

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR
NOVAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Starmerella***

YASMIM SENDEN DOS SANTOS

BELO HORIZONTE

2022

YASMIM SENDEN DOS SANTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR
NOVAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Starmerella***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Co-orientadora: Dra. Fernanda Palladino Pedroso

Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos.
Departamento de Microbiologia/ICB,
Universidade Federal de Minas Gerais.

BELO HORIZONTE

2022

043

Santos, Yasmim Senden dos.

Produção e caracterização de biossurfactantes por novas espécies de leveduras do gênero *Starmerella* [manuscrito] / Yasmim Senden dos Santos. – 2022.

80 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa. Co-orientadora: Dra. Fernanda Palladino Pedroso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Tensoativos. 3. Leveduras. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Pedroso, Fernanda Palladino. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **YASMIM SENDEN DOS SANTOS**

Nº REGISTRO: **2020658903**

Às 15:30 horas do dia **10 de MARÇO de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Fátima de Cássia Oliveira Gomes (Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais), Beatriz Martins Borelli (FAMINAS) e o Prof. Carlos Augusto Rosa – Orientador, para julgar o trabalho final "**Produção e Caracterização de Biossurfactantes por Novas Espécies de Leveduras do Gênero *Starmarella***", da aluna **Yasmim Senden dos Santos**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, o Prof. Carlos Augusto Rosa - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 10 de março de 2022

Membros da banca:

Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Dra. Beatriz Martins Borelli

De acordo:

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

(Orientador)

Prof. Daniel de Assis Santos
(Subcoordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 11/03/2022, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Rosa, Coordenador(a)**, em 11/03/2022, às 13:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Martins Borelli, Usuário Externo**, em 11/03/2022, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fatima de Cassia Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 13/03/2022, às 19:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1303234** e o código CRC **43316E53**.

Agradecimentos

A Deus, por me proporcionar força nos momentos em que mais precisei. Por me ensinar sobre a importância da perseverança para alcançar os meus objetivos e sonhos. E principalmente, por colocar pessoas iluminadas em minha vida.

Ao meu orientador prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua orientação. Agradeço pela confiança.

A minha co-orientadora Dra. Fernanda Palladino Pedroso, a quem apelidei carinhosamente de anjo. Sua presença foi essencial para a realização desse trabalho. Agradeço por tudo que me ensinou, pela sua companhia, amizade, acolhimento em momentos difíceis e por me guiar durante toda essa jornada. Sua vocação científica é incrível. Foi uma honra poder aprender tanto com você. Muito obrigada.

Ao meu marido Bruno dos Reis Diniz, por todo o amor, carinho, cuidado e compreensão durante esses 2 anos. Seu apoio foi essencial, muito obrigada.

Aos meus pais Rossana e João Luiz, que sempre me incentivaram nos estudos e colocaram a educação como um pilar em minha vida. Gostaria de agradecer por me apoiarem incondicionalmente e por todo o amor. A minha avó Marly, que sempre teve uma palavra de conforto, incentivo e muita sabedoria. A Silvana, por todo o amor e alegria. A minha irmã Jade, meu cunhado Juliano e minha sobrinha Alice, por todo o amor e carinho acompanhado de bons conselhos. Aos meus sogros Dalva e Gilberto, pessoas especiais que sempre trouxeram aconchego em minha vida.

Ao prof. Luiz Rosa, profa. Susana Johann e todos os professores do Departamento de Microbiologia. A todos os meus colegas de laboratório, em especial Ana Raquel, Thais, Gisele, Flávia, Debora, Láuren e Amanda.

Aos funcionários do colegiado, Debora e Tiago, sempre prestativos.

As minhas amigas queridas Iara França, Amanda Barreto e Fernanda Bianchet, por toda uma vida de amizade verdadeira. Aos meus amigos Rodrigo, Hermano e Dennys, pela amizade sincera, carinho e acolhimento.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela bolsa concedida.

Por fim, especialmente à Banca Examinadora, composta pela profa. Dra. Beatriz Martins Borelli, profa. Dra. Fatima de Cassia Oliveira Gomes e Dra. Graciéle Cunha Alves de Menezes, muito obrigada por terem aceitado meu convite.

A presente dissertação de mestrado não poderia ter sido concluída sem a presença de todos vocês. Obrigada.

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas tensoativas produzidas por microrganismos, com potencial para a substituição dos surfactantes derivados do petróleo, que geram prejuízos ecológicos significativos para o meio ambiente. Os biossurfactantes têm vantagens em relação aos surfactantes sintéticos por serem biodegradáveis, menos tóxicos e mais estáveis em condições variáveis de temperatura, pH e salinidade. Dentre os vários tipos existentes de biossurfactantes, os soforolipídios estão entre os mais conhecidos e estudados, sendo pertencentes à classe dos glicolipídios. Um obstáculo enfrentado na produção de biossurfactantes é que os custos de produção ainda são altos se comparados com os surfactantes sintéticos, uma vez que os substratos utilizados possuem alto custo e os métodos de recuperação ainda são pouco eficientes. Diante disso, o sucesso da produção dos biossurfactantes em escala industrial depende do uso de substratos alternativos e de baixo custo, bem como da escolha de microrganismos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar e caracterizar a produção de soforolipídios a partir de novas espécies de leveduras do gênero *Starmerella* utilizando substratos de baixo custo. Para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionadas 10 novas espécies de leveduras do gênero *Starmerella* isoladas a partir de ecossistemas brasileiros e do Equador. Essas leveduras foram submetidas a um processo de triagem, utilizando o teste do Índice de Emulsificação (E_{24}) como critério de seleção das melhores produtoras. As leveduras com os maiores índices de emulsificação foram selecionadas para a etapa seguinte de fermentação, utilizando um meio contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Para confirmar a produção de glicolipídios foi realizado o teste do ágar-azul e os biossurfactantes produzidos foram submetidos a testes para avaliar a estabilidade em diversas condições de pH, salinidade e temperatura. Além disso, a propriedade tensoativa também foi analisada em um tensiômetro digital por meio do método de pressão máxima de bolha, com valores expressos em mN/M. A extração dos soforolipídios produzidos foi realizada com acetato de etila (1:1) e os valores expressos em g/L. A partir dos conjuntos de dados obtidos, foi identificado que os isolados TMY12.2 e TOC03_80.2 analisados no presente estudo foram capazes de produzir soforolipídios com excelentes propriedades emulsificantes, estáveis nos valores de pH entre 6-10 e nas temperaturas 0°C, 25°C e 40°C. Com relação à concentração de NaCl, o isolado TMY12.2 obteve emulsões estáveis nas concentrações de 2% e 6% e o isolado TOC03_80.2 na concentração de 2%, possuindo portanto, grande potencial para aplicações biotecnológicas. Palavras-chave: Biossurfactantes. Leveduras. Fermentação. Soforolipídios.

ABSTRACT

Biosurfactants are surface-active molecules produced by microorganisms, with the potential to replace petroleum-derived surfactants, which generate significant ecological damage to the environment. Biosurfactants have advantages over synthetic surfactants as they are biodegradable, less toxic and more stable under varying conditions of temperature, pH and salinity. Among the various existing types of biosurfactants, sophorolipids are among the best known and studied, belonging to the class of glycolipids. An obstacle faced in the production of biosurfactants is that the production costs are still high compared to synthetic surfactants, since the substrates used are expensive and the recovery methods are still inefficient. In view of this, the success of producing biosurfactants on an industrial scale depends on the use of alternative and low-cost substrates, as well as the choice of microorganisms. Therefore, the present study aimed to evaluate and characterize the production of sophorolipids from new species of yeasts of the genus *Starmerella* using low-cost substrates. For the development of this work, 10 new species of yeasts of the genus *Starmerella* isolated from Brazilian and Ecuadorian ecosystems were selected. These yeasts were submitted to a screening process, using the Emulsification Index test (E24) as a criterion for selecting the best producers. The yeasts with the highest emulsification indexes were selected for the next fermentation step, using a medium containing 50g/L of glucose, 50g/L of glycerol and 40g/L of rice bran. To confirm the production of glycolipids, the blue agar test was performed and the biosurfactants produced were subjected to tests to evaluate the stability in different conditions of pH, salinity and temperature. In addition, the surfactant property was also analyzed in a digital tensiometer using the maximum bubble pressure method, with values expressed in mN/M. The extraction of the produced sophorolipids was carried out with ethyl acetate (1:1) and the values expressed in g/L. From the data sets obtained, it was identified that the isolates TMY12.2 and TOC03_80.2 analyzed in the present study were able to produce sophorolipids with excellent emulsifying properties, stable at pH values between 6-10 and at temperatures of 0°C, 25°C and 40°C. Regarding the concentration of NaCl, the isolate TMY12.2 obtained stable emulsions at concentrations of 2% and 6% and the isolate TOC03_80.2 at a concentration of 2%, thus having great potential for biotechnological applications.

Keywords: Biosurfactants. Yeasts. Fermentation. Sophorolipids.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da estrutura molecular do tensoativo aniônico sintético dodecil sulfato de sódio (SDS), exemplificando o modelo “cabeça” polar e “cauda” apolar. Fonte: Adaptado de ARAÚJO (2016).....17
- Figura 2.** Esquema representativo da classificação dos surfactantes, com um exemplo de cada tipo. Eles podem ser não-iônicos (A); aniônicos (B); anfóteros (C) e catiônicos (D). Fonte: Adaptado de NAKAMA (2017).18
- Figura 3.** Representação esquemática de um equilíbrio dinâmico entre os monômeros dispersos na solução, em micelas e monômeros na interface ar-água. Fonte: Adaptado de NESMERÁK; NEMCOVÁ (2006).....19
- Figura 4.** Esquema ilustrando a formação de micelas. Fonte: Adaptado de VIEIRA et al. (2021).....20
- Figura 5.** Representação molecular de duas formas de soforolipídios. A) Forma lactônica e B) Forma ácida. Fonte: KONISHI et al. (2015).....26
- Figura 6.** Via biossintética de soforolipídios. (1) citocromo monooxigenase P450, (2) álcool-desidrogenase, (3) aldeído-desidrogenase, (4) lipase, (5) citocromo monooxigenase P450, (6) glicosiltransferase I, (7) glicosiltransferase II, (8) lactonesterase, (9) acetiltransferase. Fonte: VAN BOGAERT; SOETAERT (2011).....29
- Figura 7.** Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à *Starmerella* sp. 1, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.44
- Figura 8.** Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* sp. 2, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.44
- Figura 9.** Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* 3, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.45
- Figura 10.** Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* sp. 4, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.45
- Figura 11.** Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* sp. 5, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.45

Figura 12. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie <i>Starmerella</i> sp. 6, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.....	46
Figura 13. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie <i>Starmerella</i> sp. 7, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.....	46
Figura 14. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) da levedura pertencente à espécie <i>Starmerella</i> sp. 8, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.....	47
Figura 15. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) da levedura pertencente à espécie <i>Starmerella</i> sp. 9, com de meio de cultura contendo 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.....	47
Figura 16. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) da levedura pertencente à espécie <i>Starmerella</i> sp. 10, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.....	47
Figura 17. Determinação dos índices de emulsificação E_{24} em meio de cultivo contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) <i>Starmerella</i> sp. 7 TMY12.2, (B) <i>Starmerella</i> sp. 2 TOC03_80.2, (C) <i>Starmerella</i> sp. 6 UFMG-CM-Y6044 e (D) <i>Starmerella</i> sp. 6 UFMG-CM-Y6045.	50
Figura 18. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) dos isolados <i>Starmerella</i> sp. 7 TMY12.2, <i>Starmerella</i> sp. 2 TOC03_80.2 e <i>Starmerella</i> sp. 6 UFMG-CM-Y6044 e UFMG-CM-Y6045 cultivados em meio de cultura contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz.....	51
Figura 19. Teste do ágar azul utilizando CTAB e azul de metileno para determinação da produção de glicolipídios extracelulares pelos isolados (A) <i>Starmerella</i> sp. 7 TMY12.2, (B) <i>Starmerella</i> sp. 2 TOC03_80.2, (C) <i>Starmerella</i> sp. 6 UFMG-CM-Y6044 e (D) <i>Starmerella</i> sp. 6 UFMG-CM-Y6045. As setas indicam o halo azul escuro, confirmando a positividade no teste.....	53
Figura 20. Determinação da concentração de soforolipídios após 96h de fermentação em um meio contendo: 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) <i>Starmerella</i> sp. 7 TMY12.2, (B) <i>Starmerella</i> sp. 2 TOC03_80.2, (C) <i>Starmerella</i> sp. 6 UFMG-CM-Y6044 e (D) <i>Starmerella</i> sp. 6 UFMG-CM-Y6045.....	54
Figura 21. Avaliação da influência da variação de pH (2,0; 6,0; 10,0; 12,0) na estabilidade do índice de emulsificação E_{24} a partir do meio de cultivo contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) <i>Starmerella</i> sp. 7 TMY12.2 e (B) <i>Starmerella</i> sp. 2 TOC03_80.2.....	56

Figura 22. Avaliação da influência da temperatura na estabilidade do índice de emulsificação E₂₄ a partir do meio de cultivo contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) *Starmerella* sp. 7 TMY12.2 e (B) *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2.....58

Figura 23. Avaliação da concentração de NaCl (2%, 6% e 10%) na estabilidade do índice de emulsificação E₂₄ a partir do meio de cultivo contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) *Starmerella* sp. 7 TMY12.2 e (B) *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores.	23
Tabela 2. Principais leveduras produtoras de biossurfactantes.....	24
Tabela 3. Potenciais aplicações dos soforolipídios.....	27
Tabela 4. Alguns substratos utilizados para a produção de biossurfactantes.	32
Tabela 5. Espécies de leveduras do gênero <i>Starmarella</i> selecionadas para o presente trabalho.	34
Tabela 6. Dados sobre a concentração celular, o consumo de substrato, a tensão superficial e os índices de emulsificação dos 19 isolados de <i>Starmarella</i> analisados inicialmente.....	42
Tabela 7. Dados sobre a concentração celular, o consumo de substrato, a tensão superficial e os índices de emulsificação dos isolados de <i>Starmarella</i> selecionados a partir da triagem inicial.	49

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E UNIDADES DE MEDIDA

°C - Graus Celsius

µm - Micrômetro

ATCC - *American Type Culture Collection*

atm - Pressão atmosférica

bolha/seg - Bolha por segundo

CMC - Concentração micelar crítica

CTAB - Brometo de Cetil Trimetilamônio

DO600nm - Densidade óptica a 600 nanômetros

E₂₄ – Índice de Emulsificação após 24h

E₄₈ – Índice de Emulsificação após 48h

FDA -*American Food and Drug Administration*

g/L - Gramas por litro

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

L - Litro

M/v - Massa por volume

mL - Mililitro

mL/min - Mililitros por minuto

mm - Milímetro

mN/M – Milinewton por metro

psi - Medida de pressão - *Pound force per Square Inch*

rpm - Rotações por minuto

µL - Microlitro(s)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Surfactantes	17
2.2 Biossurfactantes	21
2.2.1 Biossurfactantes produzidos por leveduras	23
2.2.2 Bioemulsificantes produzidos por leveduras	25
2.2.3 Soforolípídios produzidos por leveduras	26
2.3 O gênero <i>Starmerella</i>	30
2.4 Uso de substratos renováveis e de baixo custo na produção de biossurfactantes	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Seleção de leveduras	34
4.2 Curva de calibração: Peso seco x Densidade Óptica	35
4.3 Seleção dos isolados de <i>Starmerella</i> produtoras de biossurfactantes	35
4.4 Produção de biossurfactantes a partir da utilização da glicose, do glicerol e do farelo de arroz	36
4.4.1 Condições de cultivo inicial	36
4.4.2 Preparação do extrato de farelo de arroz	36
4.4.3 Condições de cultivo para a fermentação	36
4.5 Métodos Analíticos	37
4.5.1 Determinação do Índice de Emsulfisificação (E ₂₄)	37
4.5.2 Determinação das concentrações de glicose e glicerol	38
4.5.3 Determinação da tensão superficial	38
4.6 Caracterização dos biossurfactantes produzidos	38
4.6.1 Teste do ágar azul: CTAB-azul de metileno	38
4.6.2 Extração e quantificação dos sofrorolípídios produzidos	39
4.6.3 Avaliação de estabilidade dos sofrorolípídios produzidos	39
4.6.3.1 Efeito do pH	39
4.6.3.2 Efeito da temperatura	39

4.6.3.3 Efeito da salinidade	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Seleção das leveduras	41
5.2 Produção de biossurfactantes a partir das leveduras selecionadas, utilizando glicose, glicerol e farelo de arroz como substrato	49
5.3 Caracterização dos biossurfactantes produzidos pelos isolados selecionadas de <i>Starmerella</i>	53
5.3.1. Teste do ágar azul utilizando CTAB e azul de metileno	53
5.3.2. Extração e quantificação dos soforolipídios produzidos	54
5.3.3. Estabilidade das emulsões em diferentes condições de pH, temperatura e salinidade	56
5.3.3.1. Avaliação da influência do pH	56
5.3.3.2. Avaliação da influência da temperatura	57
5.3.3.3. Avaliação da influência da concentração de NaCl	58
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os surfactantes constituem uma classe de compostos químicos amplamente utilizados em várias aplicações, funcionando como detergentes, emulsificantes, agentes espumantes e umectantes. Tais compostos estão presentes em produtos industriais e em diversos bens de consumo ao redor do mundo. Esses bens de consumo vão desde produtos de limpeza, higiene pessoal, alimentos e cosméticos até tintas e medicamentos, além de serem componentes imprescindíveis em processos industriais, como na recuperação de óleo. Em termos de volume de produção, eles ocupam um lugar de destaque entre os produtos químicos industriais. A produção global de surfactantes foi relatada em 7 milhões de toneladas anuais há 20 anos, aumentando para 12,5 milhões de toneladas em 2006 e 14,1 milhões em 2017, com uma previsão de crescimento de 18% até 2022. Em 2019, o mercado global de surfactantes gerou \$39.901 milhões e está projetado para crescer em \$52.417 milhões até 2025. Porém, esse crescimento é agora considerado subestimado pela alta demanda por produtos contendo surfactantes devido à pandemia de Covid-19 (JOHNSON et al., 2021).

Grande parte dos surfactantes sintéticos disponíveis no mercado é derivada do petróleo, sendo frequentemente tóxicos para o meio ambiente. Quando os tensoativos sintéticos são usados em processos industriais, duas categorias de poluentes são geradas: os subprodutos da atividade industrial e os resíduos dos tensoativos. Ambos podem ser prejudiciais para o meio ambiente e para os seres vivos envolvidos. Esses produtos químicos permanecem por longos períodos no meio ambiente porque dificilmente são biodegradáveis (FENIBO et al., 2019).

Dessa forma, as legislações e a preocupação ambiental levaram à busca por compostos biodegradáveis, menos nocivos e que possam substituir os surfactantes derivados do petróleo. Nesse contexto, a substituição de surfactantes sintéticos por biossurfactantes é uma alternativa viável para minimizar danos ambientais (SHAKERI et al, 2021). Os biossurfactantes de origem microbiana são uma excelente escolha para essa substituição, pois eles podem ser sintetizados por uma ampla variedade de microrganismos a partir de substratos renováveis. Nesse cenário, as leveduras têm sido amplamente estudadas, principalmente devido ao status de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) mostrado por algumas delas (CHAVES et al., 2021). Dentre as leveduras produtoras de biossurfactantes, o gênero *Starmerella* possui destaque na produção de soforolipídios, que são biossurfactantes pertencentes à classe dos

glicolípídios, sendo constituídos por um dissacarídeo soforose ligado a uma cadeia de ácidos graxos (VAN RENTERGHEM et al., 2018).

Apesar de suas diversas aplicações e vantagens, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes convencionais do ponto de vista econômico, em razão dos altos custos de produção (LIU et al, 2020). Isso é devido às metodologias de produção e purificação e pelo uso de substratos de valor elevado (MARKANDE et al, 2021). Como resultado, o sucesso da produção de biossurfactantes em larga escala depende da criação de processos menos onerosos, principalmente no aspecto dos substratos, que correspondem de 10 a 30% dos custos totais de produção. Para solucionar esse problema, a produção dos biossurfactantes pode ser associada ao uso de resíduos e subprodutos industriais, que podem ser aproveitados tanto para diminuir os custos gerais de produção quanto para evitar a poluição gerada por seu descarte na natureza. Vários subprodutos agrícolas, industriais e resíduos da produção de alimentos podem ser utilizados para esse fim (MOHANTY et al., 2021).

