

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA ÓTIMO PARA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE PELA LEVEDURA *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 E
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

ANTÔNIO MANOEL DRUMOND DE OLIVEIRA ROCHA

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA - MG

Abril - 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA ÓTIMO PARA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE PELA LEVEDURA *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 E
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

ANTÔNIO MANOEL DRUMOND DE OLIVEIRA ROCHA

Prof. Dr. EDGAR SILVEIRA CAMPOS
Orientador

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA - MG
Abril - 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA ÓTIMO PARA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE PELA LEVEDURA *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 E
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

ANTÔNIO MANOEL DRUMOND DE OLIVEIRA ROCHA
Prof. Dr. EDGAR SILVEIRA CAMPOS
Orientador
IBTEC

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em 07/04/2022

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
Coordenador do Curso de Biotecnologia

UBERLÂNDIA - MG
Abril - 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA ÓTIMO PARA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE PELA LEVEDURA *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 E
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Antônio Manoel Drumond de Oliveira Rocha

Aprovado pela Banca Examinadora em: 07/04/2022

Nota: 91

Presidente da Banca Examinadora
Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia, 07 de abril de 2022

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas obtidas a partir do metabolismo de determinados microrganismos, apresentando baixa toxicidade, alta estabilidade além de serem biodegradáveis, sendo estas algumas vantagens em relação aos surfactantes químicos. Entretanto, o custo de produção dos biossurfactante pode muitas vezes ser elevado, dificultando sua aplicação nos diversos setores aos quais poderia se associar como nas indústrias de saneantes, cosméticos, em processos de biorremediação, dentre outros. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo otimizar custos da produção de biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, além de trazer a aplicação biotecnológica para a molécula estudada. O resíduo de abacaxi foi escolhido como fonte de carbono por esta ser uma fruta produzida em larga escala no Brasil, além de gerar uma grande quantidade de lixo orgânico. A levedura escolhida para este estudo foi a *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, isolada do ambiente antártico, e que apresenta condições de crescimento e produção de biossurfactante desejáveis para os objetivos deste trabalho. A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 foi capaz de produzir o biossurfactante utilizando o resíduo de abacaxi como fonte de carbono, e uma nova suplementação com o resíduo no tempo de 10 horas, a produtividade aumentou de 21,2 g.L⁻¹ para 36 g.L⁻¹ em 16 horas de fermentação.

Palavras chave: Fermentação; Otimização de Meio de Cultura; Biossurfactante

Sumário

1. Introdução.....	2
1.1 Surfactantes	2
1.2 Biorremediação	4
1.3 Microrganismos.....	4
1.4 Processo Fermentativo	7
1.4.1 Planejamento Experimental.....	9
2. Objetivo Geral.....	10
2.1 Objetivos Específicos.....	10
3. Materiais e Métodos	100
3.1 Microrganismo.....	10
3.2 Pré Inóculo	10
3.3 Resíduos Agroindustriais	11
3.4 Otimização do meio utilizando resíduo agroindustrial	111
3.4.1 Tensão Superficial	11
3.4.2 Índice de Emulsificação (E24%)	12
3.4.3. Rendimento	12
3.4.4 Planejamento Fatorial Fracionário 25 – 1	12
3.4.5 Planejamento em estrela com três variáveis	14
3.4.6 Planejamento em estrela com duas variáveis.....	16
3.5 Aplicação Biotecnológica	17
4. Resultados e Discussão	18
4.1 Influência da fonte de Carbono e Nitrogênio na produção de biossurfactante ..	18
4.2 Otimização do meio utilizando resíduo agroindustrial	20
4.2.1 Planejamento Fatorial Fracionário 25 – 1	20
4.2.2 Planejamento Composto Central	244
4.2.3 Segundo Planejamento Composto Central.....	266
4.3 Aplicação Biotecnológica	29
5. Conclusão.....	322
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	333

1. Introdução

1.1 Surfactantes

Surfactantes são agentes tensoativos anfifílicos ou anfipáticos que possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica reduzindo as tensões superficiais e interfaciais, acumulando-se na interface entre dois líquidos imiscíveis como óleo e água. Isso significa que os surfactantes também são capazes de auxiliar na solubilidade de compostos polares em solventes orgânicos (SAHARAN *et al.*, 2011). Devido a estas características, apresentam propriedades como: redução da tensão superficial e interfacial de misturas imiscíveis, da concentração crítica de micelas, entre outras particularidades que os tornam alvos de estudo e interesse de diversas indústrias petroquímicas, alimentícias, cosméticas, farmacêuticas, entre outras.

Os surfactantes são derivados do petróleo ou de fontes oleoquímicas e são os ingredientes ativos encontrados em detergentes e sabões. Devido a isso, eles apresentam uma gama de características supracitadas, tais como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases, tornando os surfactantes em moléculas versáteis para diversas aplicações (BANAT; MAKKAR, CAMEOTRA, 2000). Porém eles apresentam elevado potencial de poluição do meio ambiente, além de serem tóxicos e dificilmente degradados por microrganismos. Dessa forma, a produção do biossurfactante surgiu como uma via alternativa da produção dessa biomolécula, visto que ela possui grandes vantagens quando comparados aos surfactantes químicos, como a sua produção através de microrganismos e uma menor toxicidade.

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas e estruturalmente diversas que consistem em porções hidrofílicas e hidrofóbicas, que formam partição entre substâncias líquidas com diferentes níveis de polaridade (SANTOS *et al.*, 2016). Normalmente, a porção hidrofóbica é uma cadeia de hidrocarbonetos que consiste em ácidos graxos de cadeia longa (saturados ou insaturados) enquanto a fração hidrofílica possui uma ampla faixa de constituintes, podendo ser iônica – que em solução aquosa possuem cargas positivas e apresentam atividade bacteriana e condicionante; aniônica – quando dissolvidos irão apresentar cargas negativas, sendo amplamente utilizadas na indústria de cosméticos; não iônica – devido à falta de cargas eles podem ser utilizados junto com os aniônicos; anfotérica – apresentam dois polos carregados, um positivamente e outro negativamente, em que a carga

dependerá do pH da solução; aminoácidos ou polissacarídeos (SILVA *et al.*, 2014; MAO *et al.*, 2015).

Eles são divididos em dois grupos, biossurfactantes de baixo peso molecular e de alto peso molecular (SHARMA e SAHARAN, 2016). Os surfactantes biológicos de baixo peso molecular são reconhecidos pela excelente atividade de superfície, diminuindo a tensão superficial e interfacial entre as diferentes fases, possui baixa concentração micelar crítica (CMC) e estabilizam emulsões (BATISTA *et al.*, 2006; UZOIGWE *et al.*, 2015). Eles consistem em fosfolipídios, glicolipídios, lipídios neutros ou ácidos graxos com peso molecular de 500 a 1500 Da (BANAT *et al.*, 2010). Pelo contrário, os biemulsificantes são moléculas de alto peso molecular que são mais eficientes na formação e estabilização de emulsões óleo-água ou água-óleo sem reduzir a tensão superficial ou interfacial (GUDIÑA *et al.*, 2015). Eles são compostos por lipopolissacarídeos, proteínas, lipoproteínas ou glicoproteínas, que contribuem para a sua emulsificação e estabilização da emulsão.

Entende-se por Concentração Micelar Crítica (CMC) a menor concentração em que ocorre a formação de micelas, isto é, ao analisar a influência de um surfactante é importante ressaltar que quanto menor a CMC, mais eficiente ele é, pois necessita de uma menor quantidade para reduzir a tensão superficial ao máximo. Quando estão em concentrações abaixo da CMC, os surfactantes encontram-se na forma de monômeros, porém quando esses valores estão próximos um do outro, é possível observar um equilíbrio entre os monômeros e as micelas (HINZE e PRAMAURO, 1993). Essa propriedade corresponde ao ponto em que o surfactante apresenta um valor onde obtém o maior valor da redução da tensão superficial (RUFINO *et al.*, 2008).

Pesquisas relacionadas à produção e a utilização dos biossurfactantes têm aumentado devido a sua maior biodegradabilidade, baixa toxicidade, menor CMC, maior estabilidade em variações de pH, temperatura e salinidade, além das vantagens oferecidas em relação a sua estrutura química funcional (JOSHI, *et al.*, 2008). Os surfactantes químicos apresentam desvantagens em relação aos biossurfactantes, visto que estes possuem propriedades funcionais distintas, incluindo emulsificação, umectação, formação de espuma, inibição de corrosão, dispersão, limpeza, atividade de superfície, entre outras. Essas características os tornam candidato adequado para várias aplicações biotecnológicas como: biorremediação, recuperação de óleo em ambientes contaminados, aditivos em produtos de limpeza e formulações de

lavanderia, e agentes estabilizadores de emulsão nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica; despertando o interesse das indústrias nessa biomolécula (ADETUNJI e OLANIRAN, 2018; ARAÚJO et al., 2019; MUJUMDAR et al., 2019).

1.2 Biorremediação

Os biossurfactantes têm a capacidade de serem utilizados na recuperação de área contaminadas em uma técnica denominada biorremediação, a qual se define por utilizar organismos vivos ou enzimas para remover, reduzir ou neutralizar poluentes orgânicos e inorgânicos. Essa técnica envolve a presença de microrganismos na área contaminada, os quais ao produzirem o biossurfactante tem o intuito de tornar biodisponível o poluente para a degradação pelos microrganismos (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Devido às suas propriedades, os surfactantes apresentam uma ampla aplicação nos setores industriais, agrícolas e ambientais. Dentro do ramo industrial são aplicados principalmente nas indústrias de produtos de limpeza e de higiene e nas indústrias petrolíferas (JIMOH e LIN, 2019). Atualmente, na indústria petrolífera, os surfactantes têm sido utilizados para auxiliar na limpeza de derramamento de óleo e para melhorar a recuperação dos reservatórios. Alguns estudos envolveram a remoção de metais pesados em que observou que biossurfactantes concentrados com baixo CMC removeu 100 ppm de chumbo e cádmio (DAS, 2009; MUKHERJEE, 2009). Contudo, como já foram citados, os surfactantes químicos são tóxicos ao meio ambiente e não são biodegradáveis, por isso, devido à capacidade emulsificante dos biossurfactantes, assim como a sua maior biodegradabilidade, aumentou o interesse da utilização dessas biomoléculas na biorremediação.

Portanto, a utilização dos biossurfactantes na remoção de petróleo bruto pesado, transporte do petróleo em oleodutos, gerenciamento de derramamento de óleo e limpeza de lodo nas instalações de armazenamento de óleo por biorremediação tornou-se mais frequente e complacente com a legislação ambiental. Além disso, essas biomoléculas são produzidas por uma infinidade de microrganismos, como leveduras, bactérias e fungos filamentosos.

1.3 Microrganismos

Ao longo dos anos, tem havido um esforço incessante na busca de microrganismos com potencial para produzir biossurfactantes com propriedades tensoativas ou emulsificante robustas (SILVA *et al.*, 2014). A quantidade de produção de biossurfactante é influenciada pelo tipo de microrganismo e suas fontes. Esses microrganismos são universalmente distribuídos e são encontrados na água, solo e ambientes agressivos (IBACACHE-QUIROGA *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2014).

No atual estudo, o enfoque será na utilização da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, organismo unicelular classificado no reino dos fungos. Os fungos são seres pertencentes ao Reino Fungi e correspondem a organismos eucarióticos, heterotróficos por absorção, aeróbios ou anaeróbios facultativos e em sua grande maioria, apresentam parede celular de quitina. Leveduras são seres unicelulares, podendo ser diferenciada por sua coloração branca ou avermelhada; possuem formas diversificadas, podendo ser esféricas, elípticas ou filamentosas. Em sua estrutura encontra-se uma membrana citoplasmática lipoproteica, responsável por regular as trocas com o meio externo e possuem parede celular rígida. As leveduras por serem classificadas como seres eucarióticos, possuem núcleos envolvidos por uma membrana e sua forma de reprodução pode ser sexuada ou assexuada, as quais envolvem a formação de esporos e a divisão binária que pode ser por brotamento ou formação de artroconídios, respectivamente (HOOG *et al.*, 2000).

