704			
CV (%) =	3,25			Ftab = 1,93	
Média geral:	51,9259259				

FV: componentes; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrados médios; Fc: F calculado; Pr: probabilidade de significância; CV: coeficiente de variação; Ftab: F tabelado.

TABELA 19: Analise de variância da tensão superficial 1:10 no planejamento composto central.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	17	253,703704	14,923747	4,899	0,0000
erro	36	109,666667	3,046296		
Total corrigido	53	363,370370			
CV (%) =	2,52			Ftab = 1,93	
Média geral:	69,2407407				

FV: componentes; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrados médios; Fc: F calculado; Pr: probabilidade de significância; CV: coeficiente de variação; Ftab: F tabelado.

Depois de feita a fermentação e avaliação da tensão superficial as médias obtidas, apresentadas na Tabela 17, foram submetidas à avaliação dos efeitos de cada um dos fatores por Pareto apresentados nas Figuras 7 e 8.

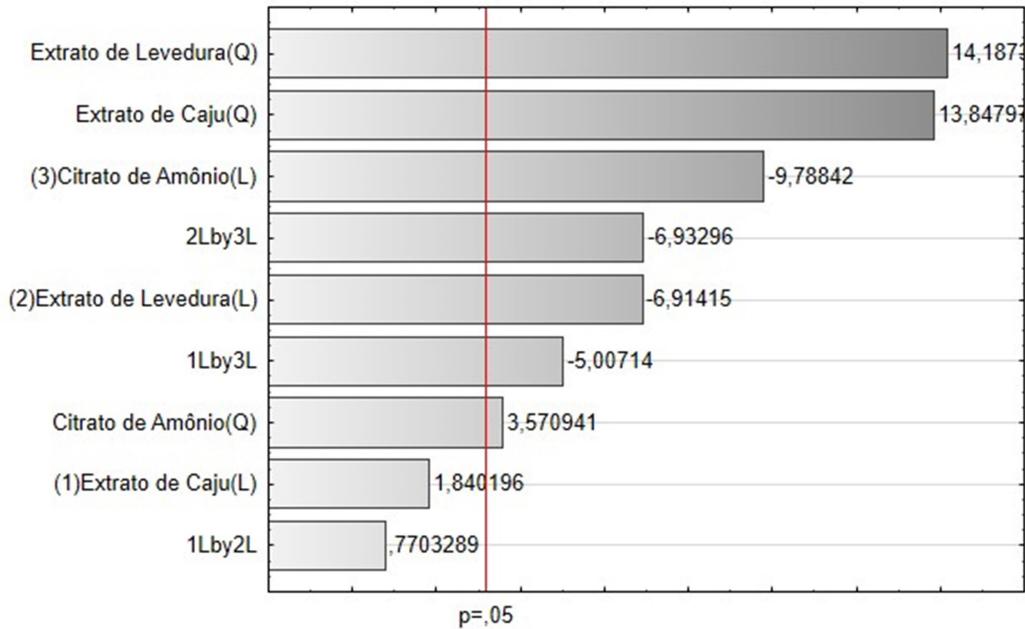


FIGURA 7: Analise de Pareto do planejamento composto central para tensão superficial sem diluição.

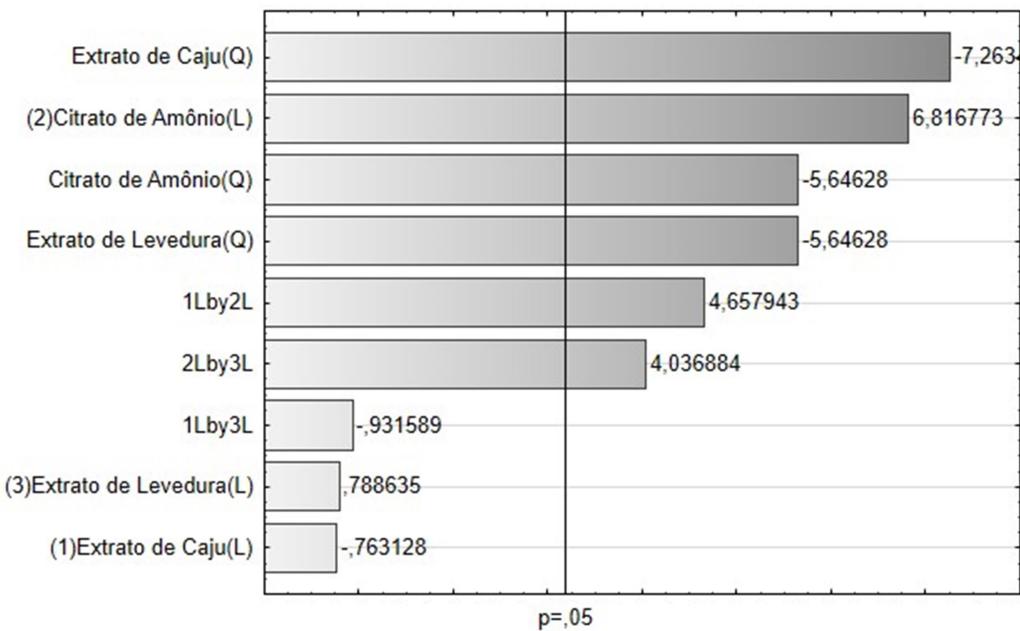


FIGURA 8: Analise de Pareto do planejamento composto central para tensão superficial na diluição 1:10.

A avaliação do modelo forneceu os gráficos de superfície de resposta para tensão superficial sem diluição apresentados nas Figuras 9 a 11, enquanto os gráficos para tensão superficial com diluição de 1:10 representados nas Figuras 12 a 14.