Diante do exposto, o presente trabalho tem enquanto justificativa propor a produção de biossurfactantes, por serem moléculas extremamente promissoras devido as suas aplicabilidades, a partir de substratos de baixo custo, que são cruciais para a viabilização da produção em larga escala, tais como o glicerol (subproduto da produção de biodiesel) e o farelo de arroz (subproduto do beneficiamento de arroz branco), utilizando para tal objetivo leveduras do gênero *Starmerella*, conhecidas na literatura pela alta produtividade de biotensoativos. Além disso, os resultados desse trabalho também permitirão agregar conhecimento sobre o potencial biotecnológico de novas espécies de microrganismos coletadas em ecossistemas brasileiros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surfactantes

Também conhecidos como tensoativos, os surfactantes são compostos orgânicos que possuem caráter anfipático. Tais substâncias são formadas por moléculas com uma parte de caráter apolar e a outra parte com caráter polar (MARCELINO et al., 2020), como exemplificado na Figura 1. A porção apolar é geralmente representada por uma “cauda” contendo uma cadeia carbônica que pode ser linear, ramificada ou com partes cíclicas. Já os grupamentos hidrofílicos são representados por uma “cabeça” que pode conter grupos iônicos (cátions ou ânions), anfóteros ou não iônicos (DALVIN, 2011). A classificação dos surfactantes é feita de acordo com a porção polar da molécula e está representada na Figura 2. Os surfactantes aniônicos possuem grupos hidrofílicos que se dissociam em ânions em soluções aquosas, já os catiônicos se dissociam em cátions e os anfóteros se dissociam em cátions e ânions, dependendo do pH do meio. Os surfactantes não iônicos não se dissociam em soluções aquosas. (NAKAMA, 2017).

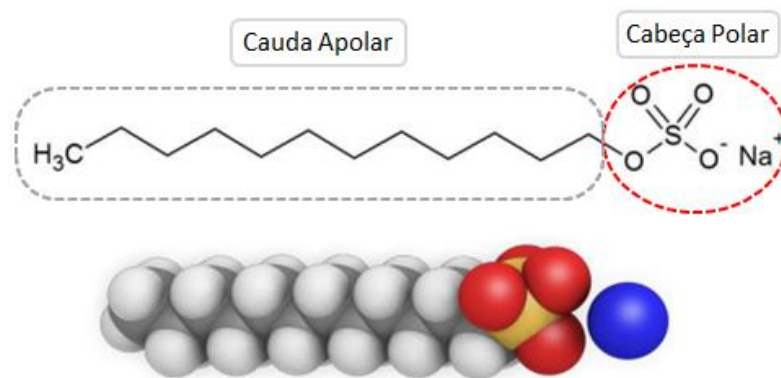


Figura 1. Representação da estrutura molecular do tensoativo aniônico sintético dodecil sulfato de sódio (SDS), exemplificando o modelo “cabeça” polar e “cauda” apolar. Fonte: Adaptado de ARAÚJO (2016).

Por serem moléculas anfifílicas, os surfactantes tendem a se acumular nas interfaces dos fluidos, como sistemas de óleo/água e ar/água (STOYANOV et al., 2003; CORTÉS-SÁNCHEZ, 2020). Essa característica também permite que esses compostos sejam capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre os líquidos, sólidos e gases, ocorrendo diferentes graus de polaridade entre as fases, permitindo que eles se misturem ou se dispersem com facilidade, como emulsões na água ou em outros líquidos (BANAT, MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; VARJANI; UPASANI, 2017).

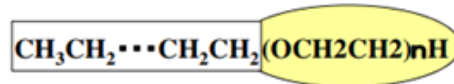
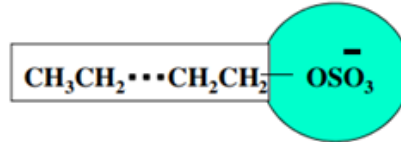
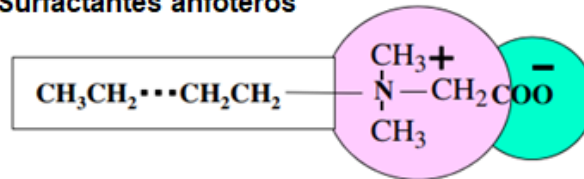
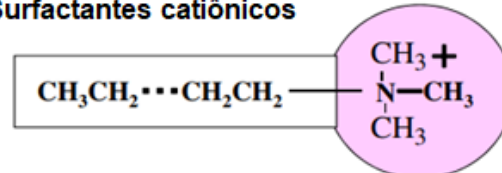
A: Surfactantes não-iônicos**B: Surfactantes aniônicos****C: Surfactantes anfóteros****D: Surfactantes catiônicos**

Figura 2. Esquema representativo da classificação dos surfactantes, com um exemplo de cada tipo. Eles podem ser não-iônicos (A); aniônicos (B); anfóteros (C) e catiônicos (D). Fonte: Adaptado de NAKAMA (2017).

Além de terem a capacidade de se acumular na interface de fases imiscíveis e reduzir a tensão interfacial e superficial do meio (KHOPADE et al., 2012), os tensoativos também possuem a capacidade de formar estruturas denominadas micelas. O fato de os monômeros dos tensoativos formarem agregados chamados de micelas é considerado uma propriedade intrínseca desses compostos, em que a cadeia hidrocarbônica tem sua área de contato diminuída entre a água e o surfactante (OLIVEIRA, 2014; FELIPE; DIAS, 2017). Em meio aquoso, a camada externa da estrutura da micela é formada pelas “cabeças” polares, que entram em contato com a água, enquanto a camada interna é formada pelas “caudas” apolares. Tendo em vista que as moléculas de surfactantes se comportam de forma diferente quando estão na forma de monômeros e quando estão na forma de micelas, é importante saber em qual concentração a formação de micelas começa a ocorrer. A essa concentração é dado o nome de concentração micelar crítica (CMC) (DAVE et al., 2017). A partir do ponto em que essa concentração é atingida na solução, ocorre um equilíbrio dinâmico, representado na Figura 3, entre os monômeros dispersos no meio, na interface ar/água e nas micelas (NESMERÁK; NEMCOVÁ, 2006).

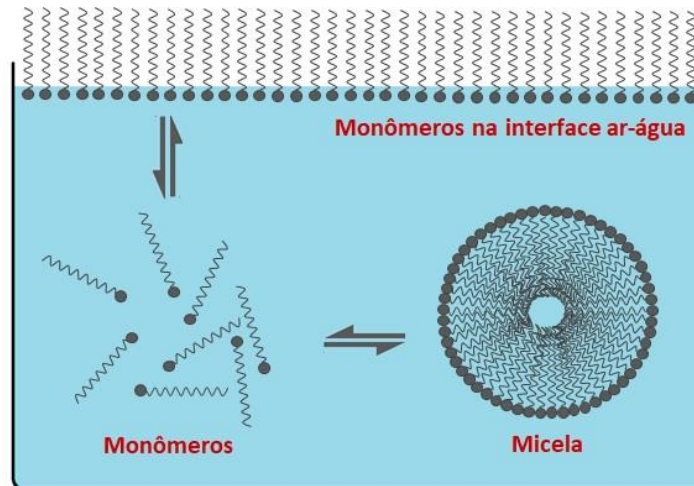


Figura 3. Representação esquemática de um equilíbrio dinâmico entre os monômeros dispersos na solução, em micelas e monômeros na interface ar-água. Fonte: Adaptado de NESMERÁK; NEMCOVÁ (2006).

Alcançar o valor de CMC significa que houve uma completa adsorção das moléculas através da interface e as propriedades de superfície estão no seu ótimo. Entretanto, para valores acima da CMC, não há mudanças significativas na diminuição da tensão superficial, porque são os monômeros que atuam na redução da tensão superficial e não as micelas. Isso ocorre porque nos valores acima da CMC, a concentração dos monômeros é praticamente constante e a adição de surfactante no meio não afeta o número de monômeros, apenas a estrutura das micelas (VIEIRA et al., 2021). A Figura 4 ilustra esse conceito.

Em virtude das propriedades singulares que os surfactantes têm de reduzir a tensão superficial de diversos compostos, essas substâncias são amplamente utilizadas na indústria. Suas aplicações envolvem: detergência, capacidade de emulsificação, solubilização, lubrificação, capacidade molhante, capacidade espumante e separação de fases (NITSCHKE; PASTORE, 2002; FENIBO et al., 2019). Desse modo, por terem ampla aplicabilidade, os tensoativos são usados nas indústrias petrolífera, agrícola, alimentícia, farmacêutica, cosmética, civil e têxtil (DELEU; PAQUOT, 2004; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; BRUMANO; SOLER; SILVA, 2016).

Ao longo do tempo, os surfactantes foram ganhando importância na economia mundial. Na década de 80, a demanda por esses compostos na indústria química aumentou cerca de 300% nos Estados Unidos (GREEK, 1990). A produção global de surfactantes foi relatada em 7 milhões de toneladas anuais em 2000, aumentando para 12,5 milhões de toneladas em 2006 e 14,1 milhões em 2017, com uma previsão de crescimento de 18% até 2022. Em 2019, o mercado global de surfactantes gerou \$39.901 milhões e está estimado para crescer em \$52.417 milhões até 2025.

Entretanto, essa projeção agora é considerada subestimada devido à alta demanda por produtos contendo surfactantes devido à pandemia de Covid-19 (JOHNSON et al., 2021).

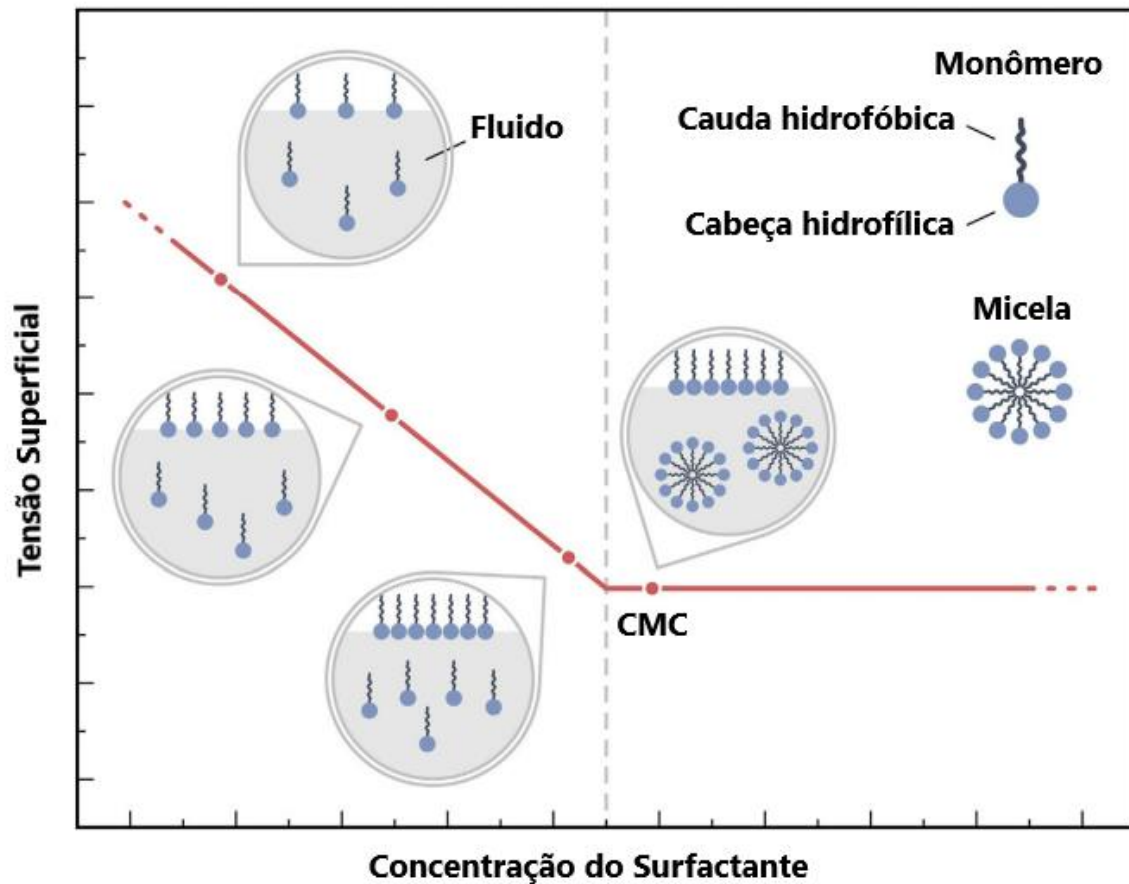


Figura 4. Esquema ilustrando a formação de micelas. Fonte: Adaptado de VIEIRA et al. (2021).

Um aspecto importante em relação a essa produção é que a grande maioria dos surfactantes que movimentam a economia é obtida de forma sintética partir de recursos do petróleo e oleoquímicos (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014). Esses compostos não são biodegradáveis e frequentemente são tóxicos para o meio ambiente, causando bioacumulação e provocando prejuízos ecológicos significativos (VAN BOGAERT et al., 2007; MARCELINO et al., 2020).

Nos últimos anos houve um aumento na busca por compostos biodegradáveis de origem natural e que possam ser uma alternativa mais sustentável para os surfactantes sintéticos (DELEU; PAQUOT, 2004; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; HENKEL et al., 2012), como os tensoativos naturais que são sintetizados a partir de organismos vivos, tais como microrganismos

(biossurfactantes), plantas (saponinas) e seres vertebrados (sais biliares) (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008; MARCELINO et al., 2020).

No entanto, a melhor alternativa para a produção de surfactantes menos nocivos ao meio ambiente são aqueles produzidos por microrganismos, pois oferecem vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, como menor toxicidade e maior biodegradabilidade. Além disso, o tempo de produção é menor, devido a um ciclo de crescimento mais curto quando comparado a plantas e animais, tornando os surfactantes microbianos uma das principais alternativas para a exploração comercial. Outra vantagem é que eles podem ser sintetizados por uma ampla variedade de microrganismos a partir de matérias-primas renováveis (APARNA et al., 2012; VIEIRA et al., 2021).

2.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são um grupo estruturalmente diverso de moléculas tensoativas produzidas por microrganismos (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; COSTA, 2007; MIR et al., 2017). Esses compostos podem ser sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos a partir de vários tipos de substratos, tais como óleos, alcanos, açúcares e até mesmo resíduos industriais (SOURAV et al., 2015). A sua produção ocorre principalmente quando os microrganismos estão em crescimento aeróbio. Durante o crescimento, eles são secretados no meio de cultura e auxiliam a translocação e o transporte de substratos hidrofóbicos através das membranas celulares, tornando-os mais disponíveis para o metabolismo e captação, além de permitir que os microrganismos se desenvolvam em substratos imiscíveis (BOGNOLO, 1999; BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008; FENIBO et al., 2019).

Os biossurfactantes têm vantagens em relação aos surfactantes sintéticos por serem menos tóxicos, altamente biodegradáveis, possuem possibilidade de produção a partir de subprodutos agroindustriais e serem mais estáveis em condições extremas de temperatura, salinidade e pH (APARNA et al., 2012; MARCELINO et al., 2020). Esses compostos anfifílicos se acumulam na interface de fluidos imiscíveis, podendo reduzir as tensões interfaciais e superficiais, além de aumentarem a solubilidade, biodisponibilidade, mobilidade e posterior biodegradação de compostos orgânicos hidrofóbicos (SINGH et al., 2007; NITSCHKE; SILVA, 2017). Dessa forma, esses compostos tensoativos exercem os mesmos

mecanismos dos surfactantes sintéticos de reduzir a tensão superficial e interfacial dos meios em que se encontram. Os biossurfactantes apresentam várias propriedades, tais como: emulsificação, detergência, umectação, formação de espuma, dispersão, solubilização e atividade antimicrobiana em alguns casos (SOURAV et al., 2015).

Considerando as propriedades de detergência, emulsificação, atividade antimicrobiana e solubilização, os biossurfactantes são amplamente utilizados na indústria farmacêutica, de óleo, cosmética, no processamento de alimentos, fabricação de insumos agrícolas e na biodegradação. Já na área de proteção ambiental, os biossurfactantes podem ser utilizados tanto na melhoria da recuperação de óleo quanto em desastres ambientais envolvendo derramamento de óleo. Além disso, também podem ser usados em processos de biorremediação de solos e rejeitos industriais contaminados (SHEKHAR; SUNDARAMANICKAM; BALASUBRAMANIAN, 2015; BRUMANO; SOLER; SILVA, 2016).

Os biossurfactantes podem ser divididos em duas categorias de acordo com o peso molecular (ROSENBERG; RON, 1999). Uma dessas categorias compreende os de baixo peso molecular, que possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial em meio aquoso. A outra categoria são os de alto peso molecular, denominados bioemulsificantes, que formam e estabilizam as emulsões, mas não necessariamente irão reduzir a tensão superficial (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008; VARJANI; UPASANI, 2017). A classificação dos biossurfactantes é feita também com base na composição química e na natureza dos microrganismos que os produzem (MIR et al., 2017; VIEIRA et al., 2021).

De acordo com a sua estrutura química, pode-se classificá-los em: glicolipídios, lipoproteínas e lipopeptídios, ácidos graxos, lipídios neutros, fosfolipídios, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. São considerados de baixo peso molecular: glicolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos de cadeia curta e fosfolipídios. Já os de alto peso molecular podem ser os surfactantes poliméricos e os surfactantes particulados (SOURAV et al., 2015; FENIBO et al., 2019; CORTÉS-SÁNCHEZ, 2020). A Tabela 1 apresenta os biossurfactantes de baixo e alto peso molecular, classificação, microrganismos produtores e as respectivas referências.

Tabela 1. Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores.

Peso molecular	Biossurfactante	Microrganismo	Referências
Baixo peso molecular	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas</i> sp. ¹	Phulpoto et al. (2021)
		<i>Aspergillus</i> sp. ³	Kiran et al. (2010)
		<i>Planococcus</i> spp. ¹	Gaur et al. (2020)
	Trehalolipídios	<i>Rhodococcus</i> sp. ¹	Bages-Estopa et al. (2018)
	Soforolipídios	<i>Starmerella bombicola</i> ²	Ceresa et al. (2020)
			Kaur et al. (2019)
	Manosileritritol lipídios (MELs)	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> ²	Andrade et al. (2017)
	Glicose lipídios	<i>Ustilago maydis</i> ³	Becker et al. (2021)
	Celobiose lipídios	<i>Alcanivorax borkumensis</i> ¹	Yakimov et al. (1998)
		<i>Pseudozyma aphidis</i> ² , <i>P. hubeiensis</i> ²	Morita et al. (2013)
	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i> ¹	Cooper et al. (1979)
Alto peso molecular	Fosfolipídios	<i>Sphingobacterium</i> sp. ¹	Burgos-Díaz et al. (2011)
	Surfactina/ Iturina/ Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i> ¹	Arima et al. (1968)
	Surfactina/ Fengicina	<i>Alcaligenes aquatilis</i> ¹	Yalaoui-Guellal et al. (2021)
	Polimixina	<i>Paenibacillus polymyxa</i> ¹	Deng et al. (2011)
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹	Bonnichsen et al. (2015)
	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i> ¹	Clements et al. (2019)
	Emulsan	<i>Acinetobacter venetianus</i> ¹	Castro et al. (2008)
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i> ²	Cirigliano et al. (1985)
	Vesículas	<i>Acinetobacter</i> sp. ¹	Kappeli et al. (1979)

¹ bactéria; ² levedura; ³ fungo filamentoso. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2021).

2.2.1 Biossurfactantes produzidos por leveduras

Embora a maioria dos estudos abordem biossurfactantes de origem bacteriana, com os gêneros mais relatados sendo de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Arthrobacter*, as espécies de leveduras capazes de produzir esses compostos estão ganhando cada vez mais atenção da comunidade científica mundial. Isso porque esses gêneros bacterianos possuem natureza patogênica, tornando restrita a aplicação na indústria alimentícia, por exemplo. Já as leveduras apresentam a vantagem de que algumas espécies apresentam o status de GRAS

(*Generally Recognized as Safe*), que significa que microrganismos com esse status não são patogênicos ou tóxicos, podendo ser aplicados em produtos medicamentosos e alimentícios (AMARAL et al., 2010; CSUTAK et al., 2012; MARCELINO et al., 2020).

Os estudos para a produção de biossurfactantes envolvendo leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Pseudozyma*, *Yarrowia* e *Starmerella* vem aumentando. Outros gêneros também vêm sendo estudados e relatados na literatura, como, *Pichia*, *Ustilago*, *Schizonella*, *Kluyveromyces*, *Wickerhamiella*, *Kurtzmanomyces*, *Debaryomyces*, *Cutaneotrichosporon*, *Spathaspora*, *Scheffersomyces* e *Meyerozyma* (FONTES et al., 2008; SÁENZ-MARTA et al., 2015; JEZIERSKA et al., 2017; FENIBO et al., 2019; MARCELINO et al. 2019). Alguns exemplos das principais leveduras produtoras de biossurfactantes estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Principais leveduras produtoras de biossurfactantes.

Biossurfactante	Microrganismos produtores	Referências
Glicolipídios	<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	Elshafie et al. (2015)
	<i>Starmerella bombicola</i>	Konishi et al. (2016)
	<i>Starmerella batistae</i>	Kim et al. (2021)
	<i>Candida floricola</i>	
	<i>Candida antarctica</i>	Accorsini et al. (2012)
	<i>Candida albicans</i>	
	<i>Trichosporon ashii</i>	Chandran and Das (2010)
	<i>Pichia anomala</i>	Thaniyavarn et al. (2008)
Lipopeptídios e	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Amaral et al. (2006)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2031	Alcantara et al. (2010)
Fosfolipídios	<i>Candida</i> sp. SY16	Kim et al. (2006)
	<i>Candida lipolytica</i>	Sarubbo et al. (2007)
Polimérico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saha and Rao (2017)
	<i>Candida tropicalis</i>	Saha and Rao (2017)

Fonte: Dailin et al. (2021).