As leveduras do gênero *Rhodotorulas* são pertencentes à ordem *Sporidiales* e família *Sporidiobolaceae*. Esse gênero apresenta células leveduriformes ovais, esferoidais ou alongadas com reprodução por brotamento polar ou multilateral, incapazes de produzir esporos, ausência ou formação rudimentar de pseudo-hifa ou hifa e ausência de balistoconídio (FEEL e STATZELL-TALLMAN, 2000).

Normalmente as culturas desses fungos demandam de 24 a 48 horas de incubação para serem detectáveis visualmente, apresentam uma coloração amarelada/avermelhada e possuem um aspecto liso e/ou mucoso. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25°C a 37°C e não são capazes de fermentar carboidratos (FEEL e STATZELL-TALLMAN, 2000, DE HOOG, *et al.*, 2000).

Microrganismos pertencentes aos domínios Bacteria, Eucarya e Archea, são capazes de desenvolver mecanismos fisiológicos e metabólicos, para superar as barreiras impostas pelo ambiente, principalmente as baixas temperaturas (RUSHI, *et*

al., 2007, BUZZINI, *et al.*, 2012). Esses microrganismos podem ser divididos em organismos psicrófilos, que englobam aqueles incapazes de crescer a temperaturas acima de 20°C, e os facultativos, são os microrganismos que crescem em temperaturas baixas, porém apresentam uma taxa de crescimento mais elevada quando cultivados em temperaturas acima de 20°C (KIMURA e MORITA, 1975, BRUNATI, *et al.*, 2009, BUZZINI, *et al.*, 2012).

As *Rhodotorulas* têm-se destacado para utilização nas indústrias em processos fermentativos, principalmente pela sua alta taxa de crescimento em matéria prima barata e vem sendo aplicadas em diferentes ecossistemas incluindo locais com condições pouco favoráveis, como exemplo, as profundezas do mar, solo e vegetação da Antártica, ambientes aquáticos hipersalinos de alta temperatura, entre outros. Devido ao aumento do interesse de microrganismos que consegue viver em ambientes extremos, principalmente as leveduras, estudos envolvendo microrganismos em ambientes frios, como da Antártica não se restringe apenas a aplicações biotecnológicas, mas também para obter informações ainda não conhecidas relacionadas à sua taxonomia e condições favoráveis de crescimento (PAVLOVA, *et al.*, 2001, BUTINAR, *et al.*, 2005, BRANCO, 2010).

O continente da Antártica é conhecido por possuir habitat frio e uma área de 14 milhões de quilômetros quadrados, dos quais 99% são cobertos por gelo e neve (FRANCISO, 2014). Além de ser muito frio, é considerado muito seco e apesar das condições extremas, há várias formas de vida representadas por bactérias, fungos, líquens, pequenos invertebrados e numerosas espécies de aves e mamíferos (BRUNATI *et al.*, 2012; BUZZINI *et al.*, 2012; ZUCCONI *et al.*, 2020). Assim como as aves e os mamíferos que são vistos habitualmente na Antártica, os microrganismos também desenvolveram mecanismos específicos para suportarem a influência da baixa temperatura, alta salinidade e radiação.

Alguns estudos com leveduras provenientes da antártica já foram realizados visando à produção do biossurfactante, evidenciando a possibilidade de produção de biossurfactante através das leveduras da antártica, que podem ser aplicados em diferentes setores industriais, como na área dos cosméticos. Estudiosos estudaram o efeito do biossurfactante *mannosylerythritol lipídico*, produzido pela levedura *Pseudozyma antártica*, sobre a hidratação de peles danificadas, e notaram que a aplicação dessas biomoléculas reverteu os danos na pele de forma dose dependente.

Diante dessa vasta diversidade de microrganismos na Antártica, é de suma importância destacar seu potencial biológico, assim como seu papel na indústria biotecnológica em relação a sua capacidade de produzir biomoléculas que servirão para a elaboração de novos produtos (FONTES, AMARAL, & COELHO, 2008)

Os principais métodos de produção do biossurfactante envolvem os tipos de fermentação (batelada e batelada alimentada), os quais estão presentes na maioria da produção industrial. Visando a substituição das fontes de carbono e/ou nitrogênio na composição do meio de cultura, o enfoque em resíduos agroindustrial, como o abacaxi será levado em conta.

1.4 Processo Fermentativo

Processos fermentativos são utilizados em indústrias com o intuito de obter produtos comerciais variados, dependendo do tipo de indústria na qual é aplicado. Consiste em utilizar fontes de carbono, como a glicose para a geração de energia e produção de açúcares e álcool etílico, os quais são utilizados diariamente pela população em alimentos, bebidas e nos combustíveis veiculares. Suas vantagens se caracterizam por serem flexíveis devido à possibilidade de obtenção em qualquer época do ano, possuir menores custos e toxicidade quando comparadas com outros surfactantes, utilização de substratos baratos e o controle das condições de cultivo, enquanto suas desvantagens possuem maior vulnerabilidade à contaminação e, conseqüentemente, seu tratamento requer cuidados e tempos adicionais para solucionar o problema (BARBIERI, *et al.*, 2012).

Os processos fermentativos são caracterizados em descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado. A produção de biossurfactantes em escala industrial depende do processo batelada, apresentando vantagens em relação a condições de assepsia, ao controle e acompanhamento do cultivo do microrganismo, e ao menor custo de produção devido à utilização de equipamentos com menor taxa de manutenção e instalação (GROB; SYLDATK; WAGNER, 1987; MEDINA, 2017).

No processo batelada, há a adição de soluto no começo do processo, não havendo interrupções. Normalmente, são adicionados anti-espumante e ácidos ou base para o controle do pH; quando o processo é aeróbico também há a adição de oxigênio. Já no processo batelada alimentada, durante o processo vão sendo adicionados alguns nutrientes, ocasionando aumento do volume de forma gradual e é

utilizado quando o microrganismo é sensível a fenômenos de inibição por substrato ou repressão catabólica (GROB; SYLDATK; WAGNER, 1987; MEDINA 2017).

A substituição do surfactante químico pelo biológico apresenta dificuldades, principalmente em relação ao custo de produção dos biossurfactantes, ao qual pode estar associada ao elevado custo das matérias prima utilizadas, elevando significativamente o custo final da produção. Com o intuito de otimizar e reduzir o custo de produção do biossurfactante, diferentes vias têm sido investigadas: utilização de resíduos industriais que apresentam fontes de carbono e nitrogênio importantes para o crescimento do microrganismo (RUFINO et al., 2008). Esses resíduos podem ser provenientes de diversas atividades industriais, como processamento de batatas, de óleos, de soja, milho, coco, amendoim, canola, entre outros. Por outro lado, a busca de tecnologias fermentativas capazes de ampliar a variedade de bioprodutos tem a importância na redução dos custos de produção destes produtos e na melhoria do aproveitamento da biomassa em processos sustentáveis, com especial destaque para o aproveitamento dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*), o qual é gerado como subproduto da produção de alimentos. Ademais, a maioria dos resíduos apresentam elevada quantidade de carboidratos, lipídeos e a alta concentração de micronutrientes essenciais para o metabolismo microbiano, consistindo em substratos adequados para a produção dessas biomoléculas (BARROS et al., 2008).

Esses subprodutos são oriundos de diversas atividades humanas (THOMPSON; FOZ; BALA; 2000), que geraram anualmente milhões de toneladas de resíduos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde da população. Assim, a utilização desses resíduos como matéria prima para processos biotecnológicos é uma opção atrativa para a redução da poluição e também dos custos de produção industrial de biossurfactantes (MANEERAT, 2005, PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). Resíduos do processamento do abacaxi têm despertado interesse como fonte de carbono em meios de cultura. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de abacaxi (*Ananas cosmosus*), com 58.000 hectares plantados (SILVEIRA et al., 2009; SOARES et al., 2012). Sua distribuição abrange principalmente as regiões Norte e Nordeste, onde se encontram cultivares nacionais com uma menor acidez e podem ser colhidas durante todo o ano, mesmo nas épocas mais secas – além disso, é o gênero mais consumido pelos brasileiros (MELETTI, et al., 2011).

As partes do abacaxi como a casca, coroa, talo e folhas não são utilizadas em processos industriais. No processo industrial, são retirados a copa, as folhas e o caule, que respondem por cerca de 50% (m/m) do peso total do abacaxi, ou seja, com o aumento da produção de abacaxi, os resíduos gerados pelo seu processamento também aumenta proporcionalmente. Os subprodutos industriais do processamento dessa fruta apresentam alto potencial econômico, pois podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado.

1.4.1 Planejamento Experimental

A principal forma de obtenção de biossurfactante é por meio de processos fermentativos, que consistem na utilização de fontes de carbono para geração de energia e metabólitos secundários (BARBIERI *et al.*, 2012). A otimização do processo e do meio de cultura é importante para a obtenção do máximo rendimento e preservação da biomolécula (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Mais recentemente, planejamentos experimentais e Metodologia de Superfície de resposta (MSR) têm sido eficientemente empregados para reduzir ainda mais os custos de produção nos processos biotecnológicos, por meio da seleção de proporções equilibradas dos constituintes do meio de produção. Estes métodos têm sido aplicados com sucesso na otimização de meios de cultivo para produção de biossurfactantes (LUNA *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013).

A padronização das condições do meio e da fermentação, como pH, aeração e agitação, são pontos importantes para o desenvolvimento de um processo que visa a produção máxima de surfactantes com menores custos. Recentemente tem-se utilizado métodos estatísticos nos quais suas variáveis são alteradas simultaneamente – vantagem observada quando comparado a outros métodos em que as variáveis são fixas e numerosas, tornando estes demorados e ineficientes (RUFINO *et al.*, 2008). Projetos estatísticos tornaram-se meios poderosos, pois apresentam dados estatísticos e análise da superfície de resposta. Além disso, avaliam os principais efeitos das interações dos parâmetros no desempenho do processo e permitem o controle das condições de cultivo visando substratos baratos e menor custo de produção (BARBIERI *et al.*, 2012).

Métodos projetados estatisticamente constituem uma abordagem alternativa eficiente que consome menos tempo, mão de obra e custo, evitando erros ao

considerar as interações entre os fatores estudados. Esse tipo de abordagem investiga todos os níveis das variáveis de interesse simultaneamente (BRUNS; SCARMINIO; NETO, 2006). O planejamento experimental é uma ferramenta que possibilita um menor número de testes para a geração de informações úteis e a análise das superfícies de resposta são exemplos de abordagens mais avançadas (PARK; CHO; KIM; CHU; 2005). A partir desses testes, é possível analisar a influência de cada fator e suas interações com outras variáveis, definindo assim a melhor forma de atingir a maior produção de um biossurfactante (RATNAM *et al.*, 2015, BRUNS; SCARMINIO; NETO, 2006).

2. Objetivo Geral

Utilização de planejamento experimental para desenvolver o melhor meio de cultura para produção de biossurfactante através da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747.

2.1 Objetivos Específicos

Otimização do meio de cultura utilizando planejamento experimental.

Realizar planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} ;

Aplicar um planejamento em estrela com três e duas variáveis;

Análise da Aplicação Biotecnológica do Biossurfactante

3. Materiais e Métodos

3.1 Microrganismo

Neste estudo, foi utilizada a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (código de separação L69) obtida de algas marinhas coletadas em Punta Plaza (Admiralty Bay, Ilha King George, Antártica) e classificadas e identificadas de acordo com Duarte *et al.*, 2013. Esta cepa está depositada no Centro de Recursos Microbiológicos (CRM – UNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Brasil) sob o número de depósito CRM 747. A levedura foi preservada pelo método de criopreservação com 50% (v/v) de glicerol.

3.2 Pré Inóculo

Para crescimento e adaptação da levedura, foi incubado em 1000 mL de YPD (g.L^{-1}) 1 mL do criotubo (glicerol e microrganismo): glicose (10), peptona (5) e extrato de levedura (3) por 72 horas e 15°C com 120 rpm de agitação.