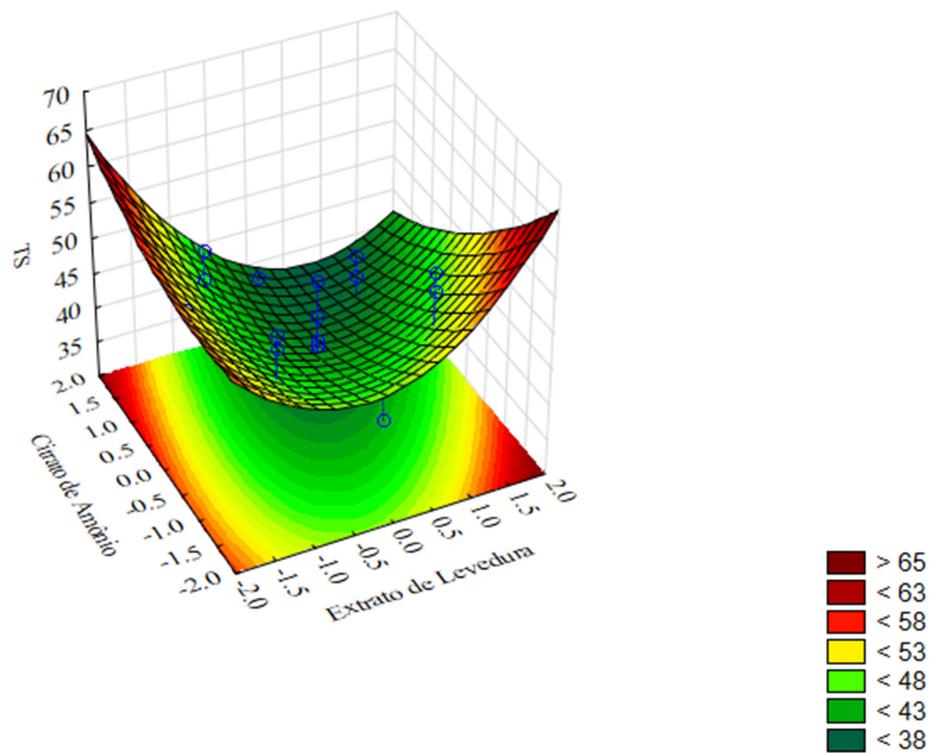


FIGURA 9: Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial sem diluição Extrato de levedura x Citrato de amônio.

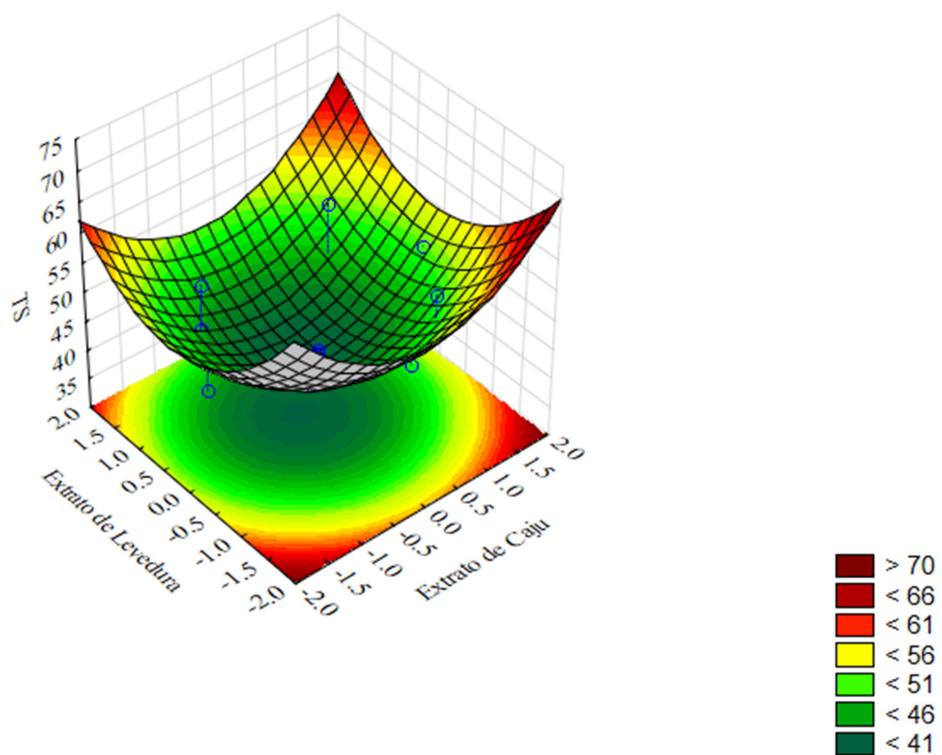


FIGURA 10: Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial sem diluição Extrato de levedura x Extrato de caju.

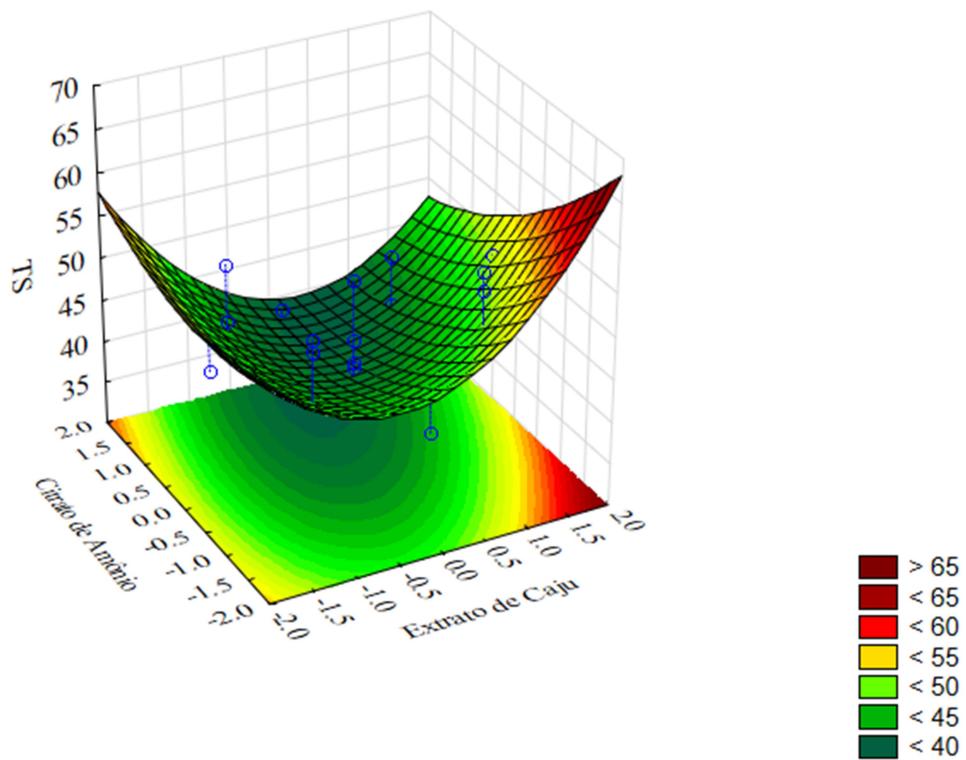


FIGURA 11: Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial sem diluição Extrato de caju x Citrato de amônio.