A produção de biossurfactantes por leveduras é influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio, além da presença ou ausência de fósforo, ferro, magnésio e manganês no substrato. Outros fatores que também alteram o rendimento da produção são a temperatura, o pH, a velocidade de agitação do meio e o modo de condução do processo (FONTES et al., 2008; MARCELINO et al., 2020).

2.2.2 Bioemulsificantes produzidos por leveduras

Emulsões podem ser definidas como sistemas polifásicos, em que uma fase dispersa (fragmentada) se encontra dentro de uma fase contínua, sendo, portanto, uma dispersão de um líquido imiscível em outro. O tamanho das bolhas ou gotículas presentes na fase dispersa irá influenciar de forma significativa no comportamento da emulsão. A estabilização das emulsões ocorre por meio da ação de um emulsificante, na qual a fase descontínua é estabilizada em uma fase contínua (DALTIM, 2011; FRANZOL; REZENDE, 2015). Sendo assim, os emulsificantes são uma classe de substâncias tensoativas que promovem a estabilidade e facilitam a formação de emulsões nos meios em que se encontram (OZTURK; MCCLEMENTS, 2016).

Os bioemulsificantes são moléculas tensoativas sintetizadas por microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), que também apresentam estas características de estabilizar emulsões (ALIZADEH-SANI et al., 2018). Em relação à classificação, os bioemulsificantes são considerados biossurfactantes de alto peso molecular, pois são misturas complexas de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas. Dentro da divisão dos biossurfactantes, esses compostos compreendem os surfactantes poliméricos, surfactantes particulados de lipopolissacarídeos e algumas lipoproteínas consideradas bioemulsificantes (UZOIGWE et al., 2015; FENIBO et al., 2019; CORTÉS-SÁNCHEZ, 2020).

Alguns gêneros de leveduras destacam-se na produção de bioemulsificantes, como *Candida*, *Yarrowia*, *Galactomyces*, *Trichosporon* e *Geotrichum* (FONTES et al., 2008; MONTEIRO et al., 2010). Um tipo de bioemulsificante é o yansan, um complexo lipídio-carboidrato-proteína sintetizado pela levedura *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682) na presença de glicose. Esse emulsificante foi capaz de formar emulsões de água em óleo, no meio com hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e com perfluorocarbonos, indicando seu uso potencial nos processos de biorremediação (COELHO, AMARAL; BELO, 2010). Outro emulsificante conhecido é o liposan, um composto extracelular solúvel em água sintetizado pela levedura *Candida lipolytica* (= *Yarrowia lipolytica*), sendo constituído de 83% de carboidratos e 17% de proteínas (SANTOS et al., 2016).

Zerhusen et al. (2019) relataram que a levedura *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 foi capaz de produzir soforolipídios de cadeia longa com atividade emulsificante, a partir de álcoois graxos ou misturas equimolares de ácido graxo/álcool graxo. Segundo os autores, os soforolipídios de cadeia longa produzidos por *S. bombicola* podem ser obtidos em altos títulos

a partir de matérias-primas renováveis de baixo custo, com potencial de aplicação em cremes cosméticos, produtos alimentícios, pomadas medicamentosas e em processos de biorremediação.

2.2.3 Soforolípídios produzidos por leveduras

Soforolípídios são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolípídios. Esses compostos possuem sua parte hidrofílica formada por uma molécula de sofrorose, unida por uma ligação β -glicosídica a uma longa cadeia de ácidos graxos, que compõem a sua parte hidrofóbica. A sofrorose é um dissacarídeo de glicose com uma ligação incomum β -1,2, que pode ser, no caso do sofrorolípídios, acetilado nas posições 6' e/ou 6''. Em relação à cadeia de ácidos graxos, ela geralmente contém 16 ou 18 átomos de carbono, de forma que a extremidade carboxílica do ácido graxo pode estar livre (forma ácida) ou esterificada internamente na posição 4'' ou na posição 6'/6'' (forma lactônica) (VAN BOGAERT; SOETAERT, 2011). A figura 5 ilustra a representação estrutural de duas formas de sofrorolípídios.

Devido às suas características moleculares, os sofrorolípídios possuem várias aplicações potenciais, como: descontaminação de hidrocarbonetos poluídos e metais pesados do solo, recuperação de óleo na indústria de petróleo, na produção de agentes de limpeza, cosméticos, perfumes, compostos antitumorais, antibacterianos, antifúngicos, anti-inflamatórios, espermicidas, promotores da síntese de leptina e produtores de celulase (WANG et al., 2018).

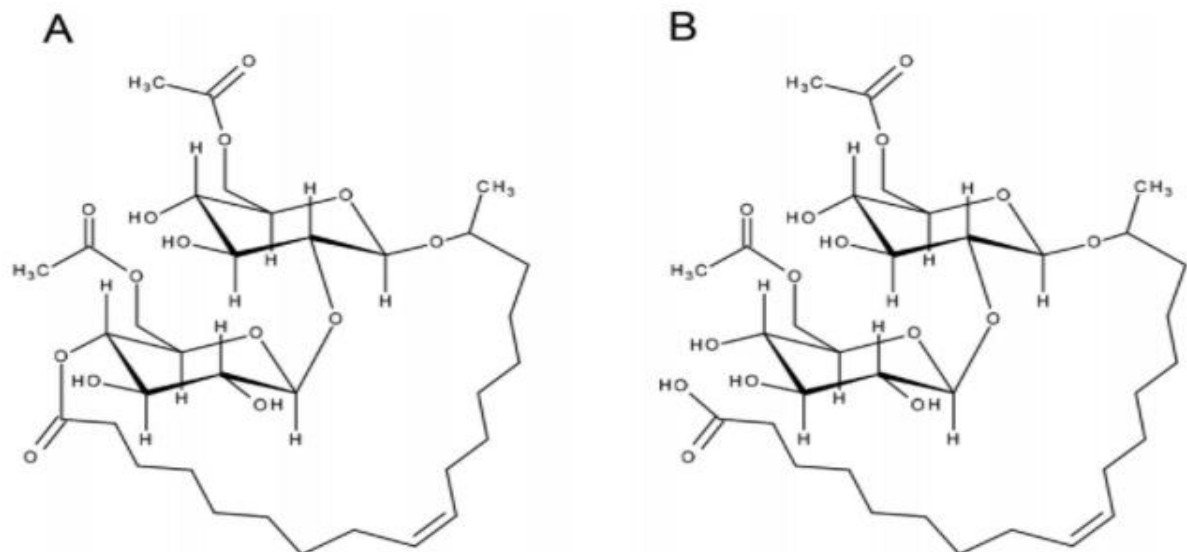


Figura 5. Representação molecular de duas formas de sofrorolípídios. A) Forma lactônica e B) Forma ácida. Fonte: KONISHI et al. (2015).

Algumas aplicações dos soforolipídios também incluem a remoção de íons de metais pesados e compostos de benzeno da água e de solos poluídos. Além disso, podem ser utilizados na biorremediação combatendo a proliferação de algas nocivas. Na área médica, eles podem ser potenciais componentes antitumorais, pois têm um efeito inibidor no crescimento de células cancerígenas humanas. Eles também podem ser usados como drogas anti-lepra além de facilitar a cicatrização de feridas (WANG et al., 2018). As aplicações potenciais dos soforolipídios estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Potenciais aplicações dos soforolipídios.

Aplicação potencial	Referências
Antibacteriana	Claus et al. (2017); Fu et al. (2018)
Antifúngico	Sanada et al. (2014); Sen et al. (2017)
Anticancerígeno	Chen et al. (2006); Delbeke et al. (2018)
Agente umectante	Develter et al. (2007)
Promover a síntese de leptina	Pellecier et al. (2004); Lourith et al.(2009)
Biorremediação (descontaminação de hidrocarbonetos e metais pesados de solos ou lama)	Basak et al. (2014); Arab et al. (2018); Fu et al. (2018); Chandran et al. (2012)
Recuperação de petróleo na indústria petrolífera	Elshaife et al. (2015); Geetha et al. (2018)
Agente de limpeza	Schelges et al. (2017); Gross et al. (2017)
Cosmética	Schelges et al. (2017); Varvaresou et al.(2015)
Anti-inflamatória	Napolitano et al. (2006); Sleiman et al. (2009)
Espermicida	Azim et al. (2006)
Produção de celulase	Lo et al. (2009)
Perfume	Inoue et al. (1980)

Fonte: Wang et al. (2018)

Os soforolipídios estão entre os biossurfactantes mais conhecidos e estudados, oferecendo várias vantagens sobre os surfactantes sintéticos, por exemplo: atividade específica e alta seletividade em uma ampla faixa de pH e de níveis de salinidade, boa aceitação ecológica e baixa toxicidade (OLIVEIRA et al., 2014; JIMÉNEZ-PEÑALVER et al., 2019). A sua produção pelas leveduras *Starmerella bombicola*, *S. batistae*, *S. apicola*, *Candida bogoriensis*, *Wickerhamiella domercqiae*, *S. riodecensis*, *C. stellata*, e *Candida* sp. NRR Y-27208 foram relatadas na literatura (KURTZMAN et al., 2010; KONISHI et al., 2015;). Dentre as leveduras produtoras de soforolipídios, a mais estudada é a levedura não-

patogênica *S. bombicola*, conhecida por gerar altos títulos e ter produção superior a 300 g/L (ZERHUSEN et al., 2019).

A produção de soforolipídios é altamente estimulada quando duas fontes de carbono de origem lipofílica (alcanos, ácidos graxos saturados e insaturados, álcoois, óleos e gorduras) e hidrofílica (glicose) estão presentes no meio de cultura. Além disso, o tipo de fonte hidrofóbica irá influenciar na composição final do soforolipídio. A proporção, o tipo e a produção das formas ácidas ou lactônicas de soforolipídios são dependentes de algumas variáveis, tais como: composição do meio (fontes de carbono, nitrogênio e sal), linhagem produtora, condições ambientais (pH, temperatura, agitação, tempo e aeração) e o tipo de processo de cultivo que será utilizado (em lote, batelada ou contínuo) (OLIVEIRA et al., 2014).

A biossíntese de soforolipídios é estimulada em condições de nitrogênio limitantes, uma vez que nessas condições a atividade enzimática é elevada. Além disso, ela ocorre no fim da fase exponencial e no início da fase estacionária de crescimento do microrganismo (AFONSO et al., 2020). A via biossintética dos soforolipídios (Figura 6) se inicia com a hidroxilação dos ácidos graxos presentes no meio, que podem ser originados de n-alcanos, álcoois, aldeídos, triglicerídeos ou ésteres de ácidos graxos. Logo, os ácidos graxos são convertidos em ácidos graxos hidroxilados pela ação da enzima citocromo P450 monooxigenase NADPH dependente, pertencente à família CYP52. Posteriormente, duas moléculas de glicose serão acopladas ao ácido graxo ativado. A primeira glicose liga-se glicosidicamente ao grupo hidroxila do ácido graxo por meio da ação da glicosiltransferase I. Depois disso, uma segunda molécula de glicose se une glicosidicamente à primeira porção da glicose pela glicosiltransferase II. Esse processo resultará em soforolipídios ácidos não acetilados, sendo a acetiltransferase responsável pela reação de acetilação. Já na produção da forma lactônica ocorre uma reação de esterificação mediada pela enzima lactonesterase, entre o grupamento carboxila do ácido graxo e o grupamento hidroxila (OLIVEIRA et al., 2014; SHAH et al., 2017).

Apesar de possuir diversas aplicações e vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, os soforolipídios possuem um alto custo para serem produzidos, decorrente da baixa eficiência e da baixa escala de produção, sendo este o principal obstáculo para a competitividade no mercado mundial (WANG et al., 2020). Para contornar esse problema e tornar os biosurfactantes mais economicamente competitivos, algumas estratégias vêm sendo estudadas, como a utilização de substratos de baixo custo (resíduos e subprodutos industriais),

otimização dos processos e linhagens de microrganismos geneticamente modificadas para aumentar o rendimento da produção (SATPUTE; PŁAZA; BANPURKAR, 2017).

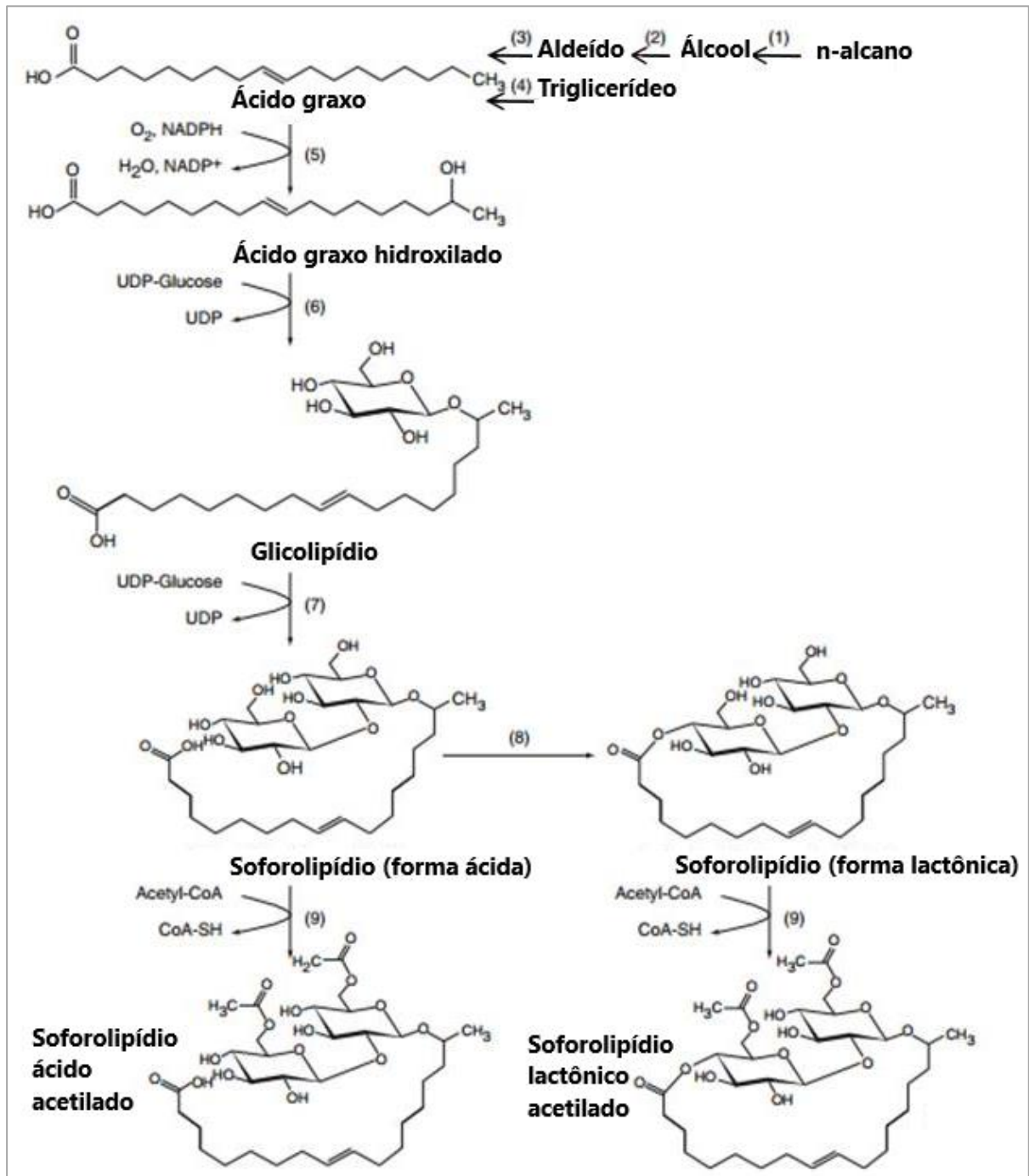


Figura 6. Via biossintética de sofrorolípídios. (1) citocromo monooxigenase P450, (2) álcool-desidrogenase, (3) aldeído-desidrogenase, (4) lipase, (5) citocromo monooxigenase P450, (6) glicosiltransferase I, (7) glicosiltransferase II, (8) lactonesterase, (9) acetiltransferase. Fonte: VAN BOGAERT; SOETAERT (2011).

2.3 O gênero *Starmerella*

A levedura conhecida nos dias atuais como *Starmerella bombicola* foi isolada originalmente a partir do mel de abelhas no Canadá, sendo denominada naquela época de *Torulopsis bombicola* por Spencer, Gorin e Tulloch (1970), devido a sua estreita associação com abelhas do gênero *Bombus*. Além disso, foi observado também que a nova espécie produzia soforosídeos de ácidos graxos hidroxilados, conhecidos hoje como soforolipídios (DE GRAEVE et al, 2018).

Posteriormente, foi proposto por Yarrow e Meyer (1978) uma alteração no diagnóstico do gênero *Candida*, para que espécies com pseudo-hifas ausentes, rudimentares ou bem desenvolvidas pudessem ser incluídas no gênero. Com essa mudança, foi possível a inserção de espécies não hifais, sendo assim, *T. bombicola* foi reclassificada para *Candida bombicola* (YARROW; MEYER, 1978).

Rosa e Lachance (1998) estudaram leveduras isoladas de flores de *Calystegia sepium* (*Convolvulaceae*) e de besouros associados ao gênero *Conotelus*, relacionadas filogeneticamente à espécie *C. bombicola*. Nesse estudo foram realizados cruzamentos das leveduras isoladas com a linhagem tipo de *C. bombicola*, resultando na formação de ascas contendo um ascósporo esferoidal, com uma parede convoluta e saliência membranosa. Em vista disso, Rosa e Lachance (1998) propuseram o novo gênero *Starmerella* com a espécie *Starmerella bombicola*, para acomodar o teleomorfo de *C. bombicola*.

No XVIII Congresso Internacional de Botânica ocorrido em julho de 2011 na cidade de Melbourne foi decidido que a partir de 1º de janeiro de 2012 um fungo pode ter apenas um nome (MCNEILL; TURLAND, 2011). Portanto, é comum encontrar em publicações mais antigas a espécie *C. bombicola*, mas a nomenclatura atual para essa espécie é *Starmerella bombicola*.

A reprodução assexuada no gênero *Starmerella* ocorre por brotamento multilateral e as células podem ser esféricas ou elipsoidais. Além disso, não há produção de hifas e nem pseudo-hifas. Já a reprodução sexuada ocorre por conjugação dos ascos, que normalmente formam um ascósporo único, assimétrico e rugoso. Em relação a fisiologia, a absorção de nitrato varia entre as espécies e há fermentação da glicose (LACHANCE, 2011). É possível haver uma relação mutualística benéfica entre abelhas e as espécies de leveduras desse gênero, uma vez que as leveduras desse clado são frequentemente encontradas em ambientes associados a abelhas e ao substrato em que esses insetos vivem (ROSA et al., 2003).

O gênero *Starmerella* conta com duas espécies que apresentam reprodução sexuada, *S. bombicola* e *S. meliponinorum*. Já foram descritas também como pertencentes ao gênero as espécies sem reprodução sexual conhecida, *Starmerella anomalae*, *Starmerella aceti*, *Starmerella caucasica*, *Starmerella henanensis*, *Starmerella jinningensis*, *Starmerella asiatica*, *Starmerella neotropicalis*, *Starmerella scarabaei*, *Starmerella orientalis* e *Starmerella syriaca* (SANTOS et al., 2018). Novas espécies descritas por Santos et al. (2018) também foram incluídas no gênero: *Starmerella camargoi*, *Starmerella ilheusensis*, *Starmerella litoralis*, *Starmerella opuntiae*, *Starmerella roubikii* e *Starmerella vitae*. Além disso, estes autores transferiram 25 espécies pertencentes ao gênero *Candida* para o gênero *Starmerella*, a fim de cumprir as normas estabelecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas.

Com relação à patogenicidade de *S. bombicola*, pelo fato dessa levedura estar naturalmente presente em sucos de uva concentrados, em extratos vegetais fermentados com alto teor de açúcar e mel e de ser usada em fermentações de vinho pelas suas propriedades aromáticas, essa levedura não é conhecida por causar nenhuma doença em humanos adultos saudáveis (número da linhagem ATCC: 22214). Entretanto, a espécie não é oficialmente classificada como ‘*Generally Regarded as Safe*’ (GRAS) pela *American Food and Drug Administration* (FDA) (DE GRAEVE et al., 2018).

A levedura *S. bombicola* se destaca no gênero por ter a capacidade de produzir grandes quantidades de soforolipídios, que representam metabólitos secundários de seu metabolismo. De Clerq et al. (2021) elucidaram que a principal função natural dos soforolipídios nessa espécie envolve armazenamento extracelular de carbono e energia, que pode ser utilizada pela levedura nas condições de inanição. Além disso, os soforolipídios possuem propriedades antimicrobianas, que inibem o crescimento de microrganismos competidores.

2.4 Uso de substratos renováveis e de baixo custo na produção de biossurfactantes

Os principais obstáculos para a produção de biossurfactantes em larga escala envolvem o alto custo de substratos, dificuldades nos processos *downstream* e baixos rendimentos de produção. Dessa forma, uma das estratégias que pode permitir a competição dos biossurfactantes com os surfactantes sintéticos é a utilização de subprodutos agroindustriais como matéria-prima de baixo custo (BORAH et al., 2019).