3.3 Resíduos Agroindustriais

Os resíduos agroindustriais de abacaxi (*Ananas cosmosus*) foram adquiridos no mercado local, lavados com solução de hipoclorito de sódio a 10% (v/v) e processados em laboratório. O resíduo de abacaxi é basicamente a casca e as folhas. A quantificação do açúcar total foi realizada pela metodologia descrita por Miller (1959). Na primeira etapa, a hidrólise ácida foi realizada, HCl 2N (v/v) foi adicionado e reservado em banho-maria por 5 minutos; posteriormente em água gelada por mais 5 minutos, e então NaOH 2N foi adicionado. Após a hidrólise ácida, as amostras foram diluídas e 0,5 mL de cada amostra e 1 mL do reagente DNS foram adicionados em tubos folin wu, e cada tubo foi colocado em banho maria e banho de gelo por 5 minutos. Os tubos folin wu foram completados até a marcação de 12,5 com água destilada e finalmente foram submetidos à leitura por espectrofotômetro a 540 nm. O resultado da absorbância foi convertido para g.L^{-1} pela equação $y = 3570,5x$ obtida pela plotagem dos dados da curva padrão usando o fator de correção linear (R^2) = 0.9973. A análise foi realizada em triplicata, seguida de 3 leituras para cada réplica, com 9 resultados alcançados.

3.4 Otimização do meio utilizando resíduo agroindustrial

Para todos os modelos experimentais, a densidade óptica (OD) a 600 nm, do pré-inóculo foi transferido para Erlenmeyer de 200 mL contendo 150 mL do meio determinado na matriz do planejamento, dados observados nas tabelas 4, 6 e 8.

3.4.1 Tensão Superficial

Uma amostra de 5 mL foi usada para a análise da tensão superficial. O método usado foi um anel Noüy (1925) equipado com tensiômetro modelo K6 (Krüss GmbH, Hamburgo, Alemanha) em temperatura ambiente. Simultaneamente a análise da amostra, foi realizada a tensão do álcool etílico para calibração, então o valor padrão

foi dividido pelo valor real e a razão foi multiplicada pelo valor da tensão obtida na amostra.

3.4.2 Índice de Emulsificação ($E_{24\%}$)

O índice de emulsificação foi determinado a partir da metodologia descrita por Cai e colaboradores (2014), a qual consiste em misturar a amostra com óleo mineral na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi agitada fortemente em um vortex à temperatura ambiente durante 2 minutos e deixada em repouso por 24 horas. A taxa de emulsificação foi calculada dividindo a altura da parte emulsionada pela altura total e multiplicando a proporção por 100 (para obter o resultado em porcentagem), conforme mostrado na equação (1):

Equação 1

$$\% = \frac{\text{altura da emulsão} \times 100}{\text{altura total}}$$

3.4.3. Rendimento

Durante o planejamento experimental a extração do biossurfactante foi realizada utilizando soluções de clorofórmio e metanol como solventes de acordo com a metodologia de Silva *et al* (2010) como descrito a seguir. Após centrifugar o caldo fermentado a 800 G por 20 minutos para remoção das células, a amostra foi acidificada para pH 2 utilizando HCl 6M. A solução de clorofórmio/metanol foi então adicionada à amostra em uma proporção de 2:1 (v/v). A mistura foi agitada constantemente a 120 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, a mistura foi deixada em repouso em um funil de separação até que as duas fases (orgânica e inorgânica) fossem identificadas e a fase orgânica fosse coletada. A maior parte do solvente da fase contendo biossurfactante foi extraída usando um rotaevaporador a 60°C. O resíduo do solvente foi evaporado em uma estufa de circulação forçada a 37°C. O rendimento do biossurfactante foi obtido pela análise gravimétrica de Silva *et al.*, 2010.

3.4.4 Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1}

A metodologia de superfície de resposta e as linhas de contorno descritas por Box *et al* (1978) foram destinadas ao planejamento experimental e otimização, visto que são os desenhos experimentais de primeira ordem mais populares. Após selecionar a melhor fonte de carbono e nitrogênio, o melhor resíduo agroindustrial, o qual será utilizado como substrato para produção de biossurfactante, foi avaliado conjuntamente com outras variáveis (Tabela 3) em um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} , em dois níveis (+1 e -1), com quatro repetições dos ensaios apenas no ponto central, resultando em um total de 20 ensaios.

Tabela 3: Níveis e variáveis utilizados no planejamento experimental 2^{5-1}

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração do Abacaxi (g.L ⁻¹)	5	10	15
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	5	10	15
pH	4	6	8
Sulfato de amônio (g.L ⁻¹)	0.5	1.0	1.5
Peptona (g.L ⁻¹)	0.5	1.0	1.5

*solução salina (g.L⁻¹): NaCl (10), Na₂HPO₄ (5), KH₂PO₄ (2) e MgSO₄.7H₂O (0.2).

*fermentação submersa: 15 °C e 120 rpm de agitação, em dois intervalos de tempo: 24 e 48 horas.

Fonte: SOUSA (2021)

Tabela 4: Matriz do planejamento experimental 2^{5-1}

Ensaio	Extrato de levedura	Extrato do abacaxi	Peptona	Sulfato de amônio	pH
1	-1	-1	1	-1	-1
2	-1	-1	-1	-1	1
3	1	1	-1	1	-1
4	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	0	0	0	0	0
13	-1	1	1	1	-1
14	-1	-1	1	1	1
15	1	-1	1	1	-1
16	0	0	0	0	0
17	1	1	-1	-1	1
18	-1	1	1	-1	1
19	0	0	0	0	0
20	-1	1	-1	-1	-1

Fonte: SOUSA (2021)

3.4.5 Planejamento em estrela com três variáveis

O planejamento em estrela ou planejamento composto central é usado para encontrar o ponto ideal para a variável considerada e requer menos testes para chegar a um modelo quadrático. A implementação deste planejamento é necessária porque os planejamentos anteriores não permitiram obter a área superficial máxima das variáveis estudadas. Para realização do planejamento em estrela foi adicionado ao planejamento inicial, um planejamento igual, porém girado em 45° em relação à orientação de partida.

Os novos pontos ficaram localizados a uma distância de $(2^n)^{\frac{1}{4}}$ do ponto central, onde n é o número de entradas, neste trabalho, $(2^3)^{\frac{1}{4}} = (8)^{\frac{1}{4}} = \sqrt[4]{8}$. O planejamento em estrela foi realizado em dois níveis (+1 e -1), com quatro repetições dos ensaios apenas no ponto central. Os dados estão presentes na Tabela 4.

Tabela 5: Níveis e variáveis utilizados no planejamento experimental composto central

Variáveis	Níveis				
	$-\sqrt[3]{8}$	-1	0	+1	$\sqrt[3]{8}$
Concentração do Abacaxi (g.L ⁻¹)	1.59104	5	10	15	18.40896
Sulfato de amônio (g.L ⁻¹)	0.159104	0.5	1.0	1.5	1.840896
Peptona (g.L ⁻¹)	0.159104	0.5	1.0	1.5	1.840896

*solução salina (g.L⁻¹): NaCl (10), Na₂HPO₄ (5), KH₂PO₄ (2) e MgSO₄.7H₂O (0.2); extrato de levedura: 15 g.L⁻¹; pH = 8.

* fermentação submersa: 24 horas a 120 rpm de agitação e 15 °C.

Fonte: SOUSA (2021)

Tabela 6: Matriz do planejamento experimental composto central

Ensaio	Extrato do abacaxi	Peptona	Sulfato 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	$-\sqrt[3]{8}$	0	0
10	$\sqrt[3]{8}$	0	0
11	0	$-\sqrt[3]{8}$	0
12	0	$\sqrt[3]{8}$	0
13	0	0	$-\sqrt[3]{8}$
14	0	0	$\sqrt[3]{8}$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	-1	-1	-1
20	-1	-1	1

Fonte: SOUSA (2021)

3.4.6 Planejamento em estrela com duas variáveis

Com apenas os dois planejamentos experimentais anteriores não foi possível determinar as concentrações ideais das variáveis analisadas, portanto, um segundo planejamento experimental composto central em dois níveis (-1 e +1) com quatro repetições dos ensaios foram realizados apenas no ponto central. Neste planejamento, as variáveis avaliadas foram as concentrações de extrato de abacaxi e peptona, movendo o ponto central do coeficiente de concentração do caldo de abacaxi para 20 g.L^{-1} . Os novos pontos são localizados a uma distância de $\sqrt[4]{4} = \sqrt{2}$ devido ao novo planejamento conter apenas duas variáveis. A Tabela 7 mostra os dados do segundo planejamento em estrela.

Tabela 7: Níveis e variáveis utilizados no segundo planejamento experimental composto central

Variáveis	Níveis				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$\sqrt{2}$
Concentração do Abacaxi (g.L^{-1})	12.92893	15	20	25	27.07107
Peptona (g.L^{-1})	0.292893	0.5	1.0	1.5	1.707107

*solução salina (g.L^{-1}): NaCl (10), Na_2HPO_4 (5), KH_2PO_4 (2) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2); extrato de levedura: 15 g.L^{-1} ; Sulfato de amônio: 1 g.L^{-1} ; $\text{pH} = 8$.

* fermentação submersa: 24 horas a 120 rpm de agitação e 15°C .

Fonte: SOUSA (2021)

Tabela 8: *Matriz do planejamento experimental composto central*

Ensaio	Extrato do abacaxi	Peptona
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	$-\sqrt{2}$	0
6	$\sqrt{2}$	0
7	0	$-\sqrt{2}$
8	0	$\sqrt{2}$
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Fonte: SOUSA (2021)

3.5 Aplicação Biotecnológica

Para experimentos de aplicação biotecnológica, foram utilizados óleo de motor usado e água doce da represa localizada no Complexo Parque do Sabiá, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Os experimentos foram realizados de acordo com o método modificado de Santos *et al* (2017). Frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo água da represa e 1 mL do hidrocarboneto, sendo o volume final após a adição de todos os componentes de 50 mL. Os frascos foram incubados em um shaker rotativo a 120 rpm e 28°C durante 30 dias. As amostras foram coletadas nos dias 1, 7, 21 e 30 do experimento gerando um total de quatro amostras. Todo o experimento foi realizado três vezes. O experimento foi realizado nas seguintes condições:

Tabela 9: Condições experimentais para teste de biorremediação da água doce contaminada por óleo de motor

Amostras	Composição
Controle - estéril	Água + hidrocarboneto
Controle - não estéril	Água + hidrocarboneto
Condição 1 - estéril	Água + hidrocarboneto + L69
Condição 2 - estéril	Água + hidrocarboneto + L69 + BS (CMD)
Condição 1 - não estéril	Água + hidrocarboneto + BS (CMD)

Legenda: L69 – adição de 1DO do pré-inóculo da levedura Rhodotorula mucilaginosa CRM 747; BS (CMD) – adição de 59,14 g.L⁻¹ do biossurfactante extraído.

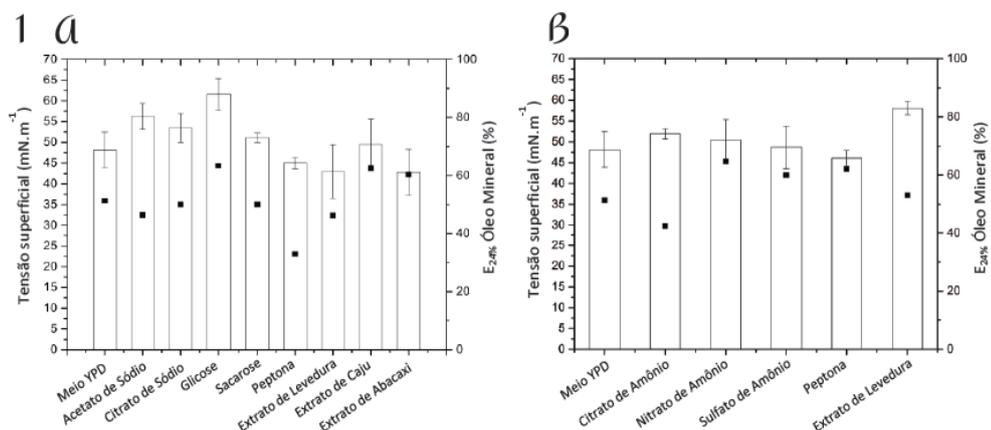
Fonte: SOUSA (2021)

4. Resultados e Discussão

4.1 Influência da fonte de Carbono e Nitrogênio na produção de biossurfactante

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, codificada por L69 foi exposta a condições de meio de cultura diferentes, onde foram analisadas duas variáveis, fonte de carbono e fonte de nitrogênio. A temperatura e o tempo de fermentação para o desenvolvimento e produção da biomolécula foram de 15°C e 56 horas.