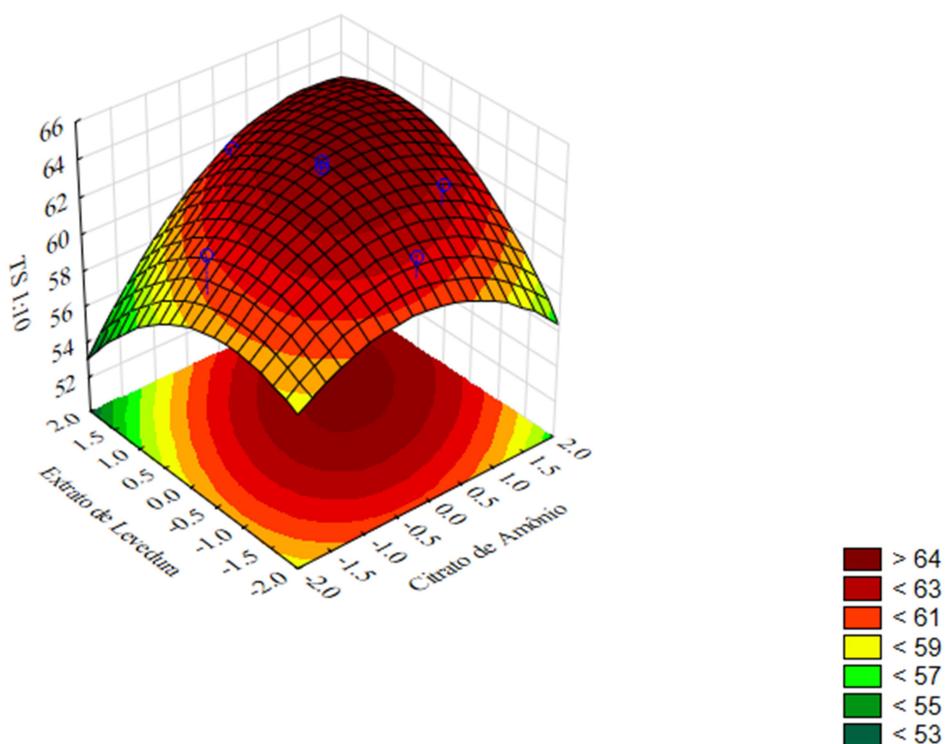
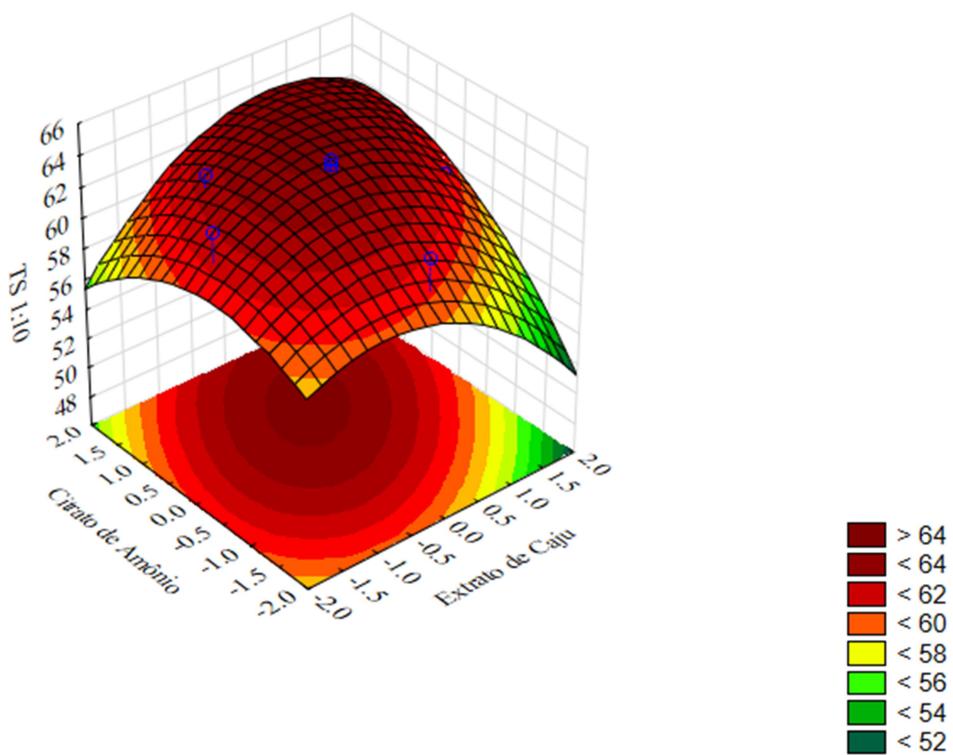
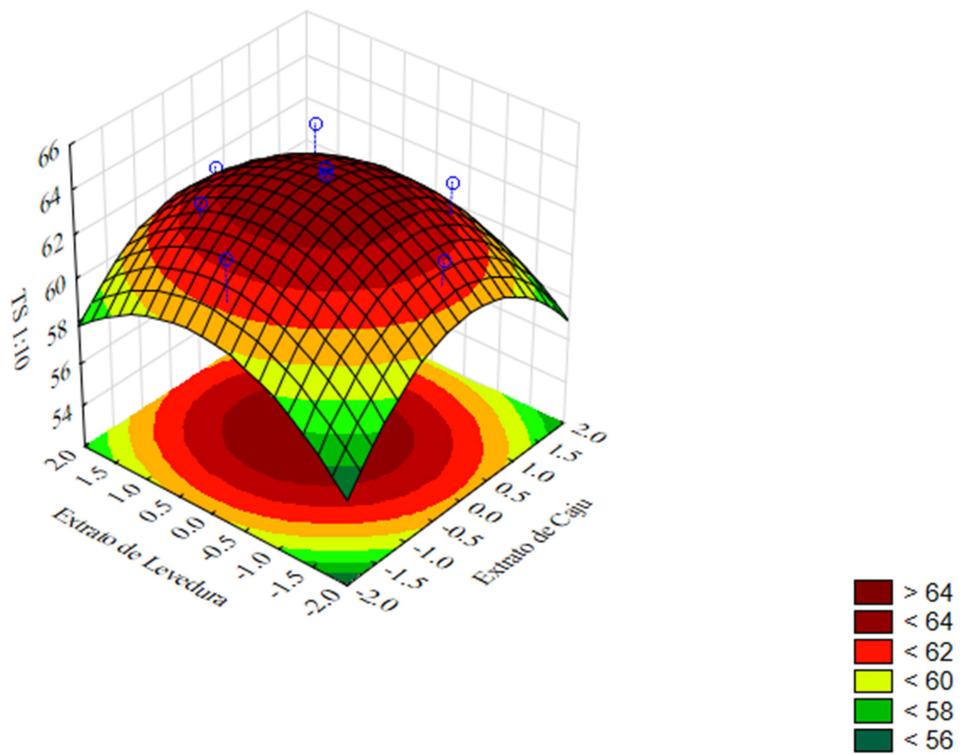


FIGURA 12: Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 Extrato de levedura x Citrato de amônio.



Com esses resultados utilizamos as médias obtidas para a tensão superficial diluída 1:10, visto que a tensão superficial sem diluir apresenta valores bem próximos da concentração micelar crítica não sendo possível reduzir mais estes valores. Seguindo então com o Pareto da tensão superficial 1:10 foi possível fazer o backward elimination e encontrar as equações que melhor se ajustam ao modelo. Este método permite, a partir dos efeitos significativos e não significativos obtidos pela análise de Pareto, eliminar os fatores não significativos para encontrar um modelo ajustado que apresente o maior valor para R_{adj} .