Tais resíduos possuem alto potencial poluente, mas dessa forma deixam de ser considerados redúduos, pois passam a ter valor agregado, podendo ser reaproveitados em

outros processos, além de evitar o descarte inadequado, o que minimiza o impacto ambiental. Dentre as alternativas existentes, o glicerol residual bruto, subproduto do processo de produção do biodiesel, tem se destacado como substrato rico em nutrientes essenciais, sendo uma fonte de carbono barata (SILVA et al. 2020). Resíduos agrícolas como melaço de cana-de-açúcar e beterraba, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, farelo de arroz, casca de soja, sabugo de milho, polpa de farelo de cevada, casca de coco, casca de semente de girassol, resíduo de polimento de moinho de arroz e águas residuais processadas ricas em amido também são utilizadas para a produção de agentes tensoativos por microrganismos (SAWANT et al., 2021).

O farelo de arroz é um subproduto do beneficiamento do arroz branco, que resulta na veiculação de grande parte dos nutrientes para o farelo, incluindo lipídios, fibras, proteínas e vitaminas. Dentre os lipídios, seus maiores constituintes são os ácidos oléico, linoléico e ácido palmítico. Além disso, também estão presentes magnésio, fósforo, ferro e tocoferóis (MONTEIRO, 2020).

Existem vários relatos na literatura da utilização do glicerol (SILVA et al., 2010; ACCORSINI et al., 2012; SILVA et al., 2020) e do farelo de arroz (VENKATESH; VEDARAMAN, 2012; BHARDWAJ et al. 2015; AHUEKWE et al., 2016; MISHRA;TRIVELDI, 2020) como substratos alternativos de baixo custo para a fermentação na produção de biossurfactantes. A Tabela 4 mostra alguns dos substratos utilizados para esse fim relatados na literatura.

Tabela 4. Alguns substratos utilizados para a produção de biossurfactantes.

Substrato	Biossurfactante	Microrganismo	Concentração do substrato (g/L)	Biossurfactante (g/L)	Ref.
Glicerol	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	8,0	Silva et al. (2010)
Sacarose	Surfactina	<i>Micromonospora marina</i>	10	1,22	Ramalingan et al.(2019)
Glicose	Soforolipídios	<i>Starmerella batistae</i>	50	24,1	Kim et al. (2021)
Glicerol	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	2,55	Salazar-Byram (2016)
Farelo de arroz	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	6,24	Mishra et al.(2021)

Como foi discutido anteriormente, existem fatores limitantes para a produção dos biossurfactantes em escala industrial, como o alto custo gerado pelo valor dos substratos e pela utilização de meios de cultivo complexos. Isso traz a necessidade de pesquisas que investiguem processos que utilizem substratos de baixo custo, contribuindo para a substituição dos compostos sintéticos, gerando uma economia mais sustentável (VIEIRA et al. 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e caracterizar a produção de soforolípidios por espécies novas de leveduras do gênero *Starmerella* isoladas a partir de ecossistemas do Brasil e do Equador.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar espécies ainda não descritas de leveduras do gênero *Starmerella* que sejam produtoras de biossurfactantes;
- Avaliar a produção de biossurfactantes das melhores leveduras produtoras utilizando como substratos a glicose, o glicerol e o farelo de arroz;
- Caracterizar e quantificar os biossurfactantes produzidos;
- Avaliar a estabilidade dos soforolípidios produzidos em diferentes condições de pH, temperatura e salinidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de leveduras

Foram selecionadas 10 novas espécies de leveduras do gênero *Starmerella* isoladas de ecossistemas do Brasil e do Equador para o teste inicial de triagem, compreendendo um total de 19 isolados de leveduras do gênero *Starmerella*, pertencentes à Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais, preservadas a – 80°C.

Tabela 5. Espécies de leveduras do gênero *Starmerella* selecionadas para o presente trabalho.

Espécie	Isolado	Local de coleta	Origem do isolado
<i>Starmerella</i> sp. 1	UFMG-CM-Y6321	Araguatins - TO ¹	Flor de <i>Byrsonima crassifolia</i>
	UFMG-CM-Y5739	PEIG - RJ ²	Flor de <i>Thunbergia erecta</i>
<i>Starmerella</i> sp. 2	UFMG-CM-Y6313	São Félix - TO ¹	Flor de Ipê amarelo
	TOC03_77.3	São Félix - TO ¹	Flor de Ipê roxo
	TOC03_80.2	São Félix - TO ¹	Flor de Ipê roxo
<i>Starmerella</i> sp. 3	UFMG-CM-Y6330	Araguatins - TO ¹	Flor de <i>Byrsonima crassifolia</i>
	Y6364	Jalapão - TO ¹	Flor não identificada
<i>Starmerella</i> sp. 4	JY1.2	Janaúba - MG ³	Mel imaturo de Abelhas Jataí
	TPY3.6	Janaúba - MG ³	Pólen de Abelhas Tubuna
<i>Starmerella</i> sp. 5	CLQCA-24i-144	Galápagos - Equador	Flor não identificada
	CLQCA-24i-181	Galápagos - Equador	Flor não identificada
<i>Starmerella</i> sp. 6	UFMG-CM-Y6044	Nova Lima - MG ³	Abelha <i>Scaptotrigona postica</i>
	UFMG-CM-Y6045	Nova Lima - MG ³	Abelha <i>Scaptotrigona postica</i>
<i>Starmerella</i> sp. 7	APY1.1	Janaúba - MG ³	Pólen de <i>Apis mellifera</i>
	TPY1.1	Janaúba - MG ³	Pólen de Abelhas Tubuna
	TMY12.2	Janaúba - MG ³	Mel de Abelhas Tubuna
<i>Starmerella</i> sp. 8	TD10.2	Janaúba - MG ³	Corpo de Abelha Tubuna
<i>Starmerella</i> sp. 9	UFMG-CM-Y592	Campus UFMG ⁴	Flor do gênero <i>Ipomoea</i>
<i>Starmerella</i> sp. 10	UFMG-CM-Y604	Ilhéus – BA ⁵	Flor de <i>Ipomoea pes-caprae</i>

TO¹: Tocantins; **RJ²**: Rio de Janeiro; **MG³**: Minas Gerais; **BA⁵**: Bahia; **UFMG⁴**: Universidade Federal de Minas Gerais; **PEIG**: Parque Estadual da Ilha Grande.

4.2 Curva de calibração: Peso seco x Densidade Óptica

Uma curva de calibração peso seco x densidade optica (DO600nm) foi construída para cada isolado selecionado no presente trabalho.. Após o descongelamento, os isolados foram cultivadas em placas contendo ágar YM (10g/L glicose, 5g/L peptona, 3g/L extrato de levedura, 3g/L extrato de malte e 20g/L ágar bacteriológico) durante 72h a 30°C. Os cultivos foram realizados em duplicata, com uma alçada de cada cultura inoculada em frascos *Erlenmeyers* de 125 mL contendo 50 mL de caldo YM, por 24h a 30°C e 200 r.p.m em agitador horizontal (New Brunswick Scientific CO. INC. series 25). Após esse período, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas e centrifugadas por 15 minutos a 11200 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi submetido a evaporação rotativa à vácuo (Thermo Scientific Savant SPD121P SpeedVac™) por 1h a 55°C para a obtenção do peso seco. Para a densidade óptica, alíquotas de 10 mL foram retiradas do cultivo e centrifugadas a 6300 g por 15 minutos, tendo seu sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em solução salina (0,85%) e diluições de 1:5, 1:7, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 e 1:60 foram realizadas. Para cada diluição foi determinada a densidade óptica (DO600nm) em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Biospectro SP-220) (PALLADINO, 2018).

4.3 Seleção dos isolados de *Starmerella* produtoras de biossurfactantes

Para selecionar os melhores isolados produtores de biossurfactantes, o cultivo inicial foi feito com uma alçada das leveduras selecionadas em frascos *Erlenmeyer* (capacidade de 125 mL) contendo 50 mL de meio de cultura com: 100g/L glicose e 10g/L de extrato de levedura, sendo incubadas em agitador horizontal (New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) por 24 horas a 200 r.p.m na temperatura de 30°C. (VEDARAMAN; VENKATESH, 2010).

Para a obtenção de um inóculo com a concentração celular inicial de 1g/L, o cultivo inicial foi submetido à centrifugação a 6300 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em água destilada esterelizada e volumes adequados foram acrescentados no meio de cultivo da fermentação, a fim de se obter uma concentração celular padronizada. A fermentação foi realizada em frascos *Erlenmeyers* (capacidade de 125 mL), com 50 mL de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de

extrato de levedura, em agitador horizontal (New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) por 96 horas a 200 r.p.m na temperatura de 30°C.

Os ensaios foram realizados em duplicata e alíquotas de 1 mL foram retiradas para monitorar os ensaios, nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96h. As amostras coletadas foram estocadas a – 20 °C para análises posteriores por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (PALLADINO, 2018). O critério utilizado para a seleção das melhores leveduras produtoras de biossurfactantes foi o índice de emulsificação E₂₄, que foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.1 do presente trabalho.

4.4 Produção de biossurfactantes a partir da utilização da glicose, do glicerol e do farelo de arroz

4.4.1 Condições de cultivo inicial

Os isolados selecionados na etapa anterior tiveram um cultivo inicial feito com uma alçada das leveduras em frascos *Erlenmeyer* (capacidade de 125 mL) contendo 50 mL de meio de cultura (100g/L glicose e 10g/L de extrato de levedura), sendo incubados em agitador horizontal (New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) por 24 horas a 200 r.p.m na temperatura de 30°C (VEDARAMAN; VENKATESH, 2010). A padronização do inóculo foi realizada de acordo com os tópicos 4.2 e 4.3.

4.4.2 Preparação do extrato de farelo de arroz

Para a obtenção do extrato de farelo de arroz preparou-se uma suspensão contendo 200 g de farelo com 1L de água destilada. Essa suspensão foi autoclavada por 15 min a uma pressão de 0,5 atm, esfriada e centrifugada em condições assépticas a 7.500 r.p.m durante 15 min. A fração líquida (extrato) foi transferida para um frasco previamente esterilizado. (PALLADINO, 2018). O mesmo lote de farelo de arroz foi utilizado para todos os testes realizados.

4.4.3 Condições de cultivo para a fermentação

A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyers (capacidade de 125 mL), com 50 mL de meio de cultura contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz, em agitador horizontal (New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) por 96 horas a

200 r.p.m na temperatura de 30°C. Os ensaios foram realizados em triplicata e alíquotas de 1 mL foram retiradas para monitorar os ensaios, nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96h. As amostras coletadas foram estocadas a – 20 °C para análises posteriores por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (PALLADINO, 2018). A determinação do índice de emulsificação foi feita de acordo com o item 4.5.1.

4.5 Métodos Analíticos

4.5.1 Determinação do Índice de Emsulfisificação (E_{24})

A propriedade da atividade emulsificante foi avaliada com base no Índice de Emulsificação (E_{24}), caracterizado por Cameron et al. (1998). Ao final da fermentação, o meio de cultura foi separado das células por centrifugação a 6300 g por 15 minutos a 4°C. Foram retirados 4 mL do sobrenadante resultante, que foram acrescentados a um tubo de ensaio de capacidade de 20 mL, contendo 6 mL de tolueno (Merck). Os tubos de ensaio foram vortexados vigorosamente durante 2 minutos e deixados em repouso por um período de 24h. Após esse período foi possível comparar a proporção de tolueno emulsificado com o volume total (SENA et al., 2021). A camada de emulsão formada foi medida com um paquímetro digital. Essa comparação é feita através do cálculo do Índice de Emulsificação (E_{24}), pela fórmula:

$$E_{24} = \frac{He}{Ht} \times 100$$

Onde,

He: altura da camada de emulsão;

Ht: altura total.

Também foi avaliada a estabilidade da emulsão após 48h (E_{48}) através do índice de emulsificação descrito anteriormente. Foi utilizado um controle negativo contendo apenas o meio de cultivo e o tolueno, tanto para o E_{24} quanto para o E_{48} .

4.5.2 Determinação das concentrações de glicose e glicerol

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para determinar as concentrações de glicose e glicerol presentes no meio das fermentações realizadas no presente trabalho. O cromatógrafo usado para as análises foi o Shimadzu (Shimadzu, Japão). Antes de realizar a introdução das amostras no cromatógrafo, foi realizada uma diluição das amostras em água destilada na proporção de 1:10. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose (Sartorius) com 0,45 μm e 13 mm. O teste foi realizado com uma coluna Supelco Analytica C-610 H (45°C) com um volume de injeção de 20 μL e detector de índice de refração RID 10-A, utilizando o eluente H_2SO_4 5 mM como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL/min (PALLADINO, 2018).

4.5.3 Determinação da tensão superficial

Para determinar a tensão superficial das amostras, as análises foram realizadas em um tensiômetro digital por meio do método de pressão máxima de bolha, nas seguintes condições: temperatura de 28 °C, pressão de 50 psi e vazão de 1 bolha/seg. Os resultados foram expressos em mN/M (DALTIM, 2011).

4.6 Caracterização dos biossurfactantes produzidos

4.6.1 Teste do ágar azul: CTAB-azul de metileno

Para definir parcialmente a estrutura dos biossurfactantes produzidos de acordo com o item 4.4 e detectar a presença de glicolipídios extracelulares, foi utilizado o teste de ágar azul contendo brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) e azul de metileno. Os inóculos das leveduras selecionadas foram preparados em um meio contendo 100g/L glicose e 10g/L de extrato de levedura e incubados a 30 °C, 200 r.p.m por 48 h. Posteriormente, as células foram inoculadas em placas de ágar contendo: 40g/L de glicose, 15g/L de ágar bacteriano, 0,2g/L de brometo de cetiltrimetil amônio ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{Br}$) (CTAB) e 0,005g/L de azul de metileno. Foram criados pequenos poços nas placas e 200 μL do inóculo foram adicionados em cada poço. As placas de ágar foram incubadas na temperatura de 30°C por 48h. A positividade nesse teste é indicada pela formação de um halo azul escuro ao redor de onde as células foram inoculadas, indicando a produção de glicolipídios (CHAVES et al., 2021).

4.6.2 Extração e quantificação dos soforolipídios produzidos

Ao final da fermentação realizada de acordo com o tópico 4.4, os soforolipídios foram extraídos a partir do sobrenadante do meio fermentado após centrifugação a 7.500 r.p.m por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi adicionada uma solução de HCl 37% para ajustar o pH para 2,0, com o objetivo de atingir a hidrólise e precipitação do soforolipídio. As amostras foram armazenadas em uma temperatura de 4°C durante 24h e o biossurfactante precipitado foi coletado por centrifugação a 6300 g por 15 min a 4°C. Os precipitados obtidos foram suspensos em acetato de etila (1:1). O processo de suspensão em acetato de etila foi repetido e posteriormente as amostras foram submetidas a evaporação rotativa à vácuo (Thermo Scientific Savant SPD121P SpeedVac™) por 1h a 45°C, tendo sua concentração determinada por gravimetria e expressa em g/L (CHAVES et al., 2021).

4.6.3 Avaliação de estabilidade dos soforolipídios produzidos

Para avaliar a estabilidade dos soforolipídios produzidos, a fonte de biossurfactante bruta utilizada foi o sobrenadante obtido ao final da fermentação (tópico 4.4) por meio da centrifugação a 6300 g por 15 minutos a 4°C. As análises de estabilidade foram feitas submetendo as emulsões (tópico 4.5.1) a diversas condições de pH, temperatura e salinidade. Os testes foram realizados em triplicata (CHAVES et al., 2021).

4.6.3.1 Efeito do pH

O sobrenadante obtido ao final da fermentação teve seu pH ajustado para os valores de 2,0, 6,0, 10,0 e 12,0 por meio da adição de ácido acético concentrado e de NH₄OH (3%). Após o ajuste, os índices de emulsificação (E₂₄) foram medidos de acordo com o tópico 4.5.1 (OSTENDORF et al., 2019).

4.6.3.2 Efeito da temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura na estabilidade das emulsões, o sobrenadante obtido ao final da fermentação foi emulsionado com tolueno (tópico 4.5.1) e submetido às temperaturas de 0°C, 25°C, 40°C e 80°C por 15 minutos. Após essa etapa, os tubos de ensaio

foram deixados em repouso por 24h na temperatura ambiente e os índices de emulsificação (E_{24}) foram mensurados (CHAVES et al., 2021).

4.6.3.3 Efeito da salinidade

Para verificar o efeito da concentração de sal foi adicionado NaCl ao sobrenadante obtido ao final da fermentação, nas concentrações de 2%, 6% e 10% (p/v). Após essa adição de sal, os índices de emulsificação (E_{24}) foram medidos de acordo com o tópico 4.5.1 (OSTENDORF et al., 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção das leveduras

Com a finalidade de selecionar inicialmente os melhores isolados produtores de biossurfactantes dentre as leveduras descritas na Tabela 4 foi realizado o teste do índice de emulsificação (E_{24}) de acordo com o item 4.5.1. No presente trabalho, o tolueno foi utilizado nesse teste porque esse solvente é um hidrocarboneto aromático que está presente na maioria dos locais contaminados com petróleo, sendo esse um problema ambiental global nos últimos anos (MARTINO et al., 2012). Um estudo recente realizado por Feng et al. (2021) afirmou que a biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo foi aprimorada por meio da combinação de bactérias indígenas com soforolipídios. Sendo assim, a utilização do tolueno nesse teste se justifica pela possibilidade de servir de base para estudos futuros envolvendo a biorremediação de solos contaminados por petróleo.

Os resultados referentes ao teste do Índice de Emulsificação após 24h (E_{24}) e 48h (E_{48}), além da concentração celular, do consumo de glicose e de glicerol e da tensão superficial das amostras obtidas a partir da fermentação realizada de acordo com o item 4.3 estão representados na Tabela 6. O critério adotado para a seleção dos isolados foi de acordo com o que é praticado na literatura. O ensaio da capacidade de emulsificação foi desenvolvido originalmente por Cooper e Goldenberg (1987) e atualmente é um dos métodos mais populares descritos na literatura para esse fim. O índice de emulsificação E_{24} se correlaciona com a concentração de surfactante, sendo a avaliação da capacidade de emulsificação um método de triagem simples e adequado para uma primeira triagem de microrganismos produtores de biossurfactantes (WALTER et al, 2010).

Para um biossurfactante ser considerado um bom agente emulsificante, o critério a ser analisado é a capacidade de formar emulsões estáveis que estejam acima de 50% por 24 horas ou mais (BEZERRA et al., 2020). Dessa forma, foram selecionadas para a próxima etapa desse trabalho as leveduras UFMG-CM-Y6045, TMY12.2, UFMG-CM-Y6044 e TOC03_80.2, uma vez que elas obtiveram os valores de E_{24} de $61 \pm 0,01\%$, $53 \pm 0,1\%$, $52 \pm 0,03\%$ e $52 \pm 0,15\%$, respectivamente. O controle negativo não apresentou índice de emulsificação após 24h e 48h. Além disso, as emulsões dessas quatro linhagens se mantiveram estáveis após 48h, mantendo os índices E_{48} acima de 50%.

Tabela 6. Dados sobre a concentração celular, o consumo de substrato, a tensão superficial e os índices de emulsificação das 19 linhagens de *Starmerella* analisadas inicialmente.