Os gráficos abaixo apresentam os resultados da tensão superficial e índice de emulsificação em óleo mineral afim de selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para o microrganismo utilizado.



Fonte: SOUSA (2021)

Figura 1: Tensão Superficial (mN.m^{-1}) e Índice de Emulsificação em óleo mineral (%) da levedura L69. **A** – Diferentes fontes de Carbono. **B** – Diferentes fontes de Nitrogênio. **Legenda:** Colunas - resultados da tensão superficial; ■ - índice de emulsificação.

De acordo com a literatura, as principais propriedades dos surfactantes são a capacidade da molécula em reduzir a tensão superficial e interfacial e a capacidade emulsificante de soluções imiscíveis, portanto os testes de tensão superficial e índice de emulsificação em óleo mineral ($E_{24\%}$) foram utilizados para seleção dos melhores meios de cultura para a levedura analisada.

Como demonstrado na Figura 1 – A, os meios de cultura contendo as fontes de carbono glicose, extrato de abacaxi, e extrato de caju, apresentaram melhor índice de emulsificação, acima de 60%, comparados ao meio padrão YPD e demais meios testados. Um índice de emulsificação deve ser superior a 60% para ser considerado significativo (BHARALI, 2011), justificando a utilização destes meios de cultura. Já nos testes de tensão superficial (Figura 1 – A) pode-se observar que os melhores resultados se deram a partir da utilização de peptona, extrato de levedura e extrato de abacaxi, cuja redução da tensão superficial foi de 60 mN.m^{-1} para 45 mN.m^{-1} , 43 mN.m^{-1} , e 43 mN.m^{-1} , respectivamente.

O extrato de abacaxi e o extrato de caju foram comparados realizando-se análise estatística com 95% de confiança, comprovando-se assim que estes são estatisticamente iguais, portanto, apresentam resultados semelhantes nos testes realizados. Foram selecionados para este estudo os meios de cultura com extrato de abacaxi e extrato de levedura.

O extrato de abacaxi mostrou-se mais viável devido à grande disponibilidade da fruta na região sudeste brasileira, e o extrato de levedura por apresentar maior redução da tensão superficial. Sarubbo e colaboradores (2007) realizaram um estudo semelhante, onde foi utilizada a levedura *Candida lipolytica*, em diferentes meios. A biomolécula produzida neste caso foi capaz de reduzir a tensão superficial de 71 para 34 mN.m^{-1} nas primeiras 48 horas de fermentação em meio contendo 10% de óleo de canola e 10% de glicose.

Em relação às melhores fontes de nitrogênio, representados na Figura 1-B, foi identificado que os resultados mais promissores para o índice de emulsificação se deram com os meios onde havia nitrato de amônia (65%), sulfato de amônio (60%) e peptona (62%). Já para os testes de tensão superficial, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o sulfato de amônio (48 mN.m^{-1}) e a peptona (46 mN.m^{-1}) como

fontes de nitrogênio. Dados estes resultados, optou-se pela utilização do sulfato de amônio e da peptona, cujos resultados em ambos os testes foram satisfatórios.

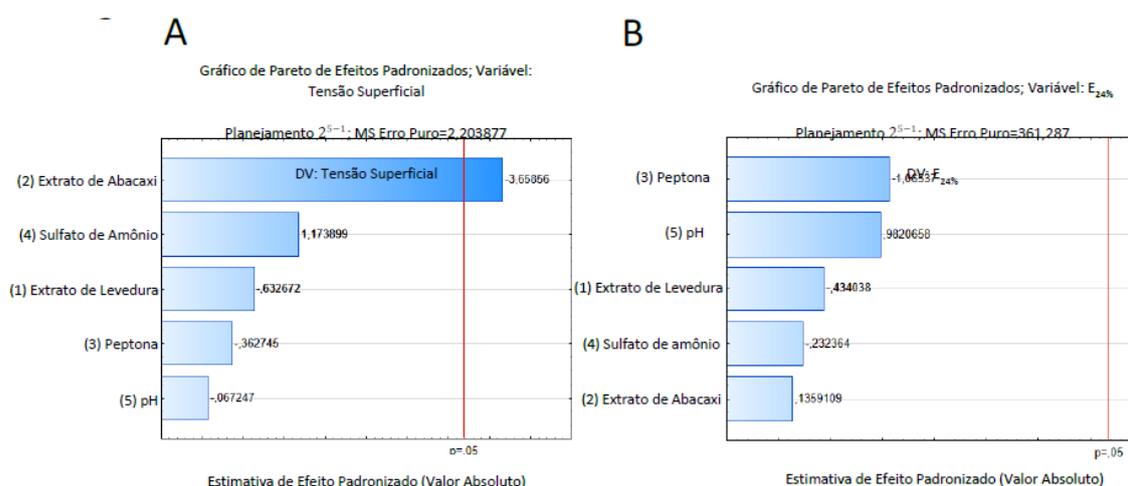
4.2 Otimização do meio utilizando resíduo agroindustrial

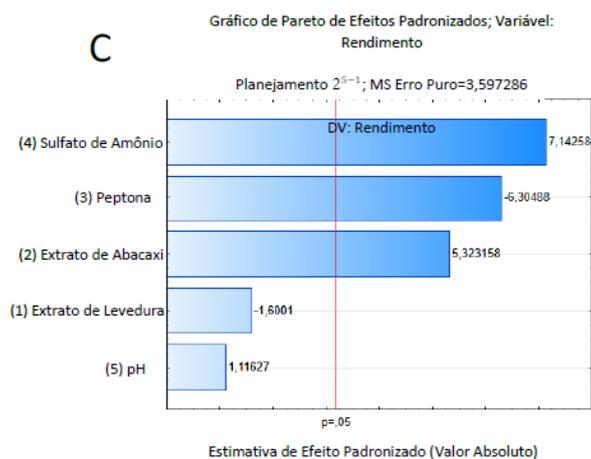
Após serem selecionadas as melhores fontes de carbono e nitrogênio, foram realizados planejamentos experimentais para determinar qual o melhor meio de cultura para crescimento e produção de biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747.

4.2.1 Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1}

O planejamento experimental fatorial fracionário 2^{5-1} foi utilizado para análise da influência das variáveis extrato de levedura, extrato de abacaxi, peptona, sulfato de amônio, pH e tempo de fermentação, em relação as respostas de tensão superficial, índice de emulsificação e produção do biossurfactante. Considera-se três níveis para os fatores analisados (-1, 0 e +1). Foi utilizado o software Statistica versão 12.5 para análise dos dados do trabalho, considerando 95% de intervalo de confiança.

A Figura 2 representa os dados dos experimentos realizados, sendo a linha vertical representante do limiar de significância. As barras na horizontal à esquerda do limiar de significância não apresentam efeito significativo, enquanto à direita da linha representa uma influencia significativa para a variável analisada.





Fonte: SOUSA (2021)

Figura 2: Gráfico do Pareto: **A** – Tensão Superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$); **B** – Índice de Emulsificação (%); **C** – Rendimento ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

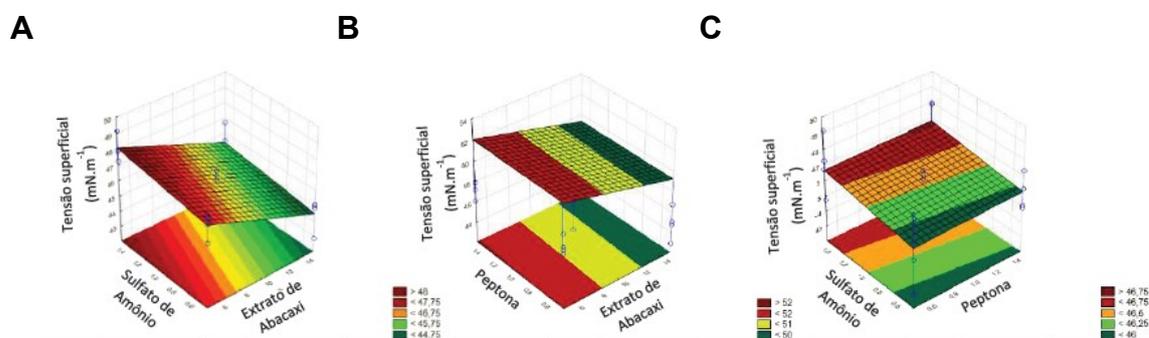
A produção do biossurfactante e suas propriedades são confirmadas através das análises qualitativas da tensão superficial e do índice de emulsificação, enquanto o rendimento determina quantitativamente a produção da biomolécula.

O estudo do índice de emulsificação não demonstrou efeito significativo para nenhuma variável, sendo os maiores valores obtidos através dos ensaios com extrato de abacaxi (61%), Sulfato de amônio (60,5%), e peptona (54,5%). Em relação à redução da tensão superficial, apenas o extrato de abacaxi apresentou resultado significativo, sendo estes resultados melhores apresentados quando o extrato se encontrava no nível +1 ($15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Já o rendimento de biossurfactante foi influenciado significativamente pelo extrato de abacaxi, a peptona e o sulfato de amônio. Para o extrato de abacaxi o melhor resultado foi com o nível +1 ($15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), enquanto o sulfato de amônio e a peptona no nível -1 ($0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), sendo produzida uma quantidade de aproximadamente $30,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ da biomolécula. Devido a estes resultados, os planejamentos experimentais posteriores focaram no uso de extrato de abacaxi, sulfato de amônio e peptona.

Almeida e colaboradores (2015) avaliaram a produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR). Neste estudo as variáveis analisadas foram resíduos industriais, agitação e concentração de inóculo, em 5 níveis (+2, +1, 0, -1 e -2). Os melhores resultados na análise de tensão superficial foram obtidos nos ensaios 7, 3 e 2, reduzindo para 29,19, 29,47 e 29,52 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ respectivamente. O ensaio 2 (resíduos industriais) foi

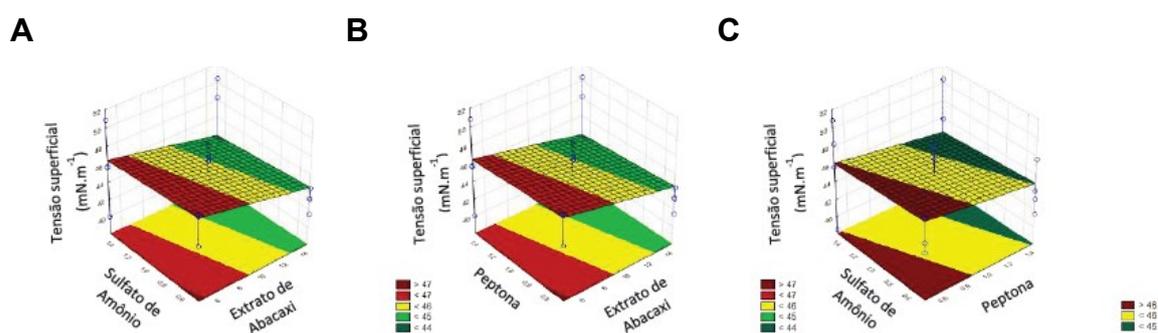
considerado o mais promissor neste estudo devido ao custo de produção, visto que este ensaio no nível -1 obteve resultados semelhantes aos ensaios 7 e 3.

As superfícies de resposta, apresentadas nas figuras 3 e 4, determinaram como tempo de fermentação ideal 24 horas, sendo mais adequado do que as 48 horas devido à superfície de resposta mais inclinada, o que facilita o deslocamento dos valores e a obtenção de resultados significativamente diferentes, desejáveis para otimização utilizando um planejamento experimental. Os valores de pH e extrato de levedura foram fixados respectivamente em 8 e 15g.L-1 para os testes subsequentes, como demonstrado nas figuras 5 e 6, já que não exerceram influência significativa no bioprocessos.