Desta forma o modelo completo, com todos os fatores, apresentou R^2 equivalente a 0,65281 e R_{adj} igual a 0,26221. Quando retirado o efeito não significativo do extrato de caju linear obtivemos R^2 equivalente a 0,65057 e R_{adj} igual a 0,33996, o que apresenta uma melhora do R_{adj} . Continuando a eliminação dos parâmetros não significativos e eliminando o extrato de caju linear e extrato de levedura linear obtivemos R^2 equivalente a 0,64817 e R_{adj} igual a 0,40189. Para o próximo modelo sem extrato de caju linear, extrato de levedura linear e a combinação entre eles linear os valores obtidos foram R^2 equivalente a 0,64483 e R_{adj} igual a 0,4511, apresentando aumento do R_{adj} . O modelo sem extrato de caju linear, extrato de levedura linear, a combinação entre eles linear e a combinação entre citrato de amônio e extrato de levedura linear apresentou R^2 de 0,58212 e R_{adj} igual a 0,408, apresentando uma redução significativa do R^2 e também do R_{adj} o que nos permite escolher o modelo anterior para as avaliações seguintes.

Após estas análises foram feitas as superfícies de resposta para os fatores avaliados, eliminando os efeitos extrato de caju linear, extrato de levedura linear e a combinação entre eles linear. As Figuras 15 a 17 apresentam as superfícies de respostas após eliminar os efeitos citados anteriormente.

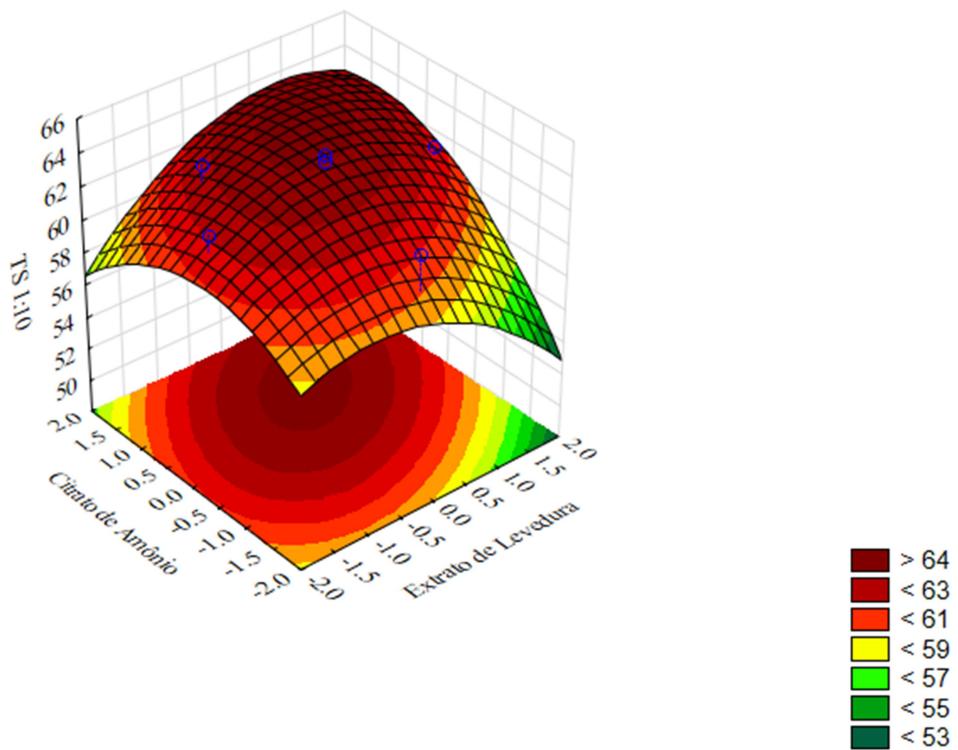


FIGURA 15: Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 após ajuste Extrato de levedura x Citrato de amônio.

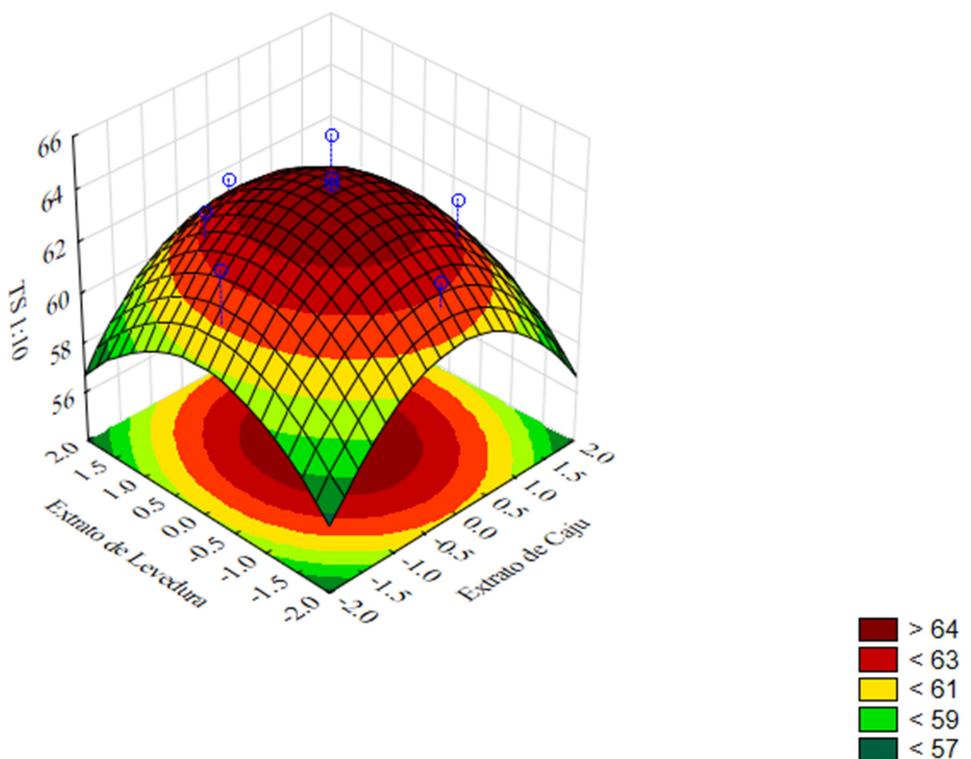


FIGURA 16: Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 após ajuste Extrato de levedura x Extrato de caju.