Espécie	Isolado	Concentração Celular (g/L)	Consumo		Tensão Superficial (mN/M)	Índice de Emulsificação	
			Glicose (%)	Glicerol (%)		(E ₂₄)	(E ₄₈)
<i>Starmerella</i> sp. 1	UFMG-CM-Y6321	31,4 ± 0,86	100,00 ± 0,01	24,04 ± 1,3	60,3 ± 0,08	46 ± 0,13%	45 ± 0,12%
	UFMG-CM-Y5739	17,52 ± 0,05	99,22 ± 1,13	30,32 ± 1,75	59,02 ± 0,11	37 ± 0,1%	37 ± 0,11%
<i>Starmerella</i> sp. 2	UFMG-CM-Y6313	20,68 ± 0,51	99,27 ± 0,05	35,94 ± 0,02	61,12 ± 0,04	6 ± 0,05%	6 ± 0,05%
	TOC03_80.2	30,57 ± 1,09	98,83 ± 0,07	30,96 ± 0,76	61,6 ± 0,5	52 ± 0,15%	51 ± 0,16%
	TOC03_77.3	20,52 ± 0,33	100,00 ± 0,01	43,53 ± 0,45	60,87 ± 0,04	37 ± 0,08%	37 ± 0,09%
<i>Starmerella</i> sp. 3	UFMG-CM-Y6330	44,52 ± 0,75	100,00 ± 0,01	40,2 ± 0,86	60,62 ± 0,18	31 ± 0,3%	31 ± 0,3%
	Y6364	16,72 ± 0,2	99,31 ± 0,1	24,5 ± 1,18	60,77 ± 0,11	29 ± 0,03%	27 ± 0,04%
<i>Starmerella</i> sp. 4	JIY1.2	7,16 ± 0,15	99,95 ± 0,09	40,35 ± 0,83	60,6 ± 0,15	8 ± 0,02%	6 ± 0,05%
	TPY3.6	5,13 ± 0,21	99,6 ± 0,6	30,32 ± 1,89	61,2 ± 0,08	13 ± 0,03%	12 ± 0,03%
<i>Starmerella</i> sp. 5	CLQCA-24i-144	9,8 ± 0,03	98,58 ± 0,56	33,3 ± 0,05	63,4 ± 0,57	37 ± 0,01%	35 ± 0,02%
	CLQCA-24i-181	17,26 ± 0,06	99,42 ± 0,06	39,93 ± 1,12	61,3 ± 0,78	35 ± 0,03%	29 ± 0,04%
<i>Starmerella</i> sp. 6	UFMG-CM-Y6044	10,6 ± 0,3	100,00 ± 0,01	40,47 ± 1,49	59,02 ± 1,03	52 ± 0,03%	52 ± 0,03%
	UFMG-CM-Y6045	5,36 ± 0,03	100,00 ± 0,01	39,84 ± 1,18	60,15 ± 0,22	61 ± 0,01%	60 ± 0,01%
<i>Starmerella</i> sp. 7	APY1.1	10,78 ± 0,14	100,00 ± 0,01	25,91 ± 0,79	59,35 ± 0,64	45 ± 0,09%	45 ± 0,09%
	TPY1.1	16,76 ± 0,08	100,00 ± 0,01	40,11 ± 1,25	58,85 ± 0,57	35 ± 0,37%	32 ± 0,37%
	TMY12.2	13,04 ± 0,43	98,82 ± 0,36	35,35 ± 1,14	59,03 ± 0,11	53 ± 0,11%	47 ± 0,19%
<i>Starmerella</i> sp. 8	TD10.2	21,38 ± 0,24	100,00 ± 0,01	38,52 ± 1,2	61,6 ± 0,29	7 ± 0,02%	6 ± 0,02%
<i>Starmerella</i> sp. 9	UFMG-CM-Y592	10,19 ± 0,35	99,42 ± 0,84	36,5 ± 0,66	59,75 ± 0,08	47 ± 0,03%	45 ± 0,05%
<i>Starmerella</i> sp. 10	UFMG-CM-Y604	7,1 ± 0,03	100,00 ± 0,01	22,69 ± 0,02	59,87 ± 0,11	16 ± 0,1%	16 ± 0,11%

Em relação à tensão superficial das amostras, o menor valor encontrado foi de $58,85 \pm 0,57$ mN/m para o isolado TPY1.1 e o maior foi do isolado CLQCA-24i-144, com $63,4 \pm 0,57$ mN/m. Dessa forma, ocorreu uma redução da tensão superficial de aproximadamente 20% na amostra do isolado TPY1.1 se comparado com o valor da água destilada, que é 72 mN/m. De acordo com Nikolova et al. (2021), um biossurfactante é considerado bom quando ele pode diminuir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m ou menos. Porém, o fato do presente trabalho ter encontrado valores acima de 35 mN/m para a tensão superficial não anula o fato de algumas amostras possuírem excelente atividade emulsificante.

Uzoigwe et al. (2015) mostraram a relação entre biossurfactantes capazes de reduzir a tensão superficial e bioemulsificantes produtores de emulsões estáveis. Para esses autores, embora os biossurfactantes e os bioemulsificantes sejam ambos de natureza anfifílica e sejam produzidos por uma ampla gama de microrganismos, cada um exibe papéis característicos na natureza. Tais moléculas possuem diferenças marcantes, especialmente com base em suas propriedades físico-químicas e papéis fisiológicos. Esses compostos podem formar emulsões estáveis, mas o motivo pelo qual os bioemulsificantes não mostram mudanças significativas na tensão superficial/interfacial entre as diferentes fases (líquido-ar, líquido-líquido, líquido-sólido) ainda não está esclarecido. Nesse mesmo estudo os autores relataram que as medições da tensão superficial e os testes de índice de emulsificação não se correlacionam. Isso explica porque o presente estudo encontrou altos valores do índice de emulsificação e apenas uma redução parcial da tensão superficial das amostras analisadas. Souza et al. (2012) identificaram um potente emulsificante produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica*, que exibiu altos valores de emulsificação com hidrocarbonetos, porém sem necessariamente reduzir a tensão superficial. Em outro estudo feito por Singh et al. (1989), a levedura *C. tropicalis* foi cultivada em n-hexadecano e produziu um emulsificante extracelular com tensão superficial de apenas 49,5 mN/m, mas foi capaz de emulsificar vários hidrocarbonetos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos.

Diante do exposto, pode se concluir que a utilização de métodos de triagem baseados apenas na redução da tensão superficial podem descartar bons microrganismos produtores de emulsificantes. Dessa forma, o presente trabalho verificou tanto a tensão superficial quanto o índice de emulsificação, sendo o índice de emulsificação escolhido como critério de triagem para selecionar as melhores produtoras de agentes emulsificantes. Com relação às análises de concentração celular e consumo do substrato, as correlações estão ilustradas nas Figuras 7 a 16.

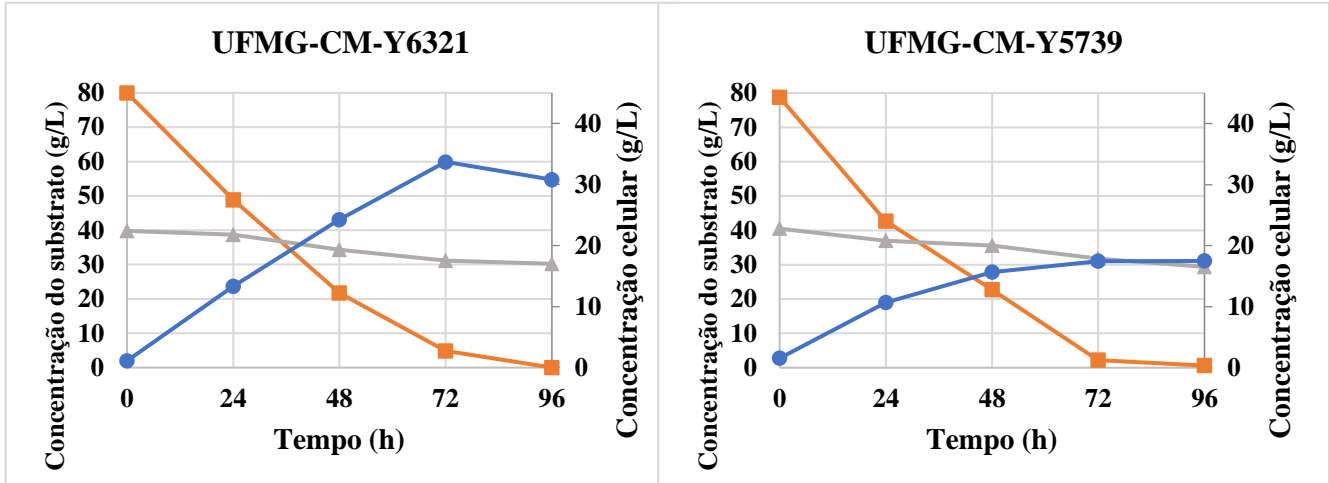


Figura 7. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie 1, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

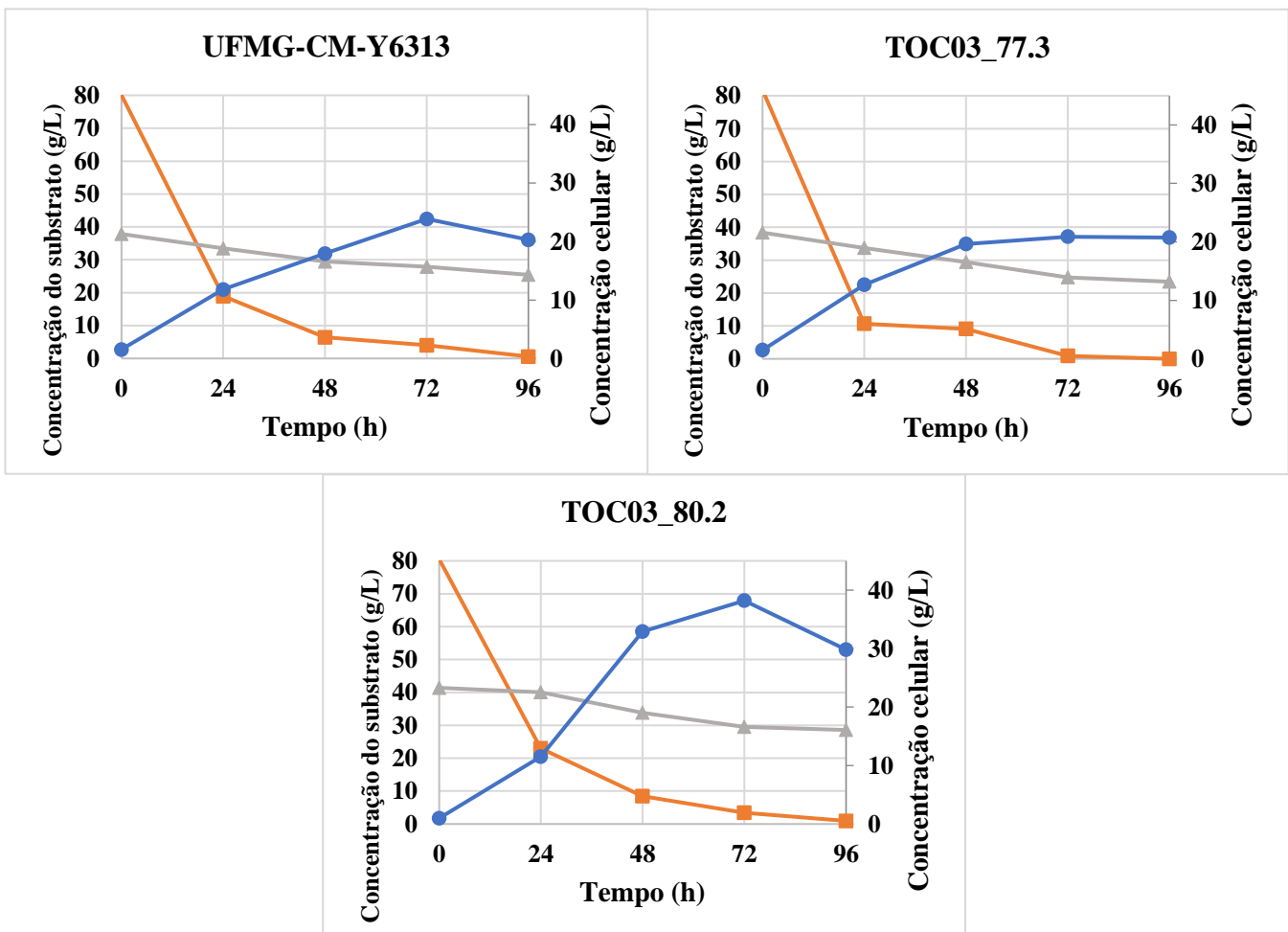


Figura 8. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* sp. 2, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

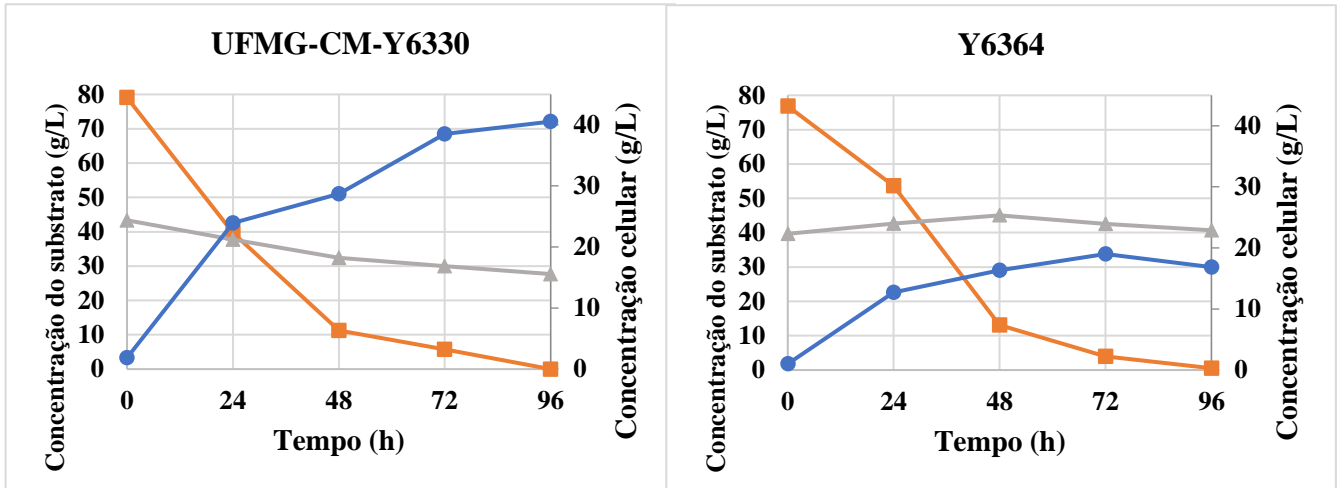


Figura 9. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* 3, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

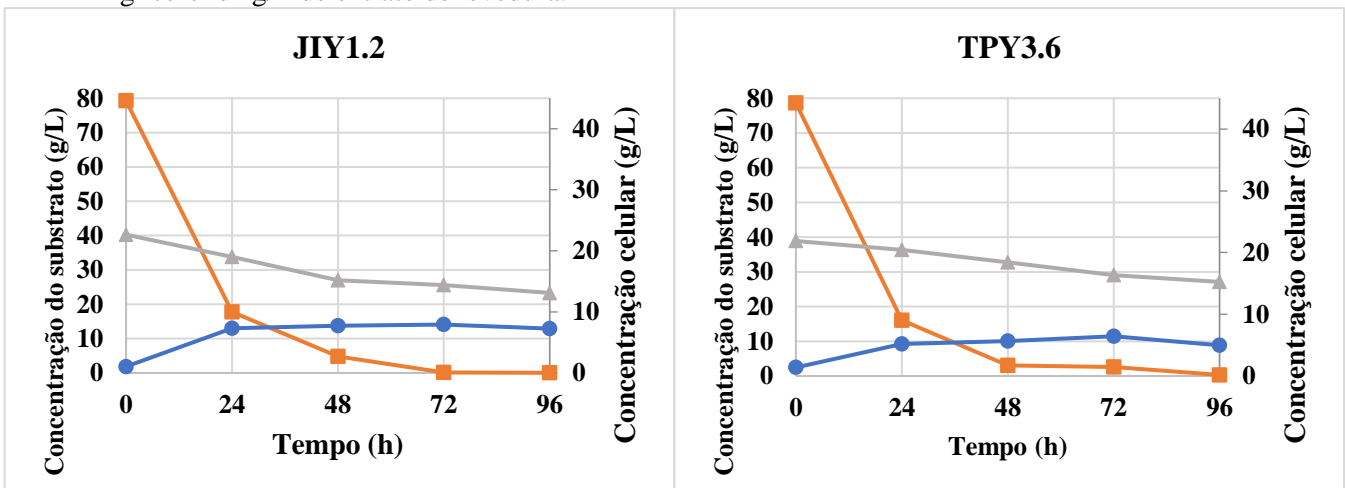


Figura 10. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* sp. 4, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

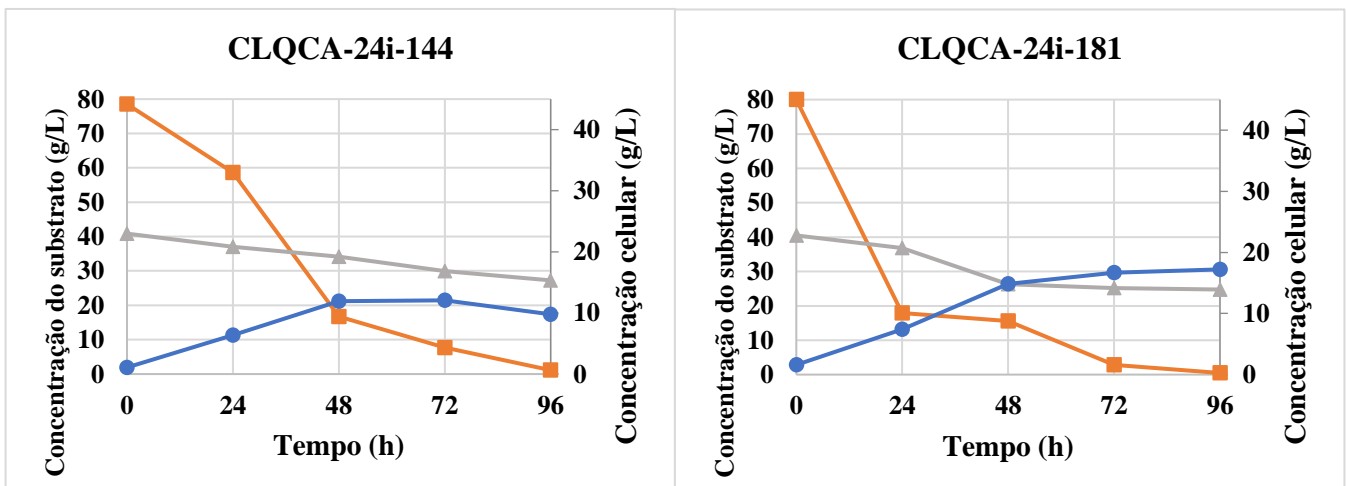


Figura 11. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* sp. 5, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

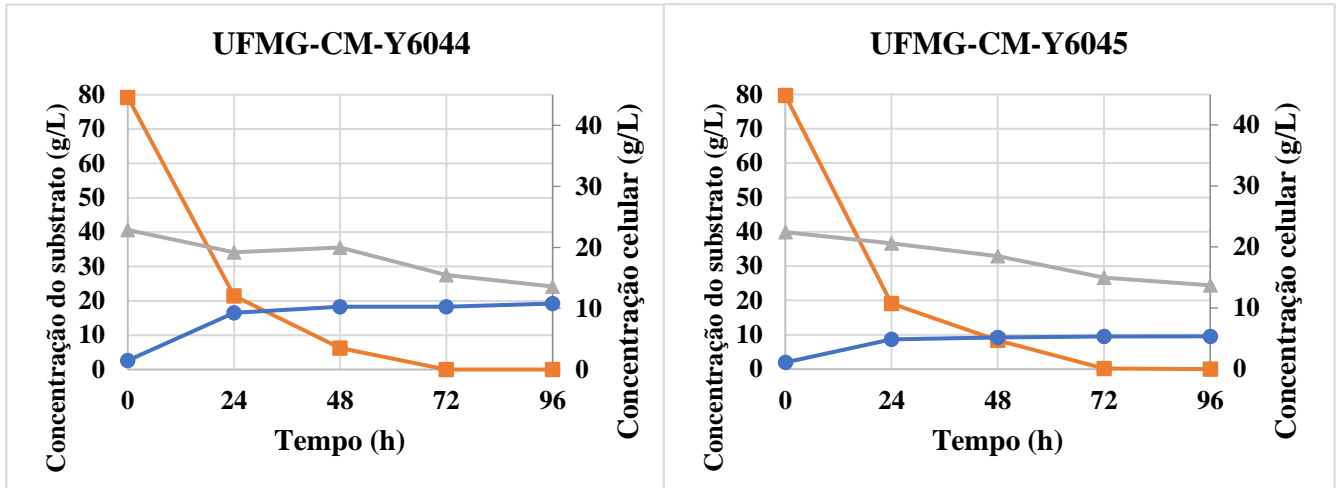


Figura 12. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* sp. 6, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

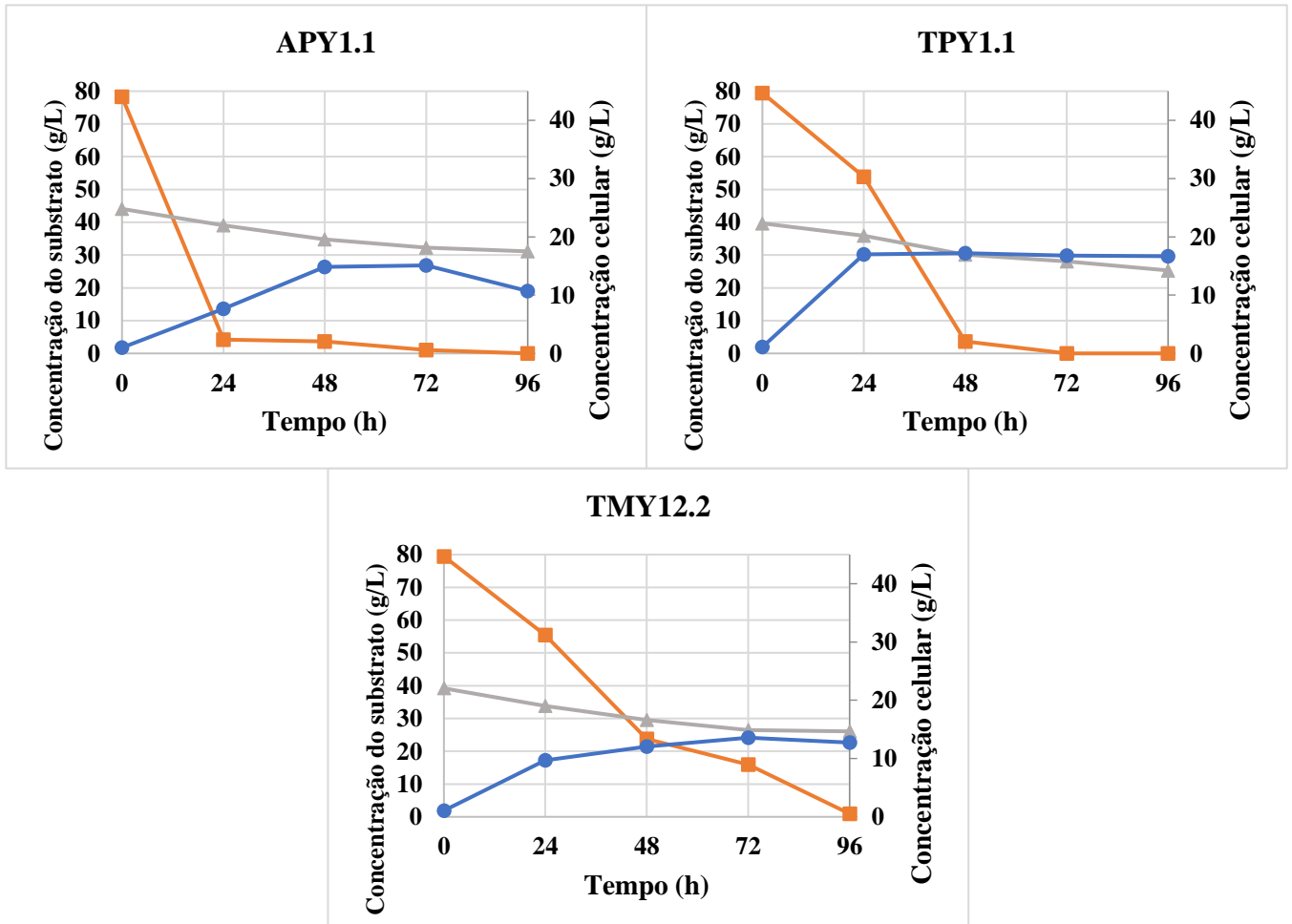


Figura 13. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) das leveduras pertencentes à espécie *Starmerella* sp. 7, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