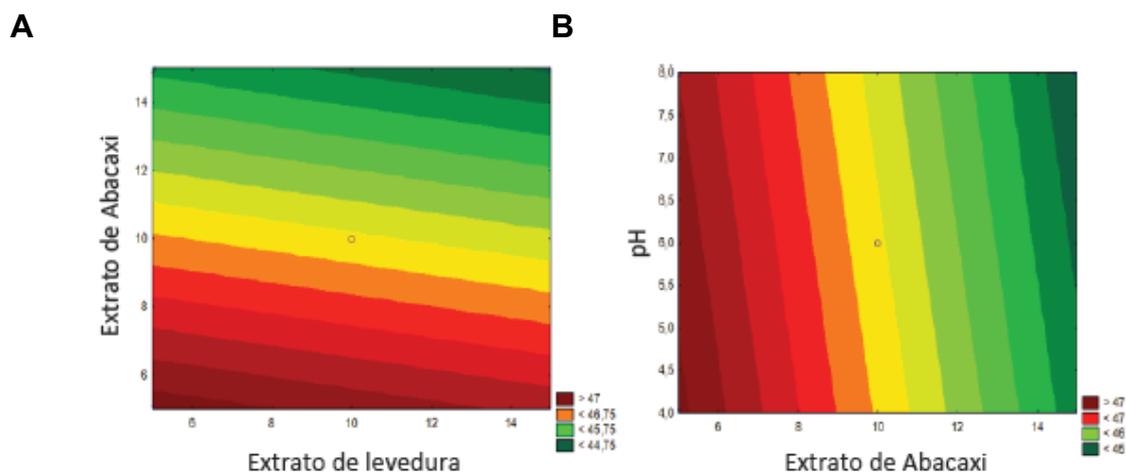
Fonte: SOUSA (2021)

Figura 3: Superfície de resposta: Tensão Superficial (mN.m⁻¹) 24 horas. **A** – Sulfato de amônio x Extrato de Abacaxi; **B** – Peptona x Extrato de abacaxi; **C** – Sulfato de amônio x Peptona.



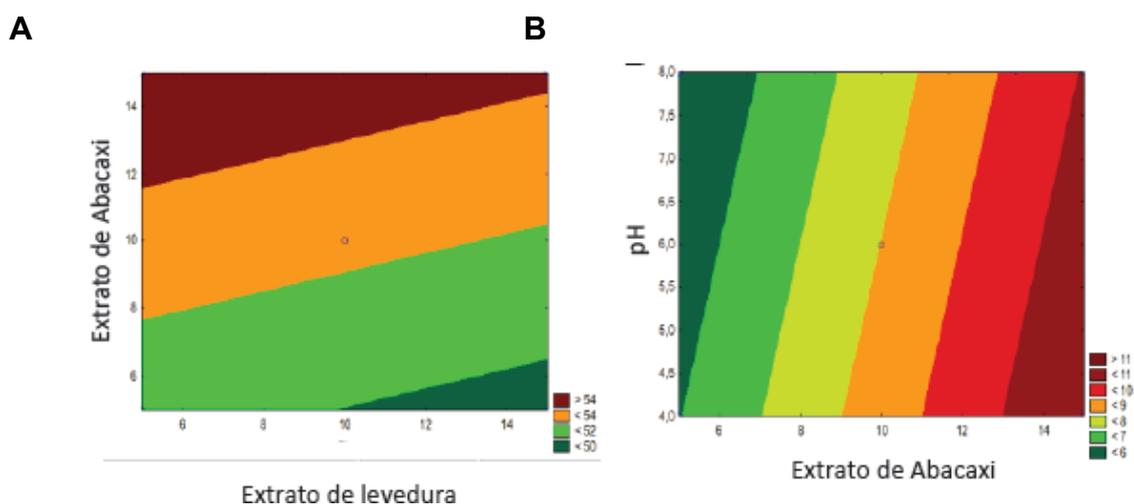
Fonte: SOUSA (2021)

Figura 4: Superfície de resposta: Tensão Superficial (mN.m⁻¹) 48 horas. **A** – Sulfato de amônio x Extrato de abacaxi; **B** – Peptona x Extrato de abacaxi; **C** – Sulfato de amônio x Peptona.



Fonte: SOUSA (2021)

Figura 5: Curva de Nível: Tensão Superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) – 24 horas. **A** – Extrato de abacaxi x Extrato de Levedura; **B** – pH x Extrato do abacaxi.



Fonte: SOUSA (2021)

Figura 6: Curva de Nível: Rendimento ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) – 24 horas. **A** – Extrato de abacaxi x Extrato de levedura; **B** – pH x Extrato de abacaxi.

Em um estudo realizado por Batista e colaboradores (2010) o efeito dos componentes do meio na produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* utilizando óleo de fritura como fonte de carbono foram analisados através de um designer fatorial fracionado 2^{5-1} . Foram avaliadas as respostas de tensão superficial, produção do biossurfactante, atividade de emulsificação e biomassa. O nível do extrato de levedura que obteve o melhor resultado neste estudo foi diferente do que foi analisado no presente trabalho, sendo a maior redução da tensão superficial

(33,66 mN.m⁻¹) com o nível -1 (0,01%). Similar ao encontrado neste trabalho, o extrato de levedura não apresentou influência estatisticamente significativa para o rendimento, sendo a maior produção alcançada de 3,61 g.L⁻¹.

4.2.2 Planejamento Composto Central

A influência do extrato de abacaxi, da peptona e do sulfato de amônio sobre as variáveis anteriormente estudadas foi analisada a partir de um planejamento composto central, visto que o planejamento anterior não foi capaz de determinar a região de maximização para essas variáveis.

Neste planejamento, apresenta-se um ponto central representado pelo nível “0”, níveis inferiores (-1) e superiores (+1) e pontos axiais para determinar os termos quadráticos (- $\sqrt[4]{8}$ e + $\sqrt[4]{8}$). O software *Statistica* versão 12.5 foi utilizado para análise dos dados, considerando 95% de intervalo de confiança e erro puro, sendo os valores em g.L⁻¹ de cada fator analisado apresentados na Tabela 5. Os gráficos do Pareto são representados na Figura 7.

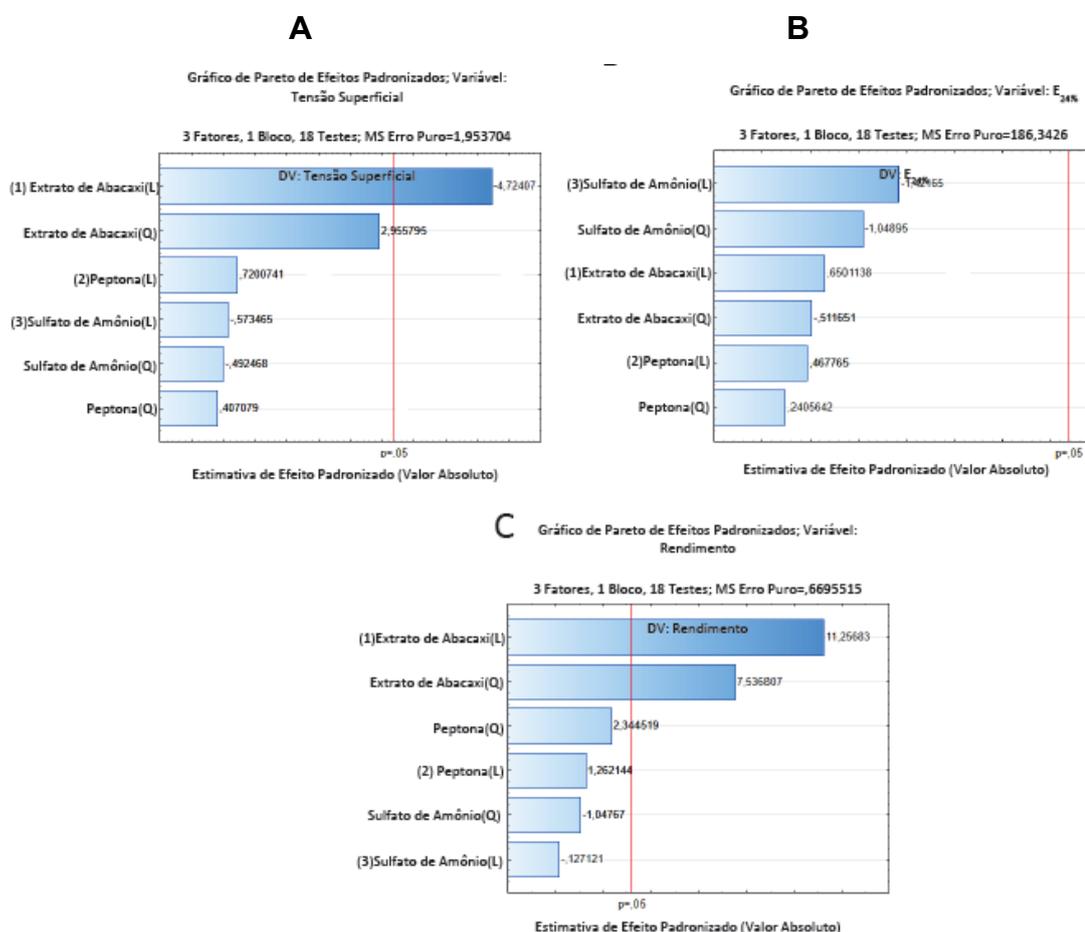
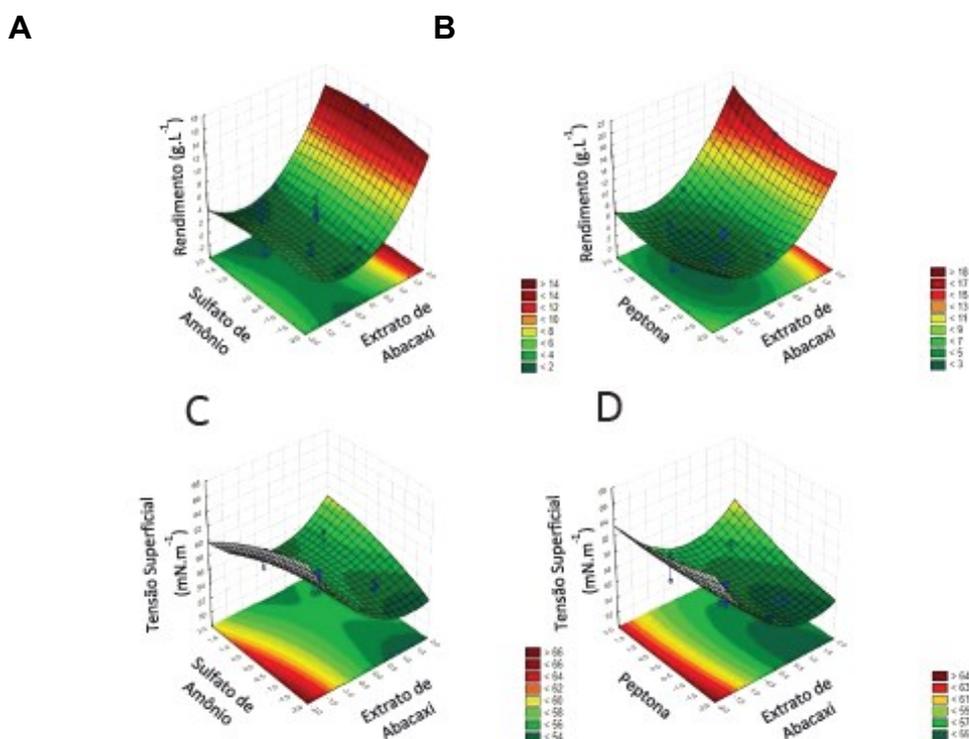


Figura 7: Gráfico do Pareto: **A** – Tensão Superficial (mN.m^{-1}); **B** – Índice de Emulsificação (%); **C** – Rendimento (g.L^{-1}).