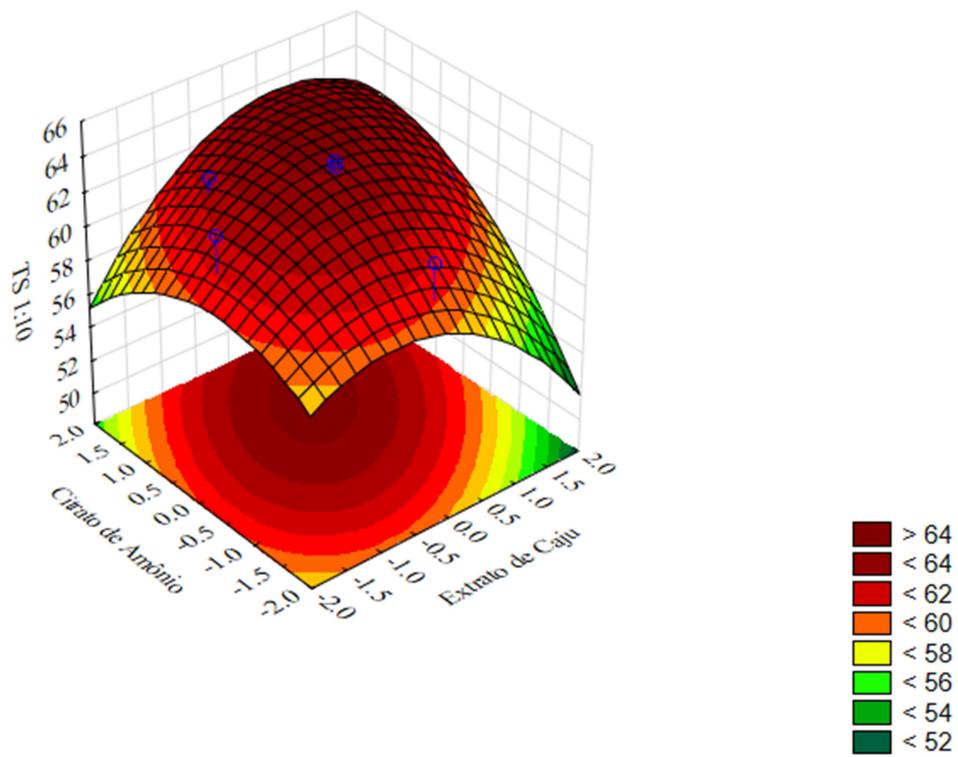


FIGURA 17: Gráficos de superfície resposta do CCD para tensão superficial 1:10 após ajuste Extrato de caju x Citrato de amônio.

Feitas as superfícies de respostas após o ajuste foram obtidas as equações empíricas apresentadas pelas cinco equações abaixo. Elas foram geradas fixando o extrato de caju como variável “x” e extrato de levedura variável “y” e variando os níveis do citrato de amônio ao longo do planejamento (-1,414; -1; 0; 1; 1,414).

$$\begin{aligned}
 Z_{(-1,414)} = & 64.111271798669 - .059179290715267 * x - 1.2578806382478 * x^2 + \\
 & .13389081167504 * y - .92978155232387 * y^2 - .168 * x * y + .84 * (-1.414) * x + .728 \\
 & * (-1.414) * y - 3.3591086 \quad (3)
 \end{aligned}$$

Em que:

$Z_{(-1,414)}$: tensão superficial para citrato de amônio no ponto -1,414.

x: concentração de extrato de caju.

y: concentração de extrato de levedura.

$$Z_{(-1)} = 64.111271798669 - .059179290715267 * x - 1.2578806382478 * x^2 + .13389081167504 * y - .92978155232387 * y^2 - .168 * x * y + .84 * (-1.) * x + .728 * (-1.) * y - 1.9906777 \quad (4)$$

Em que:

$Z_{(-1)}$: tensão superficial para citrato de amônio no ponto -1.

x: concentração de extrato de caju.

y: concentração de extrato de levedura.

$$Z_{(0)} = 64.111271798669 - .059179290715267 * x - 1.2578806382478 * x^2 + .13389081167504 * y - .92978155232387 * y^2 - .168 * x * y + .84 * (0.) * x + .728 * (0.) * y + 0 \quad (5)$$

Em que:

$Z_{(0)}$: tensão superficial para citrato de amônio no ponto 0.

x: concentração de extrato de caju.

y: concentração de extrato de levedura.

$$Z_{(1)} = 64.111271798669 - .059179290715267 * x - 1.2578806382478 * x^2 + .13389081167504 * y - .92978155232387 * y^2 - .168 * x * y + .84 * (1.) * x + .728 * (1.) * y + .131114578 \quad (6)$$

Em que:

$Z_{(1)}$: tensão superficial para citrato de amônio no ponto 1.

x: concentração de extrato de caju.

y: concentração de extrato de levedura.

$$Z_{(1,414)} = 64.111271798669 - .059179290715267 * x - 1.2578806382478 * x^2 + .13389081167504 * y - .92978155232387 * y^2 - .168 * x * y + .84 * (1.414) * x + .728 * (1.414) * y - .35889439 \quad (7)$$

Em que:

$Z_{(1,414)}$: tensão superficial para citrato de amônio no ponto 1,414.

x: concentração de extrato de caju.

y: concentração de extrato de levedura.

Observamos que todas as equações são relativamente iguais, salve a constante no fim de cada equação que diferencia para cada uma delas. Desta forma substituindo os valores por variáveis obtemos a Equação 8, que representa uma equação genérica. Posteriormente, fez-se o ajuste dos dados, de modo a obter o valor dos parâmetros para representar a equação polinomial, o resultado está representado pela Equação 9.

$$Z = a - b * x - c * x^2 + d * y - e * y^2 - f * x * y + g * w * x + h * w * y - i \quad (8)$$

$$TS = 64,5 - 0,27925x - 0,70937x^2 + 0,27925y - 0,66098y^2 - 0,66794xy + 1,09325w x + 1,10201w y - 1,16644 \quad (9)$$

Em que:

TS: valor da tensão superficial em miliNewton por metro.

x: valores codificados de extrato de caju.

y: valores codificados de extrato de levedura.

w: valores codificados de citrato de amônio.

Sendo assim, a análise das superfícies de resposta apresentadas anteriormente permitiu obter uma equação polinomial empírica relacionando todas as variáveis de estudo à variável de resposta. Este estudo é interessante, visto que permite que encontremos um ponto ótimo dentro do intervalo de estudo. Deste modo, o ponto ótimo dentro do intervalo estudado pode ser calculado utilizando a biblioteca de algoritmos genéticos (GA) (SCRUCCA, 2013) do software R (R CORE TEAM, 2015), cujo princípio se baseia no uso de algoritmos genéticos.