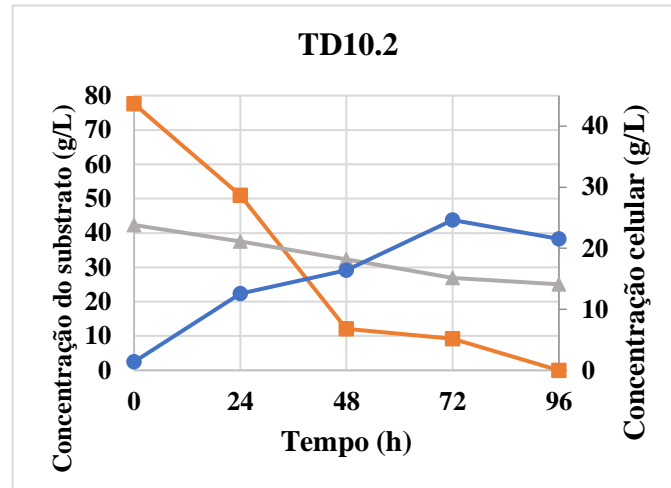


Figura 14. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) da levedura pertencente à espécie *Starmarella* sp. 8, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

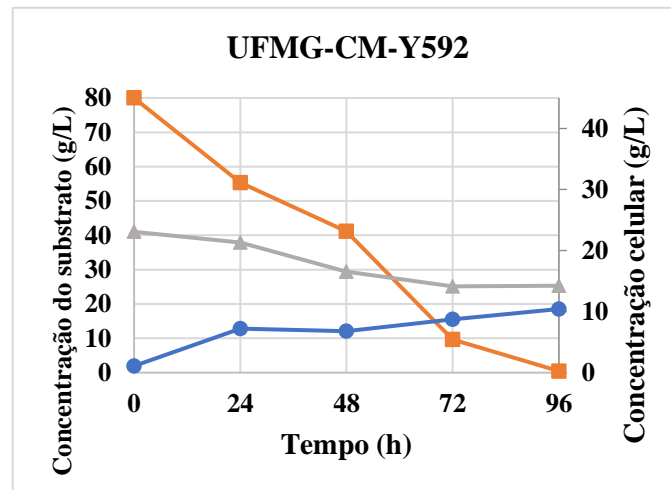


Figura 15. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) da levedura pertencente à espécie *Starmarella* sp. 9, com de meio de cultura contendo 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

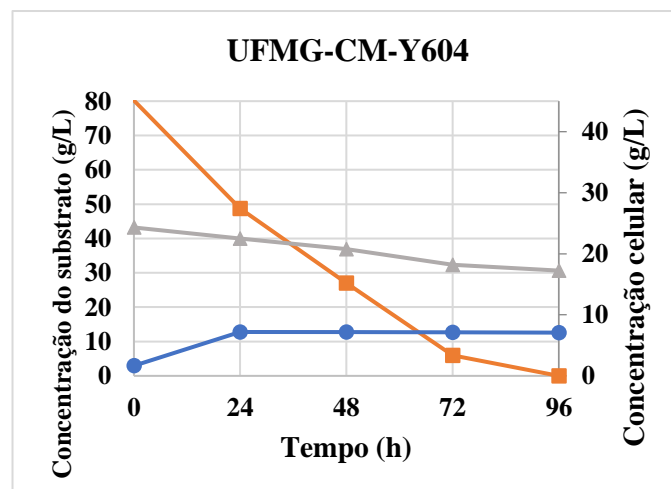


Figura 16. Perfis de glicose (-■-), glicerol (-▲-) e concentração celular (-●-) da levedura pertencente à espécie *Starmarella* sp. 10, com de meio de cultura contendo: 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura.

O consumo de glicose foi total ao final de 96h para todas os isolados analisadas. Já em relação ao glicerol, todas as leveduras consumiram esse substrato, porém de forma parcial. O maior consumo de glicerol foi da levedura TOC03_77.3 ($43,53 \pm 0,45\%$) e o menor consumo foi da UFMG-CM-Y604 ($22,59 \pm 0,02\%$). A razão para a glicose ter sido consumida primeiramente se deve ao fato de que os microrganismos de forma geral, tendem a favorecer essa fonte que é rapidamente metabolizada. Isto reprime a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de outros carboidratos lentamente metabolizados (LIN et al. 2019). Um resultado similar foi encontrado em um trabalho realizado por Konishi et al. (2018), onde o glicerol teve um consumo inferior em relação à glicose pois a levedura estudada *S. (Candida) floricola* consome um mol a mais de NADH na reação da glicerol-3-fosfato desidrogenase para assimilação de um mol de glicerol em relação à assimilação da glicose. Isso explica porque o glicerol foi consumido parcialmente e de forma mais lenta do que a glicose no presente trabalho.

Em relação à concentração da biomassa celular ao longo das 96h, o isolado que apresentou o maior valor foi a UFMG-CM-Y6330, com $44,52 \pm 0,75\text{g/L}$ e, o menor foi da levedura TPY3.6, com $5,13 \pm 0,21\text{g/L}$. A capacidade de formar emulsões não parece estar relacionada à concentração celular, uma vez que o isolado UFMG-CM-Y6045 apresentou o maior índice de emulsificação E_{24} ($61 \pm 0,01\%$) e uma das menores concentrações celulares ($5,36 \pm 0,03\text{g/L}$). Os resultados encontrados para a biomassa celular estão de acordo com o que é relatado na literatura para a espécie *S. bombicola*. Um exemplo disso foi um estudo realizado por Banghale et al. (2014), que utilizou a linhagem *S. bombicola* ATCC 22214 para a produção de soforolipídios. Os autores obtiveram uma biomassa de $6,7 \pm 0,43\text{g/L}$ a partir da fermentação com meio de cultura com 100g/L de óleo de ricino e 150g/L de glicerol.

A partir da análise dos resultados dessa etapa do trabalho, pode-se concluir que a combinação de um meio contendo 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura foi adequada para ser utilizada na triagem para a produção de biossurfactantes no presente trabalho, uma vez que todas as leveduras analisadas tiveram índices de emulsificação variando entre $61 \pm 0,01\%$ a $6 \pm 0,05\%$. Os dados relatados na literatura que abordam as concentrações do substrato para a produção de biossurfactantes estão de acordo com o que foi encontrado no presente trabalho. Al-Dhabi et al.(2020) utilizaram uma concentração inicial de 80g/L de glicose para a produção de biossurfactantes, obtendo boas capacidades emulsificantes, concluindo-se que essa concentração inicial de 80g/L de glicose foi adequada para tal objetivo. Wu et al. (2008) mostraram que o uso de glicerol para a produção de glicolipídios na concentração de 40g/L foi eficiente, obtendo-se um rendimento de

ramnolipídios de 4,9 g/L. Em relação à fonte de nitrogênio, Vedaraman et al. (2010) mostraram que a produção de soforolipídeos ocorre após o crescimento celular, quando a toda fonte de nitrogênio é consumida. Por esse motivo, a concentração da fonte de nitrogênio no meio da fermentação desempenha um papel importante na produção de soforolipídios. Nesse mesmo estudo, foi afirmado que à medida que a concentração de extrato de levedura aumenta, a formação de biomassa e a produção de soforolipídios também aumenta, mas apenas até a concentração de 4g/L de extrato de levedura. Se houver uma concentração maior do que 4g/L de extrato de levedura, ocorre uma redução na produção de soforolipídios. Diante do exposto, os isolados UFMG-CM-Y6045, TMY12.2, UFMG-CM-Y6044 e TOC03_80.2, foram as selecionadas para as próximas etapas do presente trabalho, uma vez que obtiveram os valores de E_{24} acima de 50%, sendo consideradas boas produtoras de biossurfactantes.

5.2 Produção de biossurfactantes a partir das leveduras selecionadas, utilizando glicose, glicerol e farelo de arroz como substrato

Das quatro leveduras selecionadas, uma pertence à espécie 2, TOC03_80.2, duas são da espécie 6, UFMG-CM-Y6045 e UFMG-CM-Y6044, e uma pertence à espécie 7, TMY12.2. Os dados da fermentação utilizando esses isolados em um meio de cultura contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz para essa etapa do trabalho estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados sobre a concentração celular, o consumo de substrato, a tensão superficial e os índices de emulsificação dos isolados de *Starmerella* utilizando meio de cultura contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz.

Isolado	Concentração Celular (g/L)	Consumo		Tensão Superficial (mN/M)	Índice de Emulsificação (%)	
		Glicose (%)	Glicerol (%)		(E ₂₄)	(E ₄₈)
<i>Starmerella</i> sp. 7 TMY12.2	38,37 ± 0,42	100,00± 0,01	46,96 ± 1,3	63,72 ± 0,15	62,39±0,74	45,5± 0,53
<i>Starmerella</i> sp. 2 TOC03_80.2	35,58 ± 0,70	100,00± 0,01	29,81 ± 0,09	64,25 ± 0,22	62,36±1,24	60,16±1,17
<i>Starmerella</i> sp. 6 UFMG-CM-Y6044	29,71 ± 0,86	100,00± 0,01	47,85 ± 0,12	64,1 ± 0,14	29 ± 1,18	12,49 ± 1,0
<i>Starmerella</i> sp. 6 UFMG-CM-Y6045	16,35 ± 0,49	100,00± 0,06	37,79 ± 0,26	64,9 ± 0,11	14,47±0,83	11,83± 1,06

Os resultados do índice de emulsificação obtidos na presente etapa desse trabalho estão representados na Figura 17. Em relação ao índice de emulsificação E_{24} , os isolados

TMY12.2 e TOC03_80.2 se destacaram. Tanto a levedura TMY12.2 quanto a TOC03_80.2 tiveram maiores índices de emulsificação ($62,39 \pm 0,74\%$ e $62,36 \pm 1,24\%$, respectivamente) quando submetidas a fermentação com o meio contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz do que com o meio utilizado para a triagem ($53 \pm 0,11\%$ e $52 \pm 0,15\%$, respectivamente). O controle negativo não apresentou índice de emulsificação após 24h e 48h. Os resultados mostraram que ocorreu um aumento de aproximadamente 16% nos valores do índice de emulsificação E_{24} . Isso sugere que o aumento da concentração de glicerol e/ou a inclusão de farelo de arroz no meio de cultivo podem ter uma influência positiva na produção de biossurfactantes por essas espécies. A composição do farelo de arroz compreende aminoácidos, proteínas, gorduras, fibras, vitaminas e minerais, com concentrações que variam de acordo com a fase e o tipo de beneficiamento. Além disso, é rico em ácidos graxos insaturados, principalmente em ácido oleico e linoleico (PALLADINO, 2018). Dessa forma, a utilização do farelo de arroz como fonte complexa de nitrogênio, pode fornecer vitaminas e minerais para as leveduras e influenciar positivamente na produção de soforolipídios dependendo da espécie.

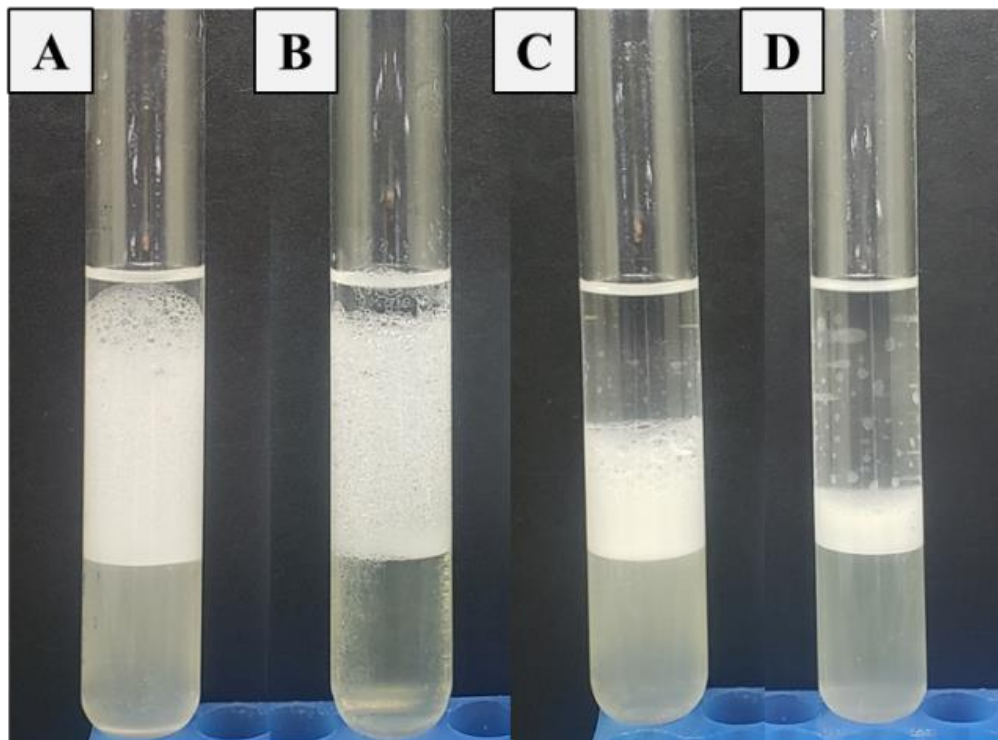


Figura 17. Determinação dos índices de emulsificação E_{24} em meio de cultivo contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) *Starmerella* sp. 7 TMY12.2, (B) *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2, (C) *Starmerella* sp. 6 UFMG-CM-Y6044 e (D) *Starmerella* sp. 6 UFMG-CM-Y6045.

Os dois isolados pertencentes a espécie 6 (UFMG-CM-Y6044 e UFMG-CM-Y6045) tiveram uma queda nos índices de emulsificação com relação à fermentação da triagem inicial. No meio de cultivo contendo 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura os índices foram de $61\pm 0,01\%$ e $52\pm 0,03\%$, respectivamente. Já no meio contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz, os valores de E_{24} caíram para $29\pm 1,18\%$ e $14,47\pm 0,83\%$, respectivamente. Isso sugere que para essa espécie, a diminuição da concentração de glicose, a ausência de extrato de levedura e/ou a presença do farelo de arroz tiveram um efeito negativo na produção de biossurfactantes. A correlação da concentração celular e da concentração de glicose e glicerol ao longo do tempo das leveduras dos quatro isolados de *Starmerella* está representada na Figura 18.

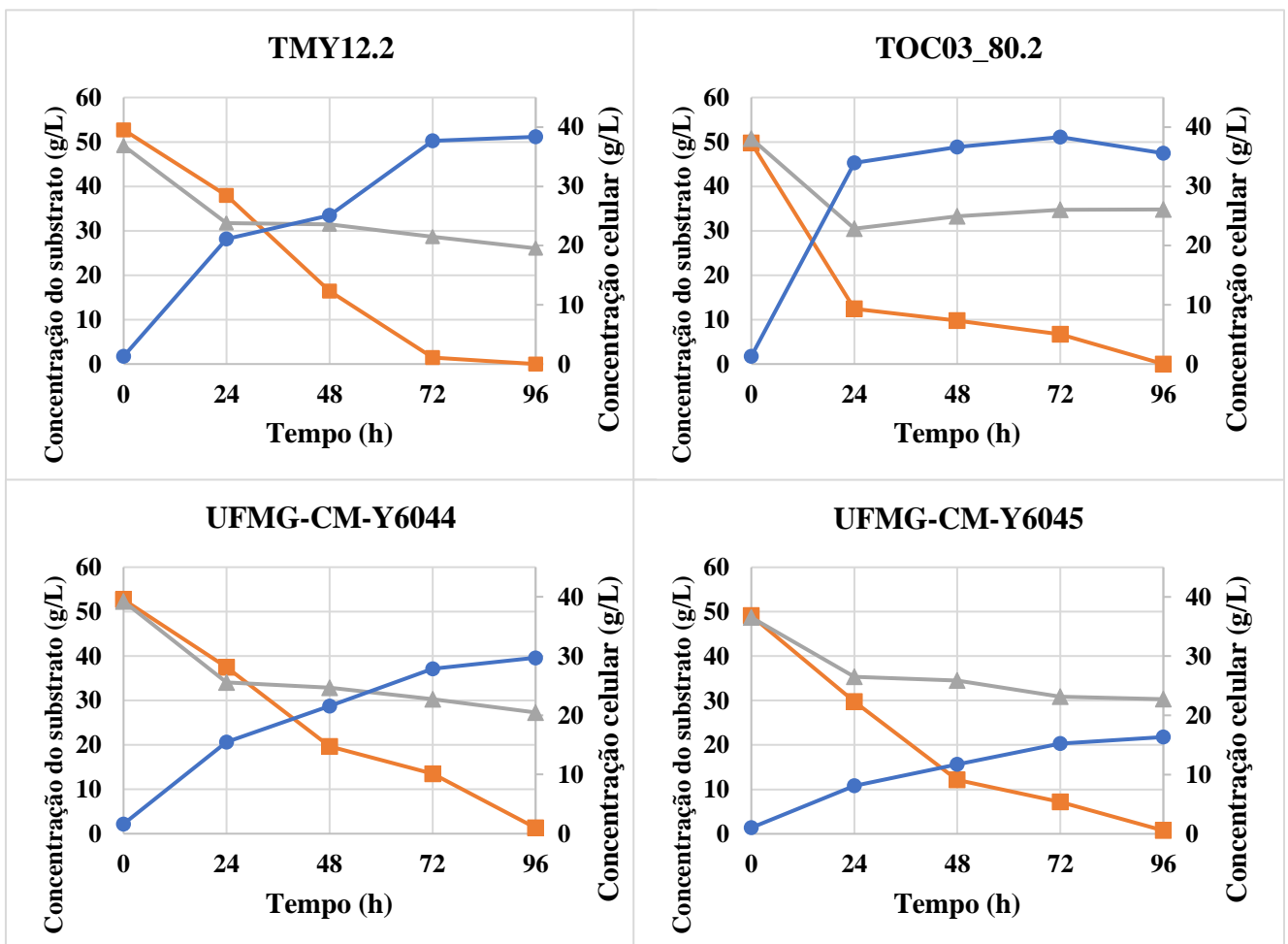


Figura 18. Perfis de glicose (—■—), glicerol (—▲—) e concentração celular (—●—) dos isolados *Starmerella* sp. 7 TMY12.2, *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2 e *Starmerella* sp. 6 UFMG-CM-Y6044 e UFMG-CM-Y6045 cultivadas em meio de cultura contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz

Os valores obtidos nas análises de tensão superficial (Tabela 7) variaram entre $63,72\pm 0,15$ mN/M e $64,9\pm 0,11$ mN/M. Como já discutido anteriormente no item 5.1, a

redução da tensão superficial não está necessariamente relacionada com a formação de emulsões. Uma hipótese para explicar porque os soforolipídios produzidos no presente trabalho foram melhores em formar emulsões do que em reduzir a tensão superficial, pode ser devido à presença de uma longa cadeia de ácidos graxos na molécula, mas são necessários estudos posteriores para confirmar a estrutura e o peso molecular deste composto. Zerhusen et al. (2019) relataram que a levedura *S. bombicola* NRRL Y-17069 foi capaz de produzir soforolipídios de cadeia longa com atividade emulsificante, a partir de álcoois graxos e/ou misturas equimolares de ácidos graxos/álcoois graxos. Os autores concluíram que os soforolipídios de cadeia longa apresentaram um caráter mais hidrofóbico e exibem alta atividade emulsificante.