Ao analisar os dados da figura 7, foi determinado que apenas o extrato de abacaxi interferiu significativamente nas respostas de tensão superficial e de rendimento. O teste de tensão superficial apresentou influência significativa apenas no termo linear do extrato de abacaxi, enquanto na avaliação do rendimento tanto os termos lineares quanto quadráticos apresentaram efeitos significativos.

Para os efeitos positivos, um aumento na concentração resulta em aumento da resposta, enquanto nos efeitos negativos o aumento da concentração resulta na redução da resposta. O efeito negativo do extrato de abacaxi ($-4,72407$) demonstra que o aumento na sua concentração ocasiona uma maior redução na tensão superficial. O efeito positivo do termo linear ($11,25683$) e quadrático ($7,53681$) determinam que o aumento na concentração do extrato de abacaxi resulta no aumento do rendimento, aumentando a produção.

O índice de emulsificação apresentou os melhores resultados nos testes 3, 17, e 6, sendo os valores obtidos de 63%, 57,5% e 56,5% respectivamente. Já o menor valor de tensão superficial ($46,25 \text{ mN.m}^{-1}$) e maior rendimento (17 g.L^{-1}) foram obtidos no teste 10, sendo utilizada a concentração de extrato de abacaxi de $18,40896 \text{ g.L}^{-1}$.



Fonte: SOUSA (2021)

Figura 8: Superfície de resposta: **A** – Rendimento (g.L^{-1}): Sulfato de amônio x Extrato de abacaxi; **B** – Rendimento (g.L^{-1}): Peptona x Extrato de abacaxi; **C** – Tensão Superficial (mN.m^{-1}): Sulfato de amônio x Peptona; **D** – Tensão Superficial (mN.m^{-1}): Peptona x Extrato de abacaxi.

A Figura 8 demonstra os resultados de superfície de resposta, podendo ser observado que a concentração do sulfato de amônio não apresentou efeito significativo sobre nenhuma variável e qualquer nível utilizado não interferiria no rendimento, portanto foi fixado o valor deste para experimentos futuros no ponto central (1 g.L^{-1}), visto que este composto é uma importante fonte de nitrogênio para o crescimento da biomassa.

Pode também ser observada a necessidade do aumento da concentração da variável do extrato de abacaxi, por isso determinou-se para experimentos futuros novas quantidades para os níveis desta variável: -1 (15 g.L^{-1}), 0 (20 g.L^{-1}), e +1 (25 g.L^{-1}).

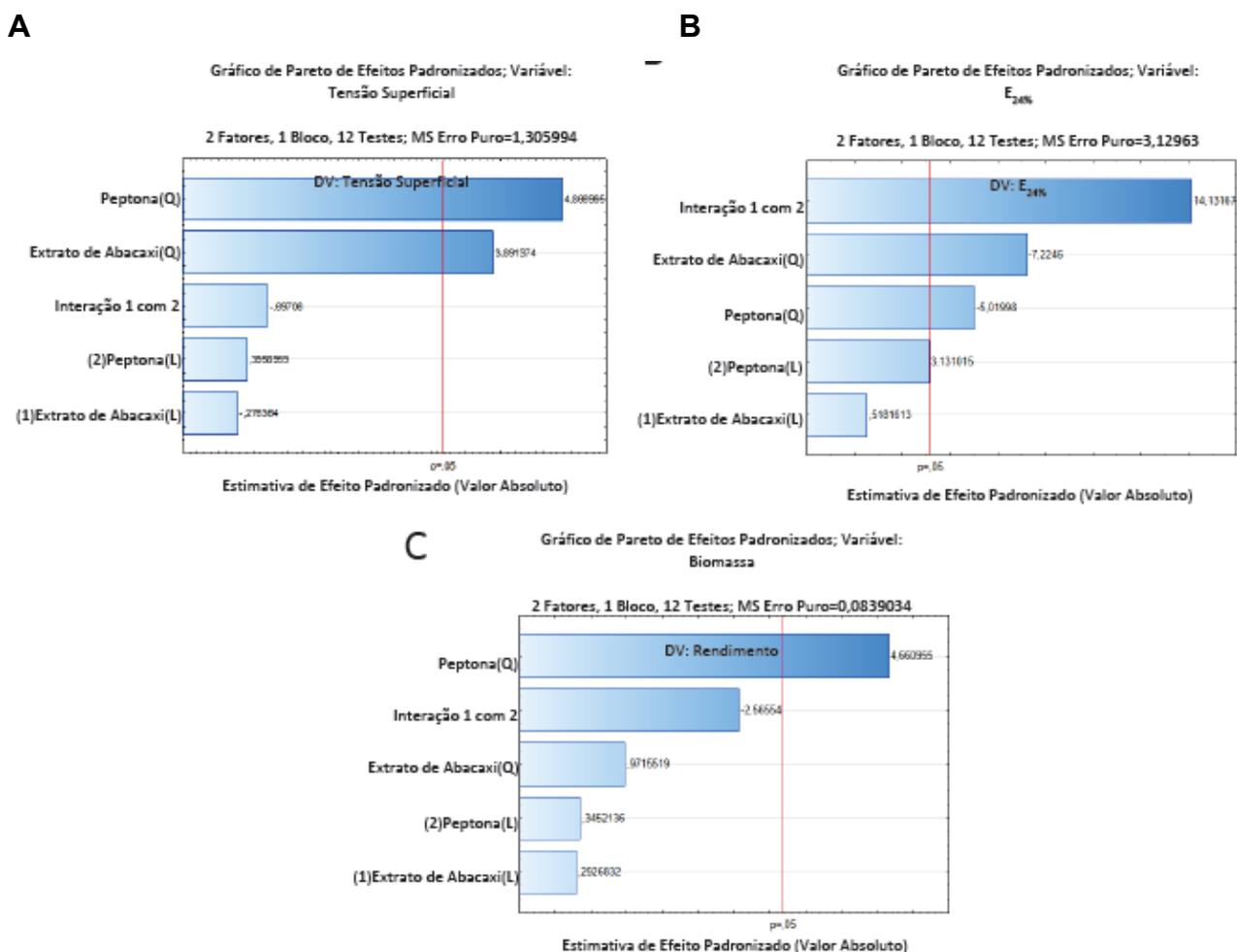
O aumento na concentração de peptona interferiu favoravelmente no rendimento, entretanto, o mesmo não ocorreu para o teste de tensão superficial, sendo assim, esta variável foi mantida com os mesmos valores de -1 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), 0 (1 g.L^{-1}), e +1 ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$).

Ficou constatado a partir destes testes que o aumento na concentração da fonte de carbono leva ao melhor resultado para a atividade do tensoativo e aumento da produtividade, dados estes semelhantes aos encontrados por Brumano e colaboradores (2017), em estudo utilizando *Aureobasidium pullulans* LB 83, no qual a influência da aeração e concentração da fonte de carbono na produção da biomolécula foram analisadas obtendo-se um melhor resultado ao se aumentar a fonte de carbono utilizada.

4.2.3 Segundo Planejamento Composto Central

Um segundo planejamento composto central foi realizado para determinar a influência do aumento da concentração do extrato de abacaxi nas variáveis dependentes tensão superficial, rendimento, índice de emulsificação, biomassa e consumo de açúcares totais. O ponto central do resíduo agroindustrial foi deslocado para 15 g.L^{-1} . A segunda variável independente, a peptona, permaneceu com as mesmas concentrações utilizadas para o primeiro planejamento composto central.

Os dados experimentais do segundo planejamento composto central foram utilizados para a construção dos gráficos do Pareto, representados na Figura 9.



Fonte: SOUSA (2021)

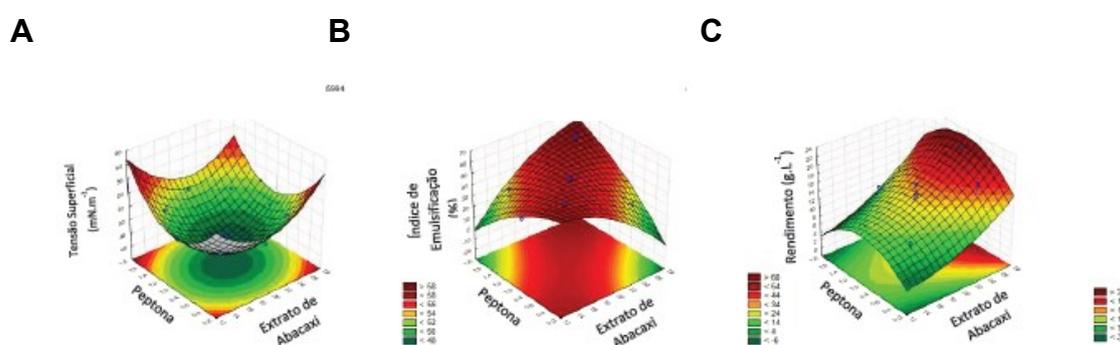
Figura 9: Gráfico do Pareto: **A** – Tensão Superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$); **B** – Índice de Emulsificação (%); **C** – Rendimento ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Neste segundo planejamento, tanto o extrato de abacaxi quanto a peptona influenciaram significativamente as respostas estudadas. A tensão superficial e o índice de emulsificação tiveram um aumento significativo nos termos quadráticos do extrato de abacaxi (3,89137 e -7,2246) e da peptona (4,86699 e -5,01998). Em relação ao rendimento, apenas o extrato de abacaxi obteve resultado significativo para o termo linear.

A partir dos resultados obtidos foi possível determinar que o aumento na concentração dos componentes do meio resultou em uma menor eficácia do

biossurfactante. O efeito positivo na tensão superficial indica que ao aumentar a concentração dos componentes a tensão superficial reduzirá menos. Observa-se um efeito reduzido na emulsificação quando aumentadas as concentrações de extrato de abacaxi e peptona.

Os maiores índices de emulsificação obtidos foram nos testes 1 (55%), 4 (63%) e 11 (51%). No caso da tensão superficial, os menores valores foram alcançados nos testes 9 (47mN.m^{-1}), 11 ($45,5\text{ mN.m}^{-1}$) e 12 ($47,5\text{ mN.m}^{-1}$). Os melhores resultados para os rendimentos foram obtidos nos testes 3 (17 g.L^{-1}), 6 (21 g.L^{-1}) e 10 ($16,5\text{ g.L}^{-1}$).



Fonte: SOUSA (2021)

Figura 10: Superfície de resposta: **A** – Tensão Superficial (mN.m^{-1}); **B** – Índice de Emulsificação (%); **C** – Rendimento (g.L^{-1}).

Os dados plotados no gráfico 10-A, demonstram que as concentrações do extrato do abacaxi e da peptona que apresentaram os melhores resultados para o teste de tensão superficial (área verde escuro) encontram-se nas faixas de 18 a 22 g.L^{-1} do extrato do abacaxi e 0,8 a 1,2 g.L^{-1} da peptona, sendo que concentrações acima ou abaixo dessas causam aumento na tensão superficial. O gráfico esboçado na Figura 10-B retrata a influência da concentração dos compostos sobre a propriedade de emulsão do biossurfactante.

As concentrações nas quais o extrato do abacaxi e a peptona obtiveram os melhores resultados foram nas mesmas faixas, isto é, ambos nas maiores concentrações ou nas concentrações mais baixas. Na Figura 10-C é possível perceber que o rendimento cresce à medida que a concentração do extrato de abacaxi aumenta. A concentração da peptona não influenciou de forma significativa a produção de biossurfactante, porém na faixa de 0,6 até 1,4 g.L^{-1} foram obtidos os melhores resultados com produção acima de 22 g.L^{-1} .