O ponto ótimo para um menor valor da tensão superficial é com os valores codificados em 1,414 extrato de caju, 1,414 extrato de levedura, -1,414 citrato de amônio. Ou em valores reais 19,24 g L⁻¹ de extrato de caju, 6,70 g L⁻¹ de extrato de levedura e 3,30 g L⁻¹ de citrato de amônio. Nessas concentrações é obtido um valor de tensão superficial teórico equivalente a 54,87 mN m⁻¹. Podemos ainda observar um ponto ótimo alternativo que seria 10,76 g L⁻¹ de extrato de caju (-1.414), 6,70 g L⁻¹ de extrato de levedura (1,414) e 3,30 g L⁻¹ de citrato de amônio (-1,414), apresentando uma tensão superficial equivalente a 55,80 mN m⁻¹.

Confirmando a produção de biossurfactante utilizando diferentes substratos e resíduos, além dos autores já citados, temos a produção de bioemulsificante por *Y. lipolytica* avaliada frente a diferentes fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio, ureia e nitrato de sódio. Os resultados mostraram que sulfato de amônio e cloreto de amônio foram as fontes de nitrogênio que propiciaram maior atividade de emulsificação, enquanto que esta atividade foi reduzida à metade quando se utilizou nitrato de amônio e ureia. Não foi detectada atividade de emulsificação quando o nitrato de sódio foi utilizado (ZINJARDE, 2002).

O resíduo da refinaria de óleo vegetal de soja e a milhocina (resíduo industrial do processamento de milho) foram utilizados como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Os resultados obtidos demonstraram que o melhor rendimento em biossurfactante foi obtido em meio de cultivo contendo 5% de resíduo de óleo vegetal e 2,5% de milhocina (SOUZA SOBRINHO et al., 2006).

No estudo de Cooper e Paddock (1984), foi mencionado nitrato de sódio e de amônio como não sendo fontes ideais de nitrogênio, para fermentação utilizando *Torulopsis bombicola*. Em contra posição o extrato de levedura, na concentração de 5 g L⁻¹, melhorou a produção de biossurfactante, se substituído o extrato de levedura por peptona, a concentração de biossurfactante foi reduzida à metade. Sendo então, uma concentração bem próxima da encontrada no ponto ótimo pela Equação 9.

6. CONCLUSÕES

A levedura *Cryptococcus victoriae* é capaz de produzir biossurfactante, reduzindo a tensão superficial significativamente, sendo utilizado como resíduo agroindustrial apenas o extrato de caju. Este resíduo apresenta teores de açúcares redutores aproximadamente quatro vezes superiores ao extrato de abacaxi, com valores médios iguais a $77,24 \text{ g L}^{-1}$ e $18,87 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

Dentre as fontes de carbono e nitrogênio avaliadas neste trabalho as que se destacam, após avaliação de todos os planejamentos, são extrato de caju, extrato de levedura e citrato de amônio, uma vez que meios formulados com esses substratos permitem a produção de biossurfactante pela levedura, consequentemente, apresentam menores valores de tensão superficial do meio. No entanto, o extrato de abacaxi se mostrou inviável para produção de biossurfactantes.

A análise das equações obtidas nos fornece a equação geral capaz de determinar o ponto ótimo, com redução da tensão superficial com valor teórico de $54,87 \text{ mN m}^{-1}$, sendo o meio composto por $19,24 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de caju, $6,70 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura e $3,30 \text{ g L}^{-1}$ de citrato de amônio. A equação é determinada baseando-se nos valores de tensão superficial diluída 1:10, visto que a tensão superficial sem diluir apresenta valores bem próximos da concentração micelar critica não sendo possível reduzir mais estes valores.

Dessa forma, confirma-se a potencialidade do extrato de caju e os substratos, extrato de levedura e citrato de amônio, na produção de biossurfactante podendo ser de grande interesse industrial e ambiental.

7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se a validação do meio proposto para comprovação do modelo matemático. Purificação do biossurfactante e caracterização por técnicas fisico-químicas, bem como a produção em larga escala. Além de estudos que envolvam o uso do biossurfactante para determinar sua aplicabilidade, como remoção de metais pesados do solo; remoção de hidrocarbonetos do solo; avaliação da fitotoxicidade e ecotoxicidade do biossurfactante; entre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces**. Wiley-Interscience, p. 808, 1997.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHABI, Y. M.; ELSHAFIE, A. S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHARI, H. S.; AL-SULAIMANI, H. S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141-146, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.006>

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2 ed. New York: Academic, p. 453, 1999.

ALMEIDA, R. G.; GUSMAO, C. A. B.; RUFINO, R. D.; FARIA, C. B. B.; SARUBBO, L. A. Planejamento Fatorial como Ferramenta Estatística Aplicada à Produção de Biosurfactantes por *Candida Tropicalis*.. In: X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006, Goiânia. Anais do X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006.

AMARAL, P. F. F.; DA SILVA, J. M.; LEHOCKY, B. M., BARROS-TIMMONS A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1894-1898, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.029>

AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 236-49, 2010. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_18

AMATO, P.; HENNEBELLE, R.; MAGAND, O.; SANCELME M.; DELORT, A.; BARBANTE, C.; BOUTRON, C.; FERRARI, C. Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 2, p. 255–264, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00198.x>

ANDRADE, R. F. S.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; TAKAKI, G. M. C. Produção de biosurfactantes por *Candida lipolytica* utilizando manjericão como substrato.. In: In: 1 Workshop Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia - De mãos dadas para o futuro, 2006, Recife. In: 1 Workshop Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia - De mãos dadas para o futuro, 2006.

ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactants: anticorrosive, antibiofilm and antimicrobial properties. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600019>

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, p. 488-494, 1968. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90503-2)

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00101-6](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00101-6)

BANAT, I. M.; MAKKAR R. S.; CAMEOTRA S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>

BARBIERI, E.; SCHIAVANO, G. F.; SANTI, M.; VALLORANI, L.; CASADEI, L.; GUESCINI, M.; GIOACCHINI, A. M.; RINALDI, L.; STOCCHI, V.; BRANDI, G. Bacterial diversity of traditional Fossa (pit) cheese and its ripening environment. **International Dairy Journal**, v. 23, p. 62-67, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.009>

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, p. 409, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200031>

BARROS, F. F. C.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 1071-1078, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0385-y>

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 1 ed. Campinas - SP: Editora da Unicamp, 411p, 2001.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS microbiology reviews**, v. 19, p. 219-237, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>

BEDNARSKI, W.; ADAMCZK, M.; TOMASIK, J.; PLSZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, n. 95, p. 15-18, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.01.009>

BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492-495, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300021>

BENHAM, R. W. The genus *Cryptococcus*. **Bacteriological Reviews**. v. 20, p. 189-199, 1956.