Assim como ocorreu na fermentação realizada para na etapa de triagem dos isolados de *Starmerella* para a produção e biosurfactantes no presente trabalho, todas as leveduras consumiram a totalidade de glicose ao final das 96h de fermentação. O consumo de glicerol nessa etapa também ocorreu de forma parcial, com valores entre $29,81 \pm 0,09\%$ (TOC03_80.2) e $47,85 \pm 0,12\%$ (UFMG-CM-Y6044). Como relatado anteriormente, isto pode ser devido ao fato de que os microrganismos de forma geral, tendem a favorecer a glicose, sendo rapidamente metabolizada. Isto reprime a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de outros carboidratos lentamente metabolizados (LIN et al. 2019). Já a explicação para o glicerol ter um consumo mais lento que o da glicose, pode ser em razão de que microrganismos tendem a consumir um mol a mais de NADH na reação da glicerol-3-fosfato desidrogenase para assimilação de um mol de glicerol do que para à assimilação da glicose (KONISHI et al. 2018).

Com relação à concentração celular, o isolado UFMG-CM-Y6045 apresentou a menor biomassa ($16,35 \pm 0,49\text{g/L}$) e a TMY12.2 a maior ($38,37 \pm 0,42\text{g/L}$). Haque et al. (2017) utilizaram a levedura *S. bombicola* para a produção de soforolipídios com um meio contendo (g/L): glicose (100), farelo de arroz (100), uréia (1) e óleo de semente de algodão (100), obtendo uma concentração celular entre 20 e 40g/L durante a fermentação, resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

Diante do que foi discutido, conclui-se que a composição do meio utilizado na presente etapa do trabalho foi positiva para a produção de soforolipídios para *Staremerella* sp. 7 TMY12.2 e *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2 e negativa para os isolados de *Starmerella* sp. 6, UFMG-CM-Y6044 e UFMG-CM-Y6045. Kim et al. (2021) consideraram a concentração de 50g/L de glicose ótima para a produção de soforolipídios pela levedura *S. (Candida) batistae*, relatando uma concentração final de 24,1 g/L de soforolipídios. A utilização do glicerol na

concentração de 50g/L como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes foi relatada por Salazar-Byram (2016) como sendo eficiente, atingindo uma produção máxima de $1,3 \pm 0,3$ g/L de ramnolipídios. Em relação ao farelo de arroz, Mishra et al. (2021) utilizaram a concentração de 40g/L de farelo de arroz no meio de cultura para a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 424 e obtiveram um rendimento de 6,24g/L de tensoativos.

5.3 Caracterização dos biossurfactantes produzidos pelos isolados selecionados de *Starmerella*

5.3.1. Teste do ágar azul utilizando CTAB e azul de metileno

O ensaio de placa de ágar com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e azul de metileno é empregado para determinar a presença de surfactantes aniônicos extracelulares. Nesse teste, o tensoativo catiônico (CTAB) reage com o glicolípido (biossurfactante aniônico).

A formação de zonas com um halo azul escuro ao redor dos poços é considerada um resultado positivo para a produção de biossurfactantes do tipo glicolipídios (SHATILA et al. 2021). As leveduras TMY12.2, TOC03_80.2, UFMG-CM-Y6044 e UFMG-CM-Y6045 obtiveram resultados positivos nesse teste por apresentarem halo azul, como mostra a Figura 19, confirmando a produção de biossurfactantes do tipo soforolipídios.

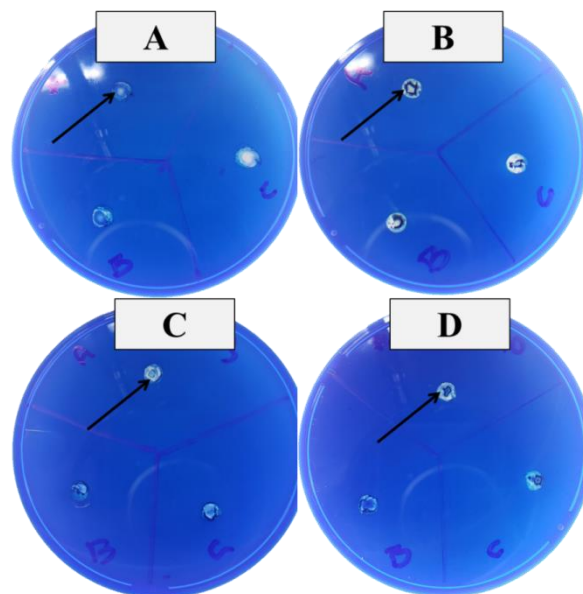


Figura 19. Teste do ágar azul utilizando CTAB e azul de metileno para determinação da produção de glicolipídios extracelulares pelos isolados (A) *Starmerella* sp. 7 TMY12.2, (B) *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2, (C) *Starmerella* sp. 6 UFMG-CM-Y6044 e (D) *Starmerella* sp. 6 UFMG-CM-Y6045. As setas indicam o halo azul escuro, confirmando a positividade no teste.

5.3.2. Extração e quantificação dos sofrorolipídios produzidos

A extração dos sofrorolipídios produzidos foi realizada inicialmente com a adição de HCl nas amostras, a fim de ocorrer hidrólise ácida e precipitação do biossurfactante. O precipitado obtido foi suspenso duas vezes em volumes iguais de acetato de etila, sendo esse solvente concentrado posteriormente por evaporação rotativa à vácuo. Depois da concentração, os sofrorolipídios foram quantificados por gravimetria e expressos em g/L (CHAVES et al., 2021). Na Figura 20 estão representados os valores obtidos para os isolados TMY12.2, TOC03_80.2, UFMG-CM-Y6044 e UFMG-CM-Y6045 com as concentrações de sofrorolipídios de $27,26\pm0,67\text{g/L}$, $21,42\pm0,84\text{g/L}$, $14,93\pm0,94\text{g/L}$ e $4,59\pm0,64\text{g/L}$, respectivamente.

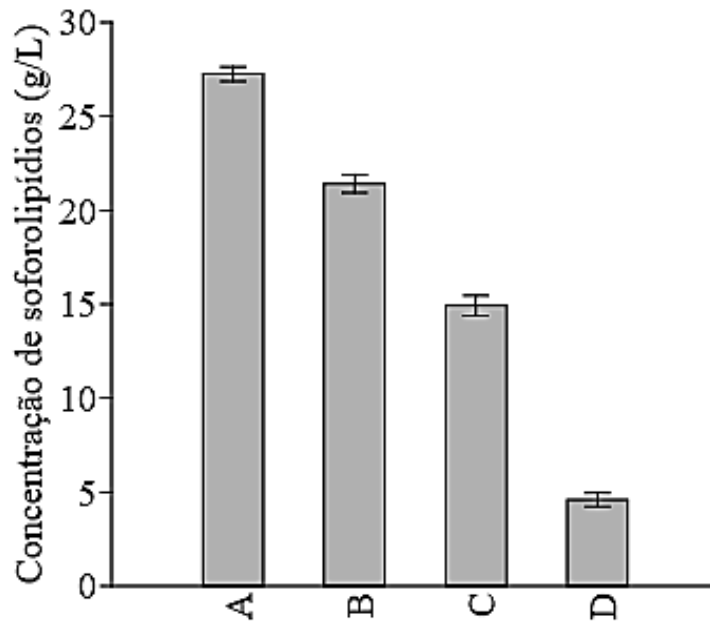


Figura 20. Determinação da concentração de sofrorolipídios após 96h de fermentação em um meio contendo: 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) *Starmerella* sp. 7 TMY12.2, (B) *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2, (C) *Starmerella* sp. 6 UFMG-CM-Y6044 e (D) *Starmerella* sp. 6 UFMG-CM-Y6045.

Dentre os quatro isolados testados, *Starmerella* sp. 7 TMY12.2 foi a que mais se destacou na fermentação com o meio de cultivo contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Essa levedura obteve a maior produção de sofrorolipídios ($27,26\pm0,67\text{g/L}$), acompanhado de um alto valor de índice de emulsificação E_{24} ($62,39\pm0,74\%$), maior concentração celular ($38,37\pm0,42\text{g/L}$) e consumo de glicerol de $46,96 \pm 1,3\%$ (Tabela 7). *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2 também apresentou bons resultados, com a produção de $21,42\pm0,84\text{g/L}$ de sofrorolipídios, estabilidade no índice de emulsificação após

24h e 48h ($62,36 \pm 1,24\%$ e $60,16 \pm 1,17\%$, respectivamente) e alta concentração celular ($35,58 \pm 0,70 \text{g/L}$). Como já discutido, o teste do índice de emulsificação E_{24} se correlaciona com a concentração de surfactante presente no meio. Dessa forma, quanto maior a concentração de soforolipídios, maior será a tendência de apresentar um alto valor de índice de emulsificação. Tal fato confirma a relação dos resultados obtidos para a concentração de soforolipídios representados na Figura 20 e da determinação do índice de emulsificação ilustrados na Figura 17.

A espécie *S. bombicola* é conhecida na literatura por produzir altas concentrações de soforolipídios (DE CLERQ et al., 2021). Vedaraman et al. (2010) relataram que produção mais alta de soforolipídios por *S. bombicola* MTCC 1910 ocorreu no período de crescimento exponencial tardio, ou seja, no 3º e 4º dia de fermentação. Nesse mesmo estudo, substrato foi maior que o utilizado no presente trabalho (100g/L de glicose, 100g/L de óleo de girassol, 4g/L de extrato de levedura e 0,6g/L de uréia), obtendo-se 38,6 g/L de soforolipídios. Daverey et al. (2010) mostraram uma produção de soforolipídios de 23,3 g/L por *S. bombicola* com soro desproteínizado (90 g L⁻¹), glicose (10 g L⁻¹), extrato de levedura (2 g L⁻¹) e ácido oleico (100 g L⁻¹). Wadekar et al. (2012) obtiveram $6,6 \pm 0,25 \text{g/L}$ de soforolipídios produzidos por *S. bombicola* ATCC 22214 a partir de um meio de cultivo contendo (g/L): 150 glicerol, 100 óleo de girassol, 4 extrato de levedura, 1 uréia, 0,1 NaCl, 5 MgSO₄ · 7H₂O; 1 KH₂PO₄ e 0,1 FeCl₃ · 6H₂O. Diante do que foi discutido, o método para a extração de soforolipídios adotado no presente trabalho com o meio de cultivo (50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz) se mostrou eficiente, uma vez que a concentração final de biossurfactantes foi satisfatória se comparada com os resultados encontrados na literatura.

Tendo em vista o que foi discutido até a presente etapa deste trabalho, foram selecionadas para a próxima etapa de avaliação da estabilidade apenas as leveduras TMY12.2 e TOC03_80.2, uma vez que somente essas duas linhagens apresentaram índices de emulsificação E_{24} acima de 50% dentre as quatro leveduras analisadas. Além disso, a escolha dessas duas linhagens também foi influenciada pelas altas concentrações de soforolipídios (Figura 20) e maior valor de biomassa celular (Figura 18).

5.3.3. Estabilidade das emulsões em diferentes condições de pH, temperatura e salinidade

5.3.3.1. Avaliação da influência do pH

A estabilidade dos sofrolipídios em pH extremos é crucial para seu uso eficaz na indústria (SHAH et al. 2017). Além disso, o pH é conhecido por ser um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam no desempenho de qualquer biossurfactante, pois altera a carga líquida na molécula de surfactante e, portanto, sua orientação na interface (JOSHI-NAVARE et al., 2013). Por esse motivo, o presente trabalho avaliou a influência do pH nos sofrolipídios produzidos pelas leveduras TMY12.2 e TOC03_80.2 ao final das 96h de fermentação com o meio de cultivo: 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz (Figura 21).

Nos testes envolvendo a levedura TMY12.2, o índice de emulsificação permaneceu acima de 50% no pH 6,0 ($61 \pm 0,67\%$) e no pH 10,0 ($58,04 \pm 1,36\%$), indicando estabilidade do produto frente a esses valores de pH. Já nos valores de pH mais extremos (2,0 e 12,0), os valores ($31,83 \pm 1,41\%$ e $30,44 \pm 1,66\%$, respectivamente) foram aproximadamente 48% menores do que os valores encontrados para o pH 6,0, mostrando que existe uma certa instabilidade do produto nesses valores extremos de pH.

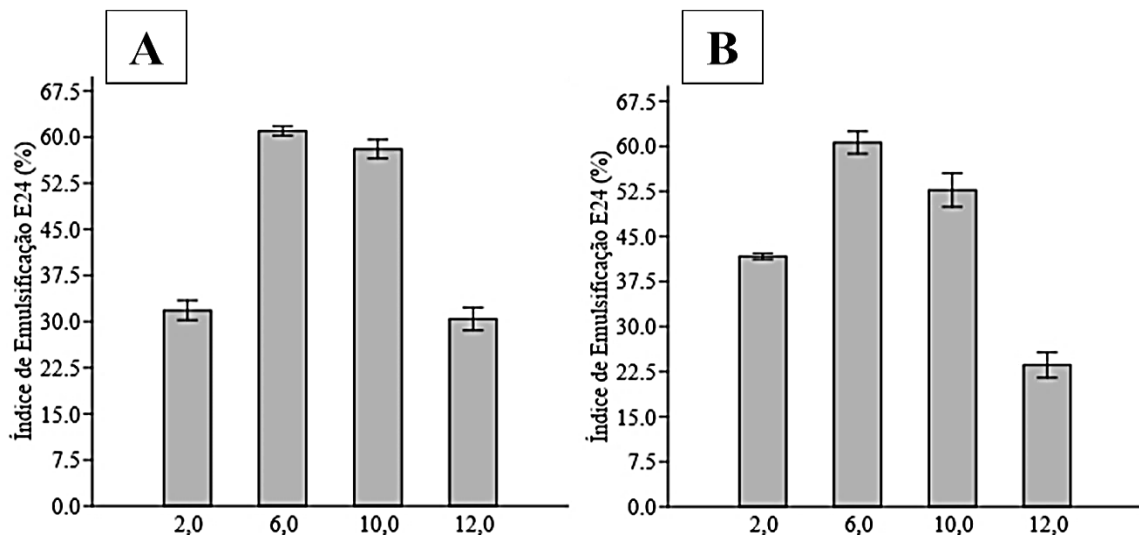


Figura 21. Avaliação da influência da variação de pH (2,0; 6,0; 10,0; 12,0) na estabilidade do índice de emulsificação E₂₄ a partir do meio de cultivo contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) *Starmerella* sp. 7 TMY12.2 e (B) *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2.

Com relação à *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2, o índice de emulsificação também permaneceu acima de 50% nos valores de pH 6,0 e 10,0 ($60,63 \pm 1,66\%$ e $52,73 \pm 2,48\%$,

respectivamente), indicando estabilidade do biossurfactante nessas condições. No valor extremo de pH 2,0, o índice de emulsificação foi $41,69 \pm 0,44\%$, sendo esse valor 32% menor que o valor encontrado para o pH 6,0 para esta levedura. As condições alcalinas de pH 12,0 resultaram em um índice de emulsificação ($23,61 \pm 1,87\%$), 62% menor do que o valor encontrado para o pH 6,0, sendo possível concluir que as condições extremas de pH (2,0 e 12,0) influenciaram negativamente na estabilidade do sofrorolípido produzido por essa levedura.

Os resultados encontrados no presente trabalho são similares aos da literatura. Chandran et al. (2012) utilizaram óleo diesel no teste do índice de emulsificação com *Candida tropicalis*. Os autores mostraram que foram produzidos sofrorolípídios estáveis apenas em na faixa de pH de 2,0 a 10,0. Dessa forma, pode-se concluir que os sofrorolípídios produzidos no presente trabalho podem manter a atividade diante de uma faixa de pH de 6,0 a 10,0, podendo ter aplicações biotecnológicas em condições ambientais ligeiramente ácidas e alcalinas.

5.3.3.2. Avaliação da influência da temperatura

No presente trabalho foi avaliada a estabilidade dos sofrorolípídios produzidos em diferentes temperaturas. Sabe-se que temperatura pode afetar a estabilidade das emulsões de forma significativa, uma vez que pode alterar as propriedades físicas do óleo, da água e a solubilidade dos tensoativos nas fases oleosa e aquosa (KOKAL et al., 2002). Os resultados encontrados para as leveduras TMY12.2 e TOC03_80.2 nas temperaturas de 0°C, 25°C, 40°C e 80°C estão representados na Figura 22. Para o isolado TMY12.2 foram encontrados altos índices de emulsificação (acima de 50%) nas temperaturas de 0°C, 25°C e 40°C, com os valores de $59,25 \pm 2,34\%$, $60,84 \pm 0,4\%$ e $60,6 \pm 1,06\%$, respectivamente. Já na temperatura de 80°C o índice de emulsificação apresentou um valor de $42,02 \pm 1,6\%$, sugerindo que uma temperatura maior causa instabilidade da emulsão. Para a levedura TOC03_80.2 os resultados foram similares, com os valores do índice de emulsificação de $58,95 \pm 0,76\%$, $60,63 \pm 1,66\%$, $51,55 \pm 1,57\%$ e $22,91 \pm 1,22\%$ para as temperaturas 0°C, 25°C, 40°C e 80°C, respectivamente. A razão pela qual os resultados na temperatura de 80°C tiveram menores índices pode ser explicada por um estudo realizado por Kokal et al. (2002), que mostraram que a medida que a temperatura aumenta, a energia térmica do sistema também aumenta, causando maior colisão entre as gotículas e desestabilizando as emulsões.

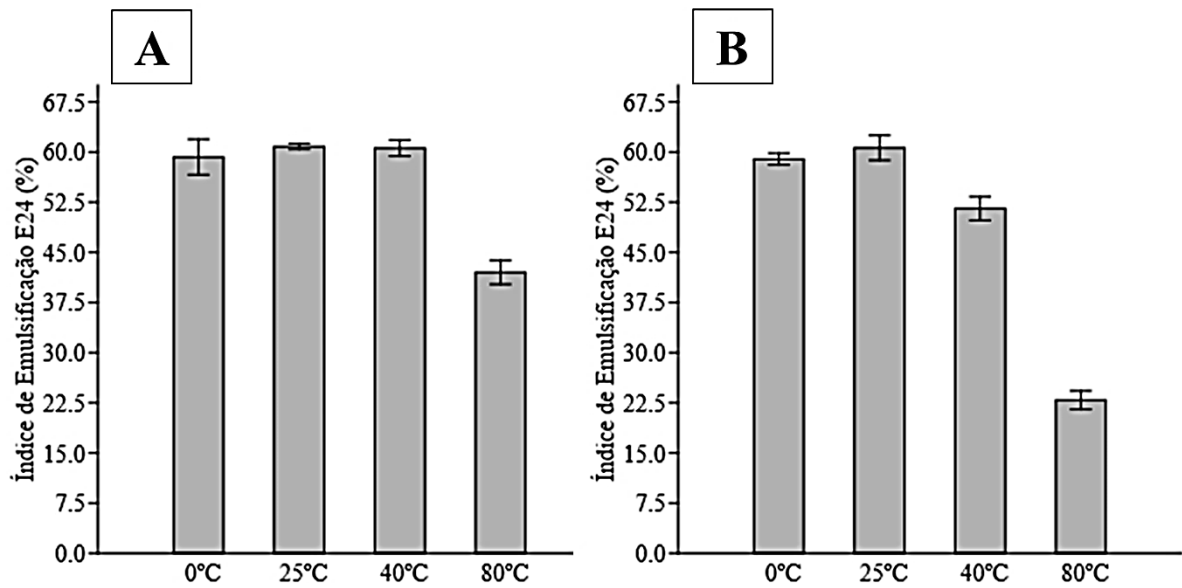


Figura 22. Avaliação da influência da temperatura na estabilidade do índice de emulsificação E₂₄ a partir do meio de cultivo contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) *Starmerella* sp. 7 TMY12.2 e (B) *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2.

5.3.3.3. Avaliação da influência da concentração de NaCl

O efeito da concentração de NaCl (M/v) na estabilidade das emulsões formadas pelas leveduras TMY12.2 e TOC03_80.2 foi avaliado no presente trabalho e está representado na Figura 23. Tanto para a levedura TMY12.2 quanto para a TOC03_80.2, as concentrações de 2% de sal não afetaram negativamente as emulsões formadas, com valores de $59,63 \pm 1,89\%$ e $60,05 \pm 1,24\%$, respectivamente. Para a concentração salina de 6%, o isolado TMY12.2 manteve um valor alto da emulsão ($49,97 \pm 1,57\%$) enquanto para a TOC03_80.2 o valor foi bem menor ($18,82 \pm 1,02\%$). Já a concentração de 10% foi a mais crítica para ambas, com valores do índice de emulsificação de $36,56 \pm 1,02\%$ para TMY12.2 e $17,19 \pm 1,39\%$ para TOC03_80.2. Isso pode ser explicado pelo fato de que as leveduras do gênero *Starmerella* utilizadas no teste foram isoladas a partir de mel de abelhas *Tubuna* e flores de ipê roxo, ambientes em que as concentrações de sal não são tão altas.