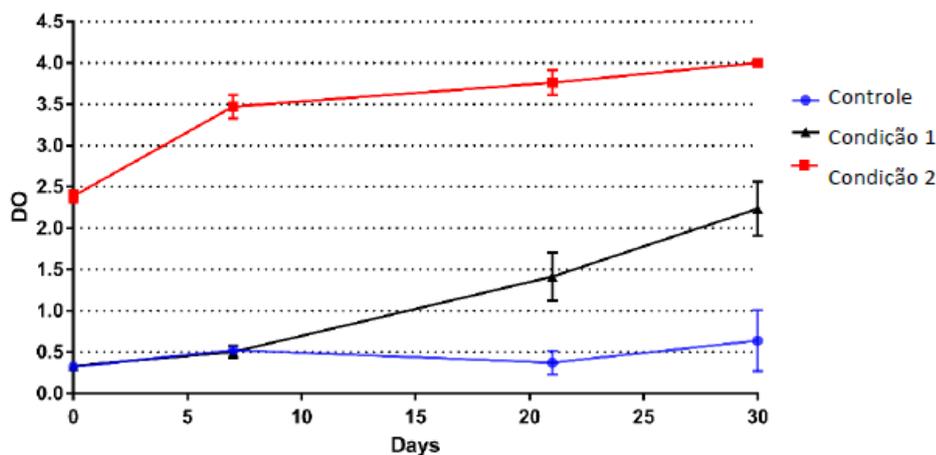
Dessa forma, considerou-se inviável utilizar concentrações do extrato do abacaxi acima de 25 g.L⁻¹, pois aumentaria a tensão superficial. Foram fixadas as concentrações do extrato do abacaxi em 25 g.L⁻¹ e o da peptona em 1,5 g.L⁻¹, já que nessas faixas mantêm-se as propriedades da biomolécula e uma alta produtividade.

Rufino e colaboradores (2008) obtiveram resultados que corroboram com os obtidos no presente trabalho. Visando melhorar as propriedades do agente emulsificante produzido pela *Candida lipolytica*, os autores utilizaram planejamento fatorial com as seguintes variáveis independentes: resíduo da refinaria de óleo de soja, ácido glutâmico e extrato de levedura. Após o primeiro planejamento fatorial notaram que apenas o resíduo e a sua interação com o ácido glutâmico apresentaram efeitos significativos. O extrato de levedura apresentou efeito positivo, significando que a menor concentração do extrato de levedura resultou em uma menor tensão superficial. Foram ainda realizados outros quatro planejamentos experimentais com o resíduo e o ácido glutâmico como as variáveis independentes.

Os pesquisadores concluíram que os melhores valores foram obtidos nos níveis mais baixos para o ácido glutâmico (fonte de nitrogênio) e níveis intermediários e altos para o resíduo (fonte de carbono). Com as condições otimizadas eles foram capazes de reduzir a tensão superficial do caldo de cultura de 50 mN.m⁻¹ para 25,29 mN.m⁻¹.

4.3 Aplicação Biotecnológica

A aplicação biotecnológica do biossurfactante em água doce estéril contaminada por óleo de motor foi realizada sob três condições: água esterilizada e hidrocarboneto; água esterilizada, levedura (*Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747) e hidrocarboneto; e água esterilizada, *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, biossurfactante na concentração micelar crítica (59,14 g.L⁻¹) e hidrocarboneto. Os experimentos foram conduzidos ao longo de 30 dias e as análises foram realizadas nos dias 1, 7, 21 e 30. As informações foram utilizadas gerando o gráfico abaixo.

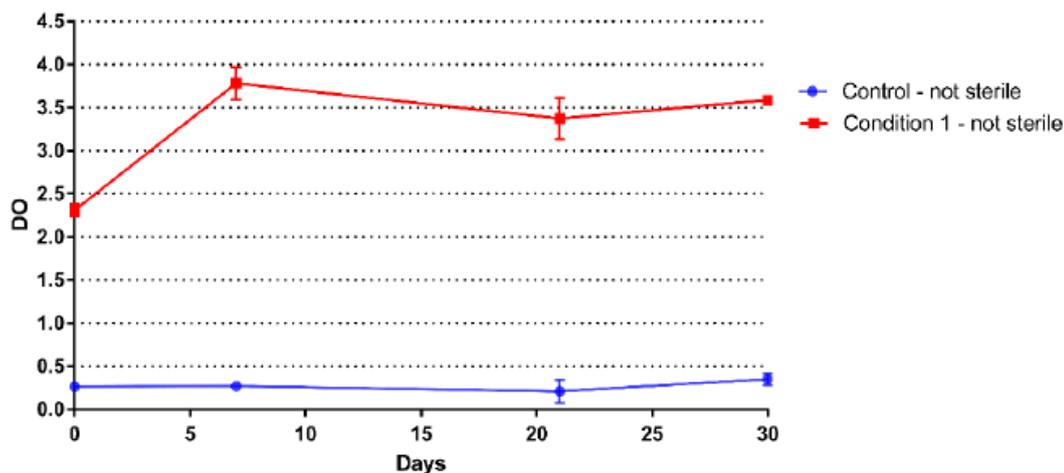


Fonte: SOUSA (2021)

Figura 11 - Aplicação biotecnológica: água doce contaminada por óleo de motor usado em condições estéreis. **Condições:** controle – água + hidrocarboneto; condição 1 – água + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747) + hidrocarboneto; condição 2 – água + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747) + hidrocarboneto + biossurfactante na concentração micelar crítica (59,14 g.L⁻¹).

A influência da presença do biossurfactante no crescimento da levedura pode ser observada na figura 11. Sem o biossurfactante, o crescimento se deu somente após 7 dias de fermentação, período necessário para a produção da biomolécula que possivelmente é necessária para biodisponibilizar os componentes do meio para o consumo do microrganismo. Entre o sétimo e trigésimo dia observou-se um crescimento da levedura com pico de aproximadamente 2,3 de densidade óptica. No experimento que se deu já na presença de biossurfactante, a levedura não necessitou produzir a biomolécula apresentando crescimento acelerado nos 7 primeiros dias do experimento e um pico de densidade óptica de 3,5.

Um segundo experimento de biorremediação utilizando água doce não esterilizada contaminada com óleo de motor foi realizado. Foram testadas duas condições: água não estéril e hidrocarboneto; e água não estéril, biossurfactante na concentração micelar crítica (59,14 g.L⁻¹) e hidrocarboneto. O experimento durou 30 dias, com amostras coletadas no primeiro, sétimo, 21° e 30° dia de experimento. Com os resultados plotou-se o gráfico abaixo.



Fonte: SOUSA (2021)

Figura 12: Aplicação biotecnológica: água doce contaminada por óleo de motor usado em condições não estéreis. **Condições:** controle – água + hidrocarboneto; condição 1 – água + hidrocarboneto + biossurfactante na concentração micelar crítica (59,14 g.L⁻¹).

Nota-se que a biomolécula atuou como bio estimulante tornando possível a utilização do hidrocarboneto como fonte de carbono para os microrganismos, confirmando a importância da presença do biossurfactante no meio, pois sem a sua adição não se observou crescimento microbiano durante os 30 dias de experimento, enquanto na sua presença houve um crescimento acelerado nos 7 primeiros dias.

Os dados obtidos reforçam a ideia de que os biossurfactantes por sua função de tornar hidrocarbonetos biodisponíveis para utilização pelos microrganismos.

Como em ambos os experimentos houve uma estabilização do crescimento após o sétimo dia, acredita-se que a quantidade de hidrocarbonetos utilizada não foi suficiente para sustentar o crescimento pelos 30 dias de experimento.

Batista e colaboradores (2010) estudaram a capacidade de remover contaminantes hidrofóbicos do biossurfactante produzido pela levedura *Candida tropicalis*. Neste estudo foram testadas duas amostras de areia (areia brasileira padrão e areia da praia) impregnadas com 10% de petróleo ou óleo de motor. Os resultados obtidos para a remoção de petróleo e óleo de motor adsorvido nas amostras de areia testadas foram de aproximadamente 80%. A maior porcentagem de remoção foi observada na areia da praia provavelmente como resultado do menor tamanho das partículas da areia brasileira padrão, pois permitiu uma alta adsorção do contaminante e remoção reduzida pelos biossurfactantes.

Santos e colaboradores (2017) analisaram a performance do biossurfactante produzido pela levedura *Candida lipolytica* na biodegradação do óleo de motor através da atividade de microrganismos indígenas da água do mar. Foi analisada a influência do biossurfactante em três concentrações diferentes: ½ CMD, CMD e 2CMD. Os dados obtidos demonstram aumento do crescimento de bactérias na presença da maior concentração da biomolécula, enquanto a solução de menor concentração estimulou o crescimento de fungos. Observaram também que o crescimento dos fungos indígenas foi pobre na ausência do biossurfactante.

5. Conclusão

As melhores fontes de carbono observadas nas condições deste experimento foram o extrato de abacaxi e extrato de levedura. A peptona e o sulfato de amônio podem ser destacados como melhores fontes de nitrogênio, podendo ser definido então um meio otimizado com 15 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 1,5 g.L⁻¹ de peptona e 1 g.L⁻¹ de sulfato de amônio em pH 8 com tempo de fermentação de 24h. A suplementação após 10 horas de fermentação aumenta a produção do biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* de 21,2 g.L⁻¹ para 36 g.L⁻¹.

A presença do biossurfactante influenciou positivamente o crescimento microbiano, confirmando a hipótese de que essa biomolécula auxilia no processo de biodisponibilidade de hidrocarbonetos em ambientes contaminados, sendo viável sua aplicação na biorremediação.

Dado o exposto, evidencia-se a necessidade do prosseguimento com os estudos voltados à produção de biossurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e de outras espécies de microrganismos capazes de produzir tais biomoléculas, visto os enormes potenciais biotecnológicos, industriais e ambientais destes compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, [S. l.], v. 223, n. 1–3, p. 143–151, 2008. DOI: 10.1016/j.desal.2007.01.198.
- ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 669–679, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.10.058.
- AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, [S. l.], v. 114, p. 324–333, 2014. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.09.022.
- ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. Initial steps of sophoroselipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 67–73, 1996. DOI: 10.1007/s002530050784.
- ALBUQUERQUE, T. L.; DA SILVA, I. J.; DE MACEDO, G. R.; ROCHA, M. V. P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochemistry*, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 1779–1789, 2014. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.07.010.
- ALMEIDA, D. G.; DA SILVA, R. C. F. S.; BRASILEIRO, P. P. F.; DE LUNA, J. M.; DA SILVA, M. G. C.; RUFINO, R. D.; COSTA, A. F. S.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Application of a biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP 0996 produced in low-cost substrates for hydrophobic contaminants removal. *Chemical Engineering Transactions*, [S. l.], v. 64, p. 541–546, 2018. DOI: 10.3303/CET1864091.
- AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M. J.; COUTINHO, J. A. P. Biosurfactants from yeasts: Characteristics, production and application. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, [S. l.], v. 672, p. 236–249, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_18.
- ARAÚJO, H. W. C.; ANDRADE, R. F. S.; MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; RUBIO78 RIBEAUX, D.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microbial Cell Factories*, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 2, 2019. DOI: 10.1186/s12934-018-1046-0.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 53, n. 5, p. 495–508, 2000. DOI: 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*, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 62–67, 2012. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.09.009.

BARROS, F. F. C.; DE QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 409–414, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200031.

BATISTA, R. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; DE SOUZA, J. E. G.; SARUBBO, L. A. Effect of Medium Components on the Production of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* Applied to the Removal of Hydrophobic Contaminants in Soil. *Water Environment Research*, [S. l.], v. 82, n. 5, p. 418–425, 2010. DOI: 10.2175/106143009X12487095237279.

BHADURY, P.; MOHAMMAD, B. T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 325–337, 2006. DOI: 10.1007/s10295-005-0070-3.

BHAIRI, S. M.; MOHAN, C.. Detergentes - A Guide to the properties and uses of Detergents in biology and biochemistry. 1. ed. San Diego: Calbiochem, 2001.

BHARALI, P.; DAS, S.; KONWAR, B. K.; THAKUR, A. J. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. *International 79 Biodeterioration and Biodegradation*, [S. l.], v. 65, n. 5, p. 682–690, 2011. DOI: 10.1016/j.ibiod.2011.04.001.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, [S. l.], v. 152, n. 1–2, p. 41–52, 1999. DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00684-0.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. *Statistics for Experimenters: Na Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. 1. ed. New York: John Wiley and Sons, 1978.