BEZERRA, M. S. Estudo da produção de biosurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando maniqueira como fonte de carbono. 2012. 123f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

BIDLE, K. D., LEE, S., MARCHANT, D. R., FALKOWSKI, P. G. *Fossil genes and microbes in the oldest ice on Earth*: Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 104, p. 13455–13460, 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702196104>

BODOUR, A. A., MAIER, R. M. Biosurfactants: types, screening methods and application. **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. v. 2, p. 750-769, 2002.

BOGNOLI G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00684-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00684-0)

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, data Analysis and Model Building. **John Wiley & Sons**, Inc. 1978.

BUENO, S. M. **Bactérias Produtoras de Biosurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema Modelo**. Tese (Doutorado) UNESP, 2008.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 229-234, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.043>

BUTINAR, L.; SPENCER-MARTINS, I.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 91, n. 3, p. 277-289, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9117-3>

CAI, Q.; ZHANG, B.; CHEN, B.; ZHU, Z.; LIN, W.; CAO, T. Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. **Marine pollution bulletin**, v. 86, n. 1, p. 402-410, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.039>

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998. <https://doi.org/10.1007/s002530051329>

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006>

CANDIOTI, L. V.; ZAN, M. M. de; CÁMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>

CANGUSSU, A. S. R. **Cinética de crescimento e metabolismo de levedura potencialmente probiótica**. Tese (Doutorado). 2003. Universidade Federal de Viçosa, 2003.

CASAS, J.; GARCIA-OCHOA, F. G. Sophorolipid Production by *Candida bombicola*: Medium Composition and Culture Methods. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 488-494, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87664-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87664-1)

CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **International Journal of Science and Nature**, v. 2, p. 63-71, 2011.

CHRISTNER, B. C., MOSLEY-THOMPSON, E., THOMPSON, L. G., ZAGORODNOV, V. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice: *Icarus*, v. 144, p. 479-485, 2000. <https://doi.org/10.1006/icar.1999.6288>

CHRISTOFI, N; IVSHNA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01774.x>

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 173-176, 1984.

CORDEIRO, G. Q. Tratamento de maniqueira em reator anaeróbio compartimentado produção de biossurfactante utilizando melaço como substrato. 2006. 91f. Dissertação. Universidade Estadual de São Paulo, Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos, São José do Rio Preto/SP, 2006.

CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. Caracterização Química de Glucanas Fúngicas e suas Aplicações Biotecnológicas. **Química Nova**, v.29, n.1, p.85-92, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100017>

COSTA, S. G. V. A. O.; MILOT, F. L. S.; DEZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1063-1072, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0590-3>

COSTA, N. R.; LOURENÇO, J.; PEREIRA, Z. L. Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 107, n. 2, p. 234–244, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.04.004>

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIQUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2000.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimisation of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>

DESAI, J. D. BANAT, I. N. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DU NOÜY, P. L. An Interfacial Tensiometer for Universal Use. **The Journal of General Physiology**, p. 625-633, 1925. <https://doi.org/10.1085/jgp.7.5.625>

DUARTE, A. W. F.; DAYO-OWOYEMI, I.; NOBRE, F. S.; PAGNOCCA, F. C.; CHAUD, L. C. S.; PESSOA, A.; FELIPE, M. G. A.; SETTE, L. D. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 1023-1035, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0584-y>

ECUADOR. Biodiversidad Microbiológica y Aplicaciones Biotecnológicas. In: Antarctic treaty consultative meeting. *Information Paper 117*. Punta del Este: **ATCM**. p. 01-06, 2010.

FARIAS, C. B. B.; SARUBBO, L. A. Otimização das Condições de Produção de Biosurfactantes por *Candida lipolytica* Utilizando Óleo de Canola e Glicose como Substratos. In: *3ª Semana de Integração Universidade Sociedade – 3º SIUS e 7ª Jornada de Iniciação Científica*, UNICAP, p. 21-26, 2006.

FELL, J.W., BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SCORZETTI, G. & STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1351–1371, 2000. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1351>

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, p. 181-185, 1998.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biosurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800033>

FRANCY, D. S.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H.; J. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 237-245, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF01576061>

GADHE, A.; SONAWANE, S. S.; VARMA, M. N. Optimization of conditions for hydrogen production from complex dairy wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 16, p. 6607-6617, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.078>

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 11, p. 483-496, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0372-5>

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. de L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 36-43, 2005.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. Surface active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992. <https://doi.org/10.1038/nbt0192-60>

GESHEVA, V.; STACKEBRANDT, E.; VASILEVA-TONKOVA, E. Biosurfactant production by halotolerant *Rhodococcus* fascians from Casey station, Wilkes land, Antarctica. **Current microbiology**, v. 61, p. 112-117, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9584-7>

GHOJAVAND H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEIB, E.; SHAHRAKI, A. K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, p. 172-176, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.05.001>

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. Bactérias produtoras de biosurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 39-45, 2003.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029>

HINZE, W. L.; PRAMAULO, E. . A critical review of surfactant-mediated phase separations (cloudpoint extractions): theory and applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 133-177, 1993. <https://doi.org/10.1080/10408349308048821>

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. 15, p. 147-155, 1994. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90107-4](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)90107-4)

HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; GRIFFIN, W. Michael. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of industrial microbiology**, v. 6, p. 243-248, 1990. <https://doi.org/10.1007/BF01575868>

IOSTI, C. A. R.; RAETANO, C. G. Tensão superficial dinâmica e ângulo de contato de soluções aquosas com surfactantes em superfícies artificiais e naturais. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 4, p. 670-680, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-69162010000400011>

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 4124-4126, 1949. <https://doi.org/10.1021/ja01180a073>

JING, C. XIN, S. HUI AND, Z. YINBO. Q. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. **Enzyme**

Microbiology Technology, v. 39, p. 501-506, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.022>

JOHNSEN, A. R., WICK, L. Y., HARMS. H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 71-84, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>

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 Microbiol Biotechnology**, v. 70, p. 391-396, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0092-9>

KIMURA, A.; MORITA, M. Fermentative Formation of CDP-Choline by Intact Cells of a Yeast, *Saccharomyces carlsbergensis* (IFO 0641) Treated with a Detergent, Triton X-100. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, p. 1469-1474, 1975.
<https://doi.org/10.1080/00021369.1975.10861801>

KITAMOTO, D.; FUZISHIRO, T.; YANAGISHITA, H.; NAKANE, T.; NAKAHARA, T. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida Antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 4, p. 305-310, 1992.
<https://doi.org/10.1007/BF01022329>

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.
<https://doi.org/10.1023/A:1012464717259>

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. The genus *Cryptococcus*. **Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale**. v. 44, p. 601-610, 1964.

LI, J.; MA, C.; MA, Y.; LI, Y.; ZHOU, W.; XU, P. Medium optimization by combination of response surface methodology and desirability function: An application in glutamine production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 563-571, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0699-5>

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Tecnologia das fermentações*. São Paulo: Edgard Blücher, 1975.