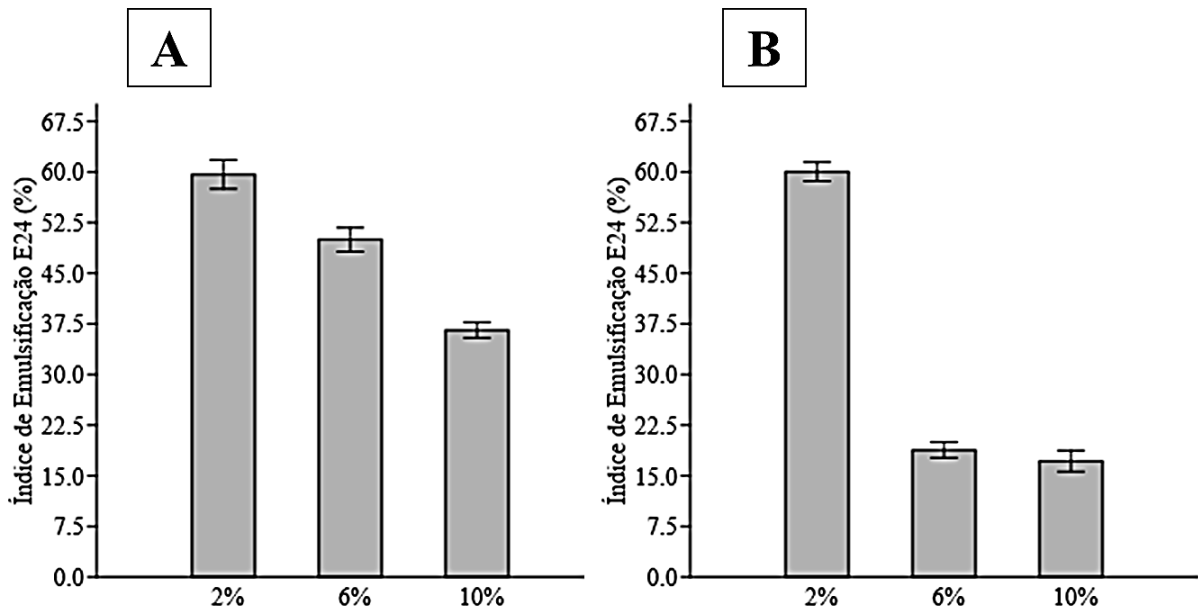


Figura 23. Avaliação da concentração de NaCl (2%, 6% e 10%) na estabilidade do índice de emulsificação E24 a partir do meio de cultivo contendo 50g/L de glicose, 50g/L de glicerol e 40g/L de farelo de arroz. Legenda: (A) *Starmarella* sp. 7 TMY12.2 e (B) *Starmarella* sp. 2 TOC03_80.2.

Embora a concentração de 10% tenha sido crítica, os valores obtidos nas concentrações de 2 e 6% permitem uma série de aplicações na indústria e em processos de biorremediação marinha. Na literatura, um resultado similar foi relatado por Lukondeh et al. (2003), que encontraram emulsões estáveis produzidas pela levedura *Kluyveromyces marxianus* em um meio contendo de 2 a 5% de NaCl. Porém, apesar de terem encontrado emulsões estáveis, nesse mesmo estudo foi relatado que à medida que a concentração de sal aumentou, a altura das emulsões diminuiu.

6 CONCLUSÕES

As espécies *Starmerella* sp. 7 TMY12.2, *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2, *Starmerella* sp. 6 UFMG-CM-Y6044 e *Starmerella* sp. 6 UFMG-CM-Y6045 se destacaram na seleção inicial, sendo capazes de produzir soforolipídios em um meio de cultivo contendo 80g/L de glicose, 40g/L de glicerol e 1g/L de extrato de levedura, além de formar emulsões estáveis após 24h e 48h, com índices de emulsificação acima de 50%. Sendo assim, essas leveduras podem ser consideradas boas produtoras de biossurfactantes a partir do meio de cultivo utilizado.

Apesar das amostras analisadas no presente trabalho terem apresentado uma redução parcial da tensão superficial, essa característica não está relacionada com a formação de emulsões, uma vez que biossurfactantes com altas características emulsionantes nem sempre reduzem drasticamente a tensão superficial do meio.

As fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo testadas no presente trabalho foram eficazes para a produção de biossurfactantes por *Starmerella* sp. 7 TMY12.2 e *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2, atingindo índices de emulsificação acima de 60% para ambas. A partir dos testes para avaliar a estabilidade das emulsões formadas frente às diversas condições de pH, temperatura e salinidade foi possível concluir que *Starmerella* sp. 7 TMY12.2 e *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2 apresentaram emulsões estáveis nos valores de pH entre 6-10 e nas temperaturas 0°C, 25°C e 40°C. Com relação à salinidade, *Starmerella* sp. 7 TMY12.2 obteve emulsões estáveis nas concentrações de 2% e 6% de NaCl e *Starmerella* sp. 2 TOC03_80.2 na concentração de 2%. Assim, conclui-se que estas espécies são promissoras para aplicações futuras envolvendo biossurfactantes.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. et al. Aplicação de subprodutos agroindustriais como fontes de nitrogênio para a produção de soforolipídios por *Starmerella bombicola*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 14875-14887, 2020.

ACCORSINI, F. et al. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate, **Brazilian Journal of Microbiology** , v. 43, n. 1, p. 116-125, 2010.

AHUEKWE, E. F. et al. Experimental Investigation of Sophorolipid Biosurfactants Produced by *Candida* and *Pleurotus* Species Using Waste Oils and Rice Bran and Their Oilfield Benefits. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 7, n.4, p. 1-15, 2016.

AL-DHABI, N. A. et al., Enhanced Production of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* Strain Al-Dhabi-130 under Solid-State Fermentation Using Date Molasses from Saudi Arabia for Bioremediation of Crude-Oil-Contaminated Soils. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n.22, p. 8446, 2020.

ALIZADEH-SANI, M. et al. Bioemulsifiers Derived from Microorganisms: Applications in the Drug and Food Industry. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 191–199, 2018.

ALMEIDA, D. G. et al. Utilização de planejamento experimental na produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* a partir de resíduos agroindustriais. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2686-2693, 2015.

AMARAL, P.; COELHO, M.; MARRUCHO, I.; COUTINHO, J. P. Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 672, p. 236-249, 2010.

ANDRADE, C. J. et al. A novel approach for the production and purification of mannosylerythritol lipids (MEL) by *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater

as substrate. **Separation and Purification Technology**, v.180, n.8, p.157-167, 2017.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, H.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 95, p. 23-29, 2012.

ARAB, F.; MULLIGAN, C.N. An eco-friendly method for heavy metal removal from mine tailings. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n.5, p. 16202–16216, 2018.

ARAÚJO, K. C. F. **Estudo de diferentes mecanismos para produção de persulfato utilizando ânodo de diamante dopado com boro**. 2016. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

ARIMA, K. et al. Surfactin, a Crystalline Peptidelipid Surfactant Produced by *Bacillus Subtillis*: Isolation, Characterization and its Inhibitor of Fibrin Clot Formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.31, n.3 p. 488-494, 1968.

ASHBY, R. D.; NUÑEZ, A.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. Sophorolipid biosynthesis from a Biodiesel co product stream. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v. 82, p. 625–630, 2005.

AZIM, A. et al. Amino acid conjugated sophorolipids: a new family of biologically active functionalized glycolipids. **Bioconjugate Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 1523–1529, 2006.

BAGES-ESTOPA, S. et al. Production and separation of a trehalolipid biosurfactant. **Biochemical Engineering Journal**, v.139, n.15, p-85-94, 2018.

BAIN & COMPANY. Potencial de diversificação da indústria química Brasileira - Relatório 4: Tensoativos. **Chamada Pública BNDES/FEP**, p. 1-52, 2014.

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

BASAK, G.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by *Cryptococcus* sp. VITGBN2 and its application on Zn(II) removal from electroplating wastewater. **Journal of Environmental Biology**, v. 35, n. 6, p. 1087-1094, 2014.

BECKER, F. et al. Engineering *Ustilago maydis* for production of tailor-made mannosylerythritol lipids. **Metabolic Engineering Communications**, v. 12, p.1-7, 2021.

BENTO, M. F.; CAMARGO, F. A.; GAYLARDE, C. C. Biossurfactantes. In MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. (org.). **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 152-184, 2008.

BEZERRA, G. O. et al. Emulsifying Capacity of Biosurfactants from *Chenopodium Quinoa* and *Pseudomonas Aeruginosa* Ucp 0992 with Focus of Application in the Cosmetic Industry. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, p. 211-216, 2020.

BHANGALE, A. et al. Production of sophorolipids synthesized on castor oil with glucose and glycerol by using *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 336–343, 2014

BHARDWAJ, G. et al. Biosurfactants from Fungi: A Review. **Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 4, n.6, p.1-6, 2013.

BHARDWAJ, G. et al. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. **Royal Society of Chemistry**, v.5, n.67, p. 54783-54792, 2015.

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

BONNICHESEN, L. et al. Lipopeptide biosurfactant viscosin enhances dispersal of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 biofilms. **Microbiology**, v.161, n.12, p. 2289–2297, 2015.

BORAH, S. N. et al. Rice based distillers dried grains with solubles as a low cost substrate for the production of a novel rhamnolipid biosurfactant having anti-biofilm activity against *Candida tropicalis*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.182, n.1, p. 1-10, 2019.

BRUMANO, L. P.; SOLER, M. F.; SILVA, S. S. Recent Advances in Sustainable Production and Application of Biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v.12, n.1, p. 31-39, 2016.

BURGOS-DÍAZ, C. et al. Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n.1, p. 195-204, 2011.

CAMERON, D.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The Mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1420–1425, 1998.

CARDOSO, F. S.; CASTRO, R. F.; BORGES, N.; SANTOS, H. Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in *Propionibacterium freudenreichii*, and their role in stress response. **Microbiology**, v. 153, p. 270–280, 2007.

CASAS, J.; OCHOA, F. G. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v. 88, n.5, p. 488-494, 1999.

CASTRO, G. R. et al. Emulsan, a tailorable biopolymer for controlled release. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4566-4571, 2008.

CERESA, C. et al. The effect of sophorolipids against microbial biofilms on medical-grade silicone. **Journal of Biotechnology**, v. 309, n.10, p. 34-43, 2020.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Role of sophorolipid biosurfactant in degradation of diesel oil by *Candida tropicalis*. **Bioremediation Journal**, v. 16, n. 1, p.19–30, 2012.

CHAVES, F. S. et al. Biosurfactant production by Antarctic-derived yeasts in sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021.

CHEN, J. et al. Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.72, n.1, p.52-59, 2006.

CIRIGLIANO, M.; CARMAN, G. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n.4, p. 846-850, 1985.

CLAUS, S.; VAN BOGAERT, I. N. A. Sophorolipid production by yeasts: a critical review of the literature and suggestions for future research. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 21, p.7811–7821, 2017.

CLEMENTS, T. et al. Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. **Microbiological Research**, v.229, p. 1-10, 2019.

COELHO, M. A.; AMARAL, P.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: An industrial workhorse. **Current research, technology and education topics. Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 930-944, 2010.

COOPER, D. et al. Production of Surface-Active Lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n.1, p. 4-10, 1979.

COOPER, D.; GOLDENBERG, B. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n.2, p. 224-229, 1987.

CORTÉS-SÁNCHEZ, A. D. J. Surfactants of microbial origin and its application in foods. **Scientific Research and Essays**, v. 15, n.1, p. 11-17, 2020.

CSUTAK, O.; STOICA, I.; VASSU, T. Evaluation of production, stability and activity of biosurfactants from yeasts with application of bioremediation of oil-polluted environment.

Revista de Chimie, v. 63, n. 10, p. 973–977, 2012.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23-32, 2008.

DAILIN, D. J. et al. **Microbial Surfactants Volume 1: Production and Applications**. Boca Raton and Oxon: Taylor & Francis Group, LLC, 2021. p. 196-221.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011. p. 1-43.

DAVAREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n.1, p. 246-253, 2010.

DAVE, N.; JOSHI, T. A. Concise Review on Surfactants and Its Significance. **International Journal of Applied Chemistry**, vol. 13 n. 3. p. 667-668, 2017.

DE CLERQ, V. et al. Elucidation of the Natural Function of Sophorolipids Produced by *Starmerella bombicola*. **Journey of Fungi**, v.7, n.917, p. 1-27, 2021.

DE GRAEVE, M.; DE MAESENEIRE, S. L.; ROELANTS, S. L. K. W.; SOETAERT, W. *Starmerella bombicola*, an industrially relevant, yet fundamentally underexplored yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 7, p. 1-13, 2018.

DELBEKE, E. I. P. et al. Synthesis and biological evaluation of bolaamphiphilic sophorolipids **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.6, n. 7, p. 8992–9005, 2018.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 641-646, 2004.

DENG, Y. et al. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and

polymyxin B6 produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9. **Peptides**, v. 32, n. 9, p. 1917-1923, 2011.

DEVELTER, D.; FLEURACKERS, S. A method for the production of short chained glycolipids. **European Patent**, EP20070101581, 2007.

ELSHAIFE, A. E. et al. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n.1324, p. 1-11, 2015.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química nova escola**, v. 39, n. 3, p. 228-236, 2017.

FENG, L. et al. Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid. **Environmental Pollution**, v. 273, p.1-8, 2021.

FENIBO, E. O.; DOUGLAS, S. I.; STANLEY, H. O. A Review on Microbial Surfactants: Production, Classifications, Properties and Characterization. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 18, n. 3, p.1-22, 2019.

FENIBO, E.O. et al. Microbial Surfactants: The Next Generation Multifunctional Biomolecules for Applications in the Petroleum Industry and Its Associated Environmental Remediation. **Microorganisms**, v. 7, n. 581, p. 1-29, 2019.

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

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**. v. 25, p. 1-9, 2015.

FU, H.Y. et al. Research on the ultrafiltration and removal of aniline via the compound of sophorolipid and rhamnolipid. **IOP Conference Series: Earth and Environmental**

Science, v. 146, n.012071, p. 1-9, 2018.

GALDAMEZ, E. V. C.; CARPINETTI, L. C. R. Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos no processo de injeção plástica. **Gestão & Produção**, v. 11, n. 1, p. 121-134, 2004.

GAUR, V. K. et al. Rhamnolipids from *Planococcus* spp. and their mechanism of action against pathogenic bacteria. **Bioresource Technology**, v. 307, 123206, p.1-7, 2020.

GEETHA, S. J. et al. Biosurfactants: production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p.23–32, 2018.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 66–72, 2014.

GREEK, B. F. Detergent Industry Ponders Products for New Decade. **Chemical & Engineering News**, v. 68, n. 5, p. 37–60, 1990.

GROSS, R.A. et al. Modified sophorolipids as oil solubilizing agents. **U.S. Patent** n°. 9650405, 2017.

HAQUE, F. et al. Anti-biofilm activity of a sophorolipidamphotericin B niosomal formulation against *Candida albicans*. **Biofouling**, v. 33, n. 9, p. 768-779, 2017.

HENKEL, M. et al. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p.1207–1219, 2012.

INOUE, S.; MIYAMOTO, N. Process for producing a hydroxyfatty acid ester. **US Patent** 4201844, 1980.

JEZIERSKA, S.; CLAUS, S.; VAN BOGAERT, I. Yeast glycolipid biosurfactants. **FEBS letters**, v. 592, n. 8, p. 1312–1329, 2017.

JOHNSON, P. et al. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.288, n. 102340, p. 1-11, 2021.

JOSHI-NAVARE, K. et al. Jatropha Oil Derived Sophorolipids: Production and Characterization as Laundry Detergent Additive. **Biochemistry Research International**, v. 1, n. 169797, p.1-11, 2013.

KAPPELI, O.; FINNERTY, W. R. Partition of Alkane by an Extracellular Vesicle Derived from Hexadecane-Grown *Acinetobacter*. **Journal of Bacteriology**, v. 140, n2, p. 707-712, 1979.

KAUR, G. et al. Efficient sophorolipids production using food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 232, p.1-11, 2019.

KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311–318, 2012.

KIM, J. et al. Enhancement of sophorolipids production in *Candida batistae*, an unexplored sophorolipids producer, by fed-batch fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 831-839, 2021.

KIRAN, S. et al. Optimization and characterization of rhamnolipid biosurfactant from sponge associated marine fungi *Aspergillus* sp. MSF1. **Desalination and Water Treatment**, v. 24, p.257-265, 2010.

KOKAL, S. et al. Crude Oil Emulsions: A State-Of-The-Art Review. **SPE Production & Facilities**, v. 20, n.1, p.5-13, 2005.

KONISHI, M. et al. Isolation of yeast candidates for efficient sophorolipids production: their production potentials associate to their lineage. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n. 10, p. 1-7, 2016.

KONISHI, M. et al. Efficient Production of Acid-Form Sophorolipids from Waste Glycerol and Fatty Acid Methyl esters by *Candida floricola*. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 4, p. 489-496, 2018.

KONISHI, M.; YOSHIDA Y.; HORIUCHI, J. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 317-322, 2015.

KURTZMAN, C. P.; PRICE, N. P. J.; RAY, K. J.; KUO, T., Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade, **FEMS Microbiology Letters**, v. 311, n. 2, p.140-146, 2010.

LACHANCE, M.-A. Chapter 71 - *Starmerella* Rosa & Lachance (1998). **The Yeasts (Fifth Edition)**, Elsevier, p. 811-815, 2011.

LIN, Y. et al. Rational high-throughput screening system for high sophorolipids production in *Candida bombicola* by co-utilizing glycerol and glucose capacity. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n.17, p. 1-9, 2019.

LIU, K. et al. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 45, p.57–67, 2020.

LO, C-M.;JU, L-K. Sophorolipids-induced cellulase production in cocultures of *Hypocrea jecorina* Rut C30 and *Candida bombicola*. **Enzyme Microb Technol**, v. 44, n. 2, p. 107–111, 2009.

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

LUKONDEH, T. et al. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 715–720, 2003.

LUNA, J. M. et al. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**. v. 6, n. 2, p. 209-215, 2008.

MARCELINO, P.R.F. et al. Sustainable Production of Biosurfactants and Their Applications. In **Lignocellulosic Biorefining Technologies** (ed INGLE, A. P.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S.S.), John Wiley & Sons, p. 159-183, 2020.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 5., p. 1-19, 2011.

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.

MARKANDE, A. et al. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. **Bioresource Technology**, v. 330, n. 124963, p. 1-11, 2021.

MARTINO, C. et al. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 67, p. 15-20, 2012.

MCNEILL, J.; TURLAND, N. Major changes to the *Code of Nomenclature* - Melbourne, July 2011. **Taxon**, v. 60, n. 5, p. 1495-1497, 2011.

MIR, S. et al. Microbial Surface Tensio-active Compounds: Production and Industrial Application Perspectives: A Review. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v.3, n. 8, p. 282-301, 2017.

MISHRA, A. et al. Optimization of process inputs for the synthesis of waste rice bran oil isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 424 biosurfactant using response surface methodology for oil recovery applications. **Bioresource Technology Reports**, v.14, n.100653, 2021.

MISHRA, A.; TRIVELDI, R. K. A comparative study of biosurfactant preparation by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 424 using rice bran oil and soybean oil substrates. **Journal Indian Chemical Society**, v. 97, n. 11b, p. 2501-2515, 2020.

MOHANTY, S. S., et al. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. **Microbial Cell Factories**, v.20, n. 120, p. 1-13, 2021.

MONTEIRO, A. S. et al. Identification and characterization of bioemulsifier producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5186–5193, 2010.

MONTEIRO, L. S. **Utilização do Farelo de Arroz com e sem Fermentação na Produção do Rotífero *Brachionus plicatilis***. 2020. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MORITA, T. et al. Accumulation of cellobiose lipids under nitrogen-limiting conditions by two ustilaginomycetous yeasts, *Pseudozyma aphidis* and *Pseudozyma hubeiensis*. **FEMS Yeast Research**, v.13, n.1, p.44-49, 2013.

NAKAMA, Y. Chapter 15 - Surfactants. In: SAKAMOTO, K., LOCHHEAD, R. Y., MAIBACH, H. I., YAMASHITA, Y (org). **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**. Japan: Elsevier, 2017. p. 231–244.

NAPOLITANO, L.M. Sophorolipids in sepsis: antiinflammatory or antibacterial? **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 1, p.258–259, 2006.

NESMERÁK, K.; NEMCOVÁ, I. Determination of critical micelle concentration by electrochemical means. **Analytical Letters**, v. 39, n. 6., p.1023-1040, 2006.

NIKOLOVA, C.; GUTIERREZ, T. Biosurfactants and Their Applications in the Oil and Gas Industry: Current State of Knowledge and Future Perspectives. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.9, n.626639, p. 1-19, 2021.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends In Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 252-259, 2007.

NITSCHKE, M.; SILVA, S. S. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 631-638, 2017.

OLIVEIRA, M. et al. Biosynthesis And Production Of Sophorolipids. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 3, n. 11, p.133-146, 2014.

OLIVEIRA, J. G. **Utilização de melão, manipueira e soro de queijo como substratos para produção de biosurfactante por *Bacillus pumilus* e sua aplicação em biorremediação de solo**. 2014. Tese de Doutorado, 98f. Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

OSTENDORF, T. et al. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. **Journal of Biotechnology**, v. 295, p. 71-79, 2019.

OZTURK, B.; MCCLEMENTS, D. J. Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 1–6, 2016.

PALLADINO, F. **Avaliação da produção de xilitol em hidrolisado de biomassa lignocelulósica por novos isolados de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis***, 2018. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PELLECIER, F.; ANDRÉ, P. Cosmetic