BRANCO, L. S. C.; ALMEIDA, M. M. T.; CAETANO, T. M.; PINTO, G. A. S.; AZEREDO, H. M. C. Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa por. *In: ANAIS DO XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA.*, XVIII, 2010, Foz do Iguaçu. Anais [...]. Foz do Iguaçu p. 6926–6934.

BRUMANO, L. P.; ANTUNES, F. A. F.; SOUTO, S. G.; DOS SANTOS, J. C.; VENUS, J.; SCHNEIDER, R.; DA SILVA, S. S. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. *Bioresource Technology*, [S. l.], v. 243, p. 264–272, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.088.

BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; GÖTTLICH, E.; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI, F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. *Marine Genomics*, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 43–50, 2009. DOI: 10.1016/j.margen.2009.04.002.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. B. Statistical Design - Chemometrics. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. FEMS Microbiology Letters, [S. l.], v. 244, n. 2, p. 229–234, 2005. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.01.043.

CAMARGO, F. P.; DE MENEZES, A. J.; TONELLO, P. S.; DOS SANTOS, A. C. A.; DUARTE, I. C. S. Characterization of biosurfactant from yeast using residual soybean oil under acidic conditions and their use in metal removal processes. FEMS Microbiology Letters, [S. l.], v. 365, n. 10, 2018. DOI: 10.1093/femsle/fny098.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S.; KAUR, J.; MEHTA, S. K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. Advances in Experimental Medicine and Biology, [S. l.], v. 672, p. 261–280, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_20. CARNEIRO, C. V. G. C.; E SILVA, F. C. P.; ALMEIDA, J. R. M. Xylitol production: Identification and comparison of new producing yeasts. Microorganisms, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 1–15, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7110484.

COELHO, A. R.; NOBREGA, G. M. A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.; HARADA, K.; HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. Semina: Ciências Agrárias, [S. l.], v. 32, n. Suplp, p. 1879–1892, 2011. DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32Suplp1879.

D'AMICO, S.; COLLINS, T.; MARX, J. C.; FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic microorganisms: Challenges for life. EMBO Reports, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 385–389, 2006. DOI: 10.1038/sj.embor.7400662. 81

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. Journal of Applied Microbiology, [S. l.], v. 104, n. 6, p. 1675–1684, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. Bioresource Technology, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 1015–1019, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.07.015.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 246–253, 2010. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.04.002.

FREITAS, B. G.; BRITO, J. G. M.; BRASILEIRO, P. P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. Frontiers in Microbiology, [S. l.], v. 7, n. OCT, p. 1–9, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01646.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. Naturwissenschaften, [S. l.], v. 89, n. 11, p. 483–496, 2002. DOI: 10.1007/s00114-002-0372-5.

GAN, H. M.; THOMAS, B. N.; CAVANAUGH, N. T.; MORALES, G. H.; MAYERS, A. N.; SAVKA, M. A.; HUDSON, A. O. Whole genome sequencing of *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the chewing stick (*Distemonanthus benthamianus*): Insights into *Rhodotorula phylogeny*, mitogenome dynamics and carotenoid biosynthesis. *PeerJ, [S. l.]*, v. 2017, n. 11, 2017. DOI: 10.7717/peerj.4030.

GESHEVA, V.; STACKEBRANDT, E.; VASILEVA-TONKOVA, E. Biosurfactant production by halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, Antarctica. *Current Microbiology, [S. l.]*, v. 61, n. 2, p. 112–117, 2010. DOI: 10.1007/s00284-010-9584-7.

GILBERT, J. A.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R.; LAYBOURN-PARRY, J. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology, [S. l.]*, v. 150, n. 1, p. 171–180, 2004. DOI: 10.1099/mic.0.26610-0.

HE, N.; WU, T.; JIANG, J.; LONG, X.; SHAO, B.; MENG, Q. Toward high-efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, [S. l.]*, v. 157, p. 317–324, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.06.007.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochemistry, [S. l.]*, v. 47, n. 8, p. 1207–1219, 2012. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.04.018.83

HUA, Z.; CHEN, J.; LUN, S.; WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Research, [S. l.]*, v. 37, n. 17, p. 4143–4150, 2003. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00380-4.

ILORI, M. O.; AMUND, D. I. Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. *Zeitschrift für Naturforschung – Section C Journal of Biosciences, [S. l.]*, v. 56, n. 7–8, p. 547–552, 2001. DOI: 10.1515/znc-2001-7- 812.

JEZIERSKA, S.; CLAUS, S.; VAN BOGAERT, I. Yeast glycolipid biosurfactants. *FEBS Letters, [S. l.]*, v. 592, n. 8, p. 1312–1329, 2018. DOI: 10.1002/1873-3468.12888.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety, [S. l.]*, v. 184, n. June, p. 109607, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109607.

MARGESIN, R.; FELL, J. W. *Mrakiella cryoconiti* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, anamorphic, basidiomycetous yeast from alpine and arctic habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, [S. l.]*, v. 58, n. 12, p. 2977–2982, 2008. DOI: 10.1099/ijs.0.2008/000836-0.

MELETTI, L. M. M.; RUGGIERO, A. C. S. C.; RUGGIERO, C. Avanços na fruticultura tropical no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 073–080, 2011. DOI: 10.1590/S0100-29452011005000042.

MENESES, D. P.; GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, F.; GONÇALVES, L. R. B.; RODRIGUES, L. R.; RODRIGUES, S. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. Microbiological Research, [S. l.], v. 204, p. 40–47, 2017. DOI: 10.1016/j.micres.2017.07.004.

MESQUITA, A. C. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. 2004. Tese Doutorado em Ciências em Engenharia Civil - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030. MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. Letters in Applied Microbiology, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 281–288, 2009. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02485.x.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Engineering Geology, [S. l.], v. 60, n. 1–4, p. 371–380, 2001. DOI: 10.1016/S0013-7952(00)00117-4.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. Environmental Pollution, [S. l.], v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.06.009.

PAIVA, F. F. A.; GARRUTTI, D. S.; NETO, R. M. S. Aproveitamento roveitamento Industrial do caju. Embrapa-CNPAT/SEBRAE/CE, [S. l.], p. 1–88, 2000. PARK, P. K.; CHO, D. H.; KIM, E. Y.; CHU, K. H. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. World Journal of Microbiology and Biotechnology, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 429–434, 2005. DOI: 10.1007/s11274-004-1891-3.

PURWASENA, I. A.; ASTUTI, D. I.; SYUKRON, M.; AMANIYAH, M.; SUGAI, Y. Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2019. DOI: 10.1016/j.petrol.2019.106383.

RATNAM, B. V. V.; SUBBA RAO, S.; MENDU, D. R.; NARASIMHA RAO, M.; AYYANNA, C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from palmyra jaggery using response surface methodology. World Journal of Microbiology and Biotechnology, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 399–404, 2005. DOI: 10.1007/s11274-004-2461-4.

RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, [S. l.], v. 8, n. May, p. 1–13, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00434.

RIVARDO, F.; TURNER, R. J.; ALLEGRONE, G.; CERI, H.; MARTINOTTI, M. G. Antiadhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 83, n. 3, p. 541–553, 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-1987-7.

ROSA, M. M.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* Against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 1491–1502, 2010. DOI: 10.1007/s11274-010-0324-8.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; NETO, B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 35, n. 8, p. 907–914, 2008. DOI: 10.1007/s10295-008-0364-3.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, [S. l.], v. 6, n. 1–3, p. 127–141, 2007. DOI: 10.1007/s11157-006-9107-y.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants : Fermentation , Applications , Current. [S. l.], v. 2011, p. 1–42, 2011.

SANCHES, M. A.; LUZEIRO, I. G.; CORTEZ, A. C. A.; DE SOUZA, E. S.; ALBUQUERQUE, P. M.; CHOPRA, H. K.; DE SOUZA, J. V. B. Production of Biosurfactants by Ascomycetes. *International Journal of Microbiology*, [S. l.], v. 2021, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1155/2021/6669263.

SANTOS, D. K. F.; MEIRA, H. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity 88 for application as a bioremediation agent. *Process Biochemistry*, [S. l.], v. 54, p. 20–27, 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.12.020.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016. DOI: 10.3390/ijms17030401.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology*, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 68–73, 2007. DOI: 10.1007/s00284-006-0412-z.

SCHELL, W. A. New Aspects of Emerging Fungal Pathogens: A Multifaceted Challenge. *Clinics in Laboratory Medicine*, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 365–387, 1995. DOI: 10.1016/S0272-2712(18)30336-6.

SEN, S.; BORAH, S. N.; BORA, A.; DEKA, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microbial Cell Factories*, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 95, 2017. DOI: 10.1186/s12934-017-0711-z.

SHAH, N.; NIKAM, R.; GAIKWAD, S.; SAPRE, V.; KAUR, J. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. Indian Journal of Microbiology Research, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 5, 2016. DOI: 10.5958/2394-5478.2016.00002.9.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. Biotechnology Reports, [S. l.], v. 11, p. 27–35, 2016. DOI: 10.1016/j.btre.2016.05.001.

SHARMA, P.; SANGWAN, S.; KAUR, H. Process parameters for biosurfactant production using yeast *Meyerozyma guilliermondii* YK32. Environmental Monitoring and Assessment, [S. l.], v. 191, n. 9, 2019. DOI: 10.1007/s10661-019-7665-z.

SHIVAJI, S.; PRAKASH, J. S. S. How do bacteria sense and respond to low temperature? Archives of Microbiology, [S. l.], v. 192, n. 2, p. 85–95, 2010. DOI: 10.1007/s00203-009-0539-y.

SILVA, E. J.; SILVA, N. M. P. R.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SILVA, R. O.; SARUBBO, L. A. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, [S. l.], v. 117, p. 36–41, 2014. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.012.

SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 174–183, 2010. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.050.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. Journal of Applied Microbiology, [S. l.], v. 126, n. 1, p. 2–13, 2019. DOI: 10.1111/jam.14057.

SOARES, P. A. G.; VAZ, A. F. M.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, A.; DA CUNHA, M. G. C. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. Separation and Purification Technology, [S. l.], v. 98, p. 389–395, 2012. DOI: 10.1016/j.seppur.2012.06.042.

SOUSA, T. G. C. Produção de biosurfactante pela levedura da antártica *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 : desenvolvimento de um meio de cultura ótimo e aplicação biotecnológica – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

SOUZA, E. C.; VESSONI-PENNA, T. C.; OLIVEIRA, R. P. S. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. International Biodeterioration & Biodegradation, [S. l.], v. 89, p. 88–94, 2014. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.01.007.

SOUZA, K. S. T.; GUDIÑA, E. J.; AZEVEDO, Z.; DE FREITAS, V.; SCHWAN, R. F.; RODRIGUES, L. R.; DIAS, D. R.; TEIXEIRA, J. A. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, [S. l.], v. 154, p. 373–382, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.041.

STELLER, S.; VATER, J. Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, [S. l.], v. 737, n. 1–2, p. 267–275, 2000. DOI: 10.1016/S0378-4347(99)00481-8.

WANDERLEY NETO, A. O.; DA SILVA, V. L.; RODRIGUES, D. V.; RIBEIRO, L. S.; DA SILVA, D. N. N.; FREITAS, J. C. O. A novel oil-in-water microemulsion as a cementation flushing fluid for removing non-aqueous filter cake. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, [S. l.], v. 184, p. 106536, 2020. DOI: 10.1016/j.petrol.2019.106536.

WIRTH, F.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, [S. l.], v. 2012, p. 1–7, 2012. DOI: 10.1155/2012/465717.

YERGEAU, E.; KOWALCHUK, G. A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. *Environmental Microbiology*, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 2223–2235, 2008. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01644.x.

YIN, H.; QIANG, J.; JIA, Y.; YE, J.; PENG, H.; QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oilcontaining wastewater. *Process Biochemistry*, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 302–308, 2009. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.11.003.

ZUCCONI, L.; CANINI, F.; TEMPORITI, M. E.; TOSI, S. Extracellular enzymes and bioactive compounds from antarctic terrestrial fungi for bioprospecting. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, [S. l.], v. 17, n. 18, p. 1–31, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17186459.