LIU, J.; ZOU, A.; MU, B. Surfactin effect on the physicochemical property of PC liposome. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 361, p. 90-95. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.03.021>

LOTFABAD, T. B.; SHOURIAN, M.; ROOSTAAZAD, R.; NAJAFABADI, A. R.; ADELZADEH, M. R.; NOGHABI, K. A. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, n. 2, p. 183-193, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.11.018>

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J. ROGERS, P. L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 715-720, 2003. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0105-6>

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, n. 4, p. 428-434, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0924-1>

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

MATA-SANDOVAL JC, KARNS J, TORRENT A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. **Microbiological Research**. v. 155, p. 249-256, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(01\)80001-X](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(01)80001-X)

MERCADÉ, M. E.; MANRESA, M. A.; ROBERT, M.; ESPUNY, M. J.; ANDRÉS, C.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 43, p. 1-6, 1993. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(93\)90074-L](https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90074-L)

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 2004. 108f. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MEYER, D. D.; BEKER, S. A.; BUCKER, F. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.026>

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MONTES, M. J., BELLOCH, C., GALIANA, M., GARCIA, M. D., ANDRE! S, C., FERRER, S., TORRES-RODRIGUEZ, J. M. & GUINEA, J. Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from Antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 22, p.97-105, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80032-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80032-0)

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Revista Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 106, p. 295-301, 2003. <https://doi.org/10.1385/ABAB:106:1-3:295>

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L.A.G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005. <https://doi.org/10.1021/bp050198x>

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.044>

NITSCHKE M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>

NOAH, K. S.; BRUHN, D. F.; BALA, G. A. Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 465-473, 2005. <https://doi.org/10.1385/ABAB:122:1-3:0465>

OBEROI, H. S.; RAWAT, R.; CHADHA, B. S. Response surface optimization for enhanced production of cellulases with improved functional characteristics by newly isolated *Aspergillus niger* HN-2. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 119–134, 2014.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M.. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 47, p. 209- 214, 1995. <https://doi.org/10.1002/bit.260470212>

OLIVEIRA, D. Produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado. Dissertação (Dissertação em engenharia química) – UFC. Ceará. p. 103. 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)

PATEL, M. N; GOPINATHAN, K. P. Lysozyme sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 1224-1226, 1986.

PIRÓLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos.** Tese (Mestrado em Ciências Biológicas), 2006. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

PLAZA, G. A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Journal of Petroleum Science and Engineering**. v. 50, n. 1, p. 71-77, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2005.10.005>

PRICE, P. B. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, v. 97, p. 1247-1251, 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1247>

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2015. URL: <<http://www.R-project.org/>>.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Revista Química Nova**, vol. 30, n. 5, p.1374-1380, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500054>

ROCHA, C.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G.; VIERMA, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 125- 128, 1992. <https://doi.org/10.1007/BF01195830>

ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation médium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1295-1299, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9175-8>

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO, M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo da estabilidade do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. **4º PDPESTRO**. Campinas, São Paulo. 2007.

RON, E.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. **Current opinion in biotechnology**, v. 8, p. 313-316, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80009-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80009-2)

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low- molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999. <https://doi.org/10.1007/s002530051502>

SANTANA, W. J.; RUFINO, R. D.; NETO, B. B.; PORTO, A. L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biosurfactantes por *Candida lipolytica* UCP065 utilizando o óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Camb.) proveniente do endocarpo. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos (SP), 2005.

SARI, M.; KUSHARYOTO, W.; ARTIKA, I. M. Screening for Biosurfactant-producing Yeast: Confirmation of Biosurfactant Production. **Asian Network for Scientific Information**, v. 13, n. 3, p. 106-111, 2014. <https://doi.org/10.3923/biotech.2014.106.111>

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. P.; 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, 2001.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZAMI, W. Agitação e aeração em biorreatores. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Cap. 14. Edgard blucher LTDA: Brasil. 2001.

SCRUCCA, L. GA: A Package for Genetic Algorithms in R. **Journal of Statistical Software**, v. 53(4), p. 1-37, 2013. URL: <http://www.jstatsoft.org/v53/i04/> <https://doi.org/10.18637/jss.v053.i04>

SHEPERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207-217, 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00053-S](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00053-S)

SHIVAJI, S., PRASAD, G.S. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. **Yeast Biotechnology: Diversity and Application**. p. 3-18, 2009.

SILVEIRA, E.; MARQUES, P. P.; SILVA, S. S.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Selection of Pseudomonas for industrial textile dyes decolourization. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 2, p. 230-235, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.09.007>

SOUZA SOBRINHO, H.B.; GUSMÃO, C.A.B., LUNA, J.M.; RUFINO R.D.; SALGUEIRO, A.A.; SARUBBO, L.A. Produção de biosurfactante por *C. sphaerica* em meio de baixo custo. 1º Workshop Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia: de mãos dadas para o futuro. Universidade Católica de Pernambuco, Recife – PE. 2006.

SYLDATK, C.; WAGNER, F.; Production of biosurfactant. **Biosurfactants and Biotechnology**, KOSARIC, N., CAIRNS, W. L.; GARY, N. C. C. Marcel Dekker: New York, 1987.

THANOMSUB, B.; WATCHARACHAI PONG, T.; CHOTELERSAK, K.; ARUNRATTIYAKORN, P.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadai*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 588-592, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02202.x>

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in applied microbiology**, v. 45, p. 686-691, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02256.x>

THAVASI R.; SHARMA S.; JAYALAKSHMI S. Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, 2011.

THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. Biosurfactants from potato process effluents. In: **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. **Humana Press**, v. 84-86, p. 917-930, 2000. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1392-5_71

THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. The effect of pretreatments on surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 487-501, 2001. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:487>

VANCE—HARROP, M. H. V.; GUSMÃO, N. B.; TAKAKI, G. M. C. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**; v. 34, p. 120-23, 2003.

VISHNIAC, H. S. Yeast biodiversity in the Antarctic. In: Rosa, C.A., Péter, G. eds. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Springer-Verlag, p. 221-240, 2006. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_16

XIAO, J. HUI; CHEN, D. X.; WAN, W. X.; HU, X. J.; OI, Y.; LIANG, Z.Q. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1887–1893, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.031>

YANG, S.; JIN, L.; REN, X.; LU, J.; MENG, Q. Optimization of fermentation process of *Cordyceps militaris* and antitumor activities of polysaccharides in vitro. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 4, p. 468–476, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.028>

ZHEN, H.; XU-TAO, Z.; GUI-QING, X. Product quality improvement through response surface methodology: a case study. **International Conference on Technology Innovation and Industrial Management**, p. 120–130, 2013.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, p. 67-73, 2002. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200203\)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200203)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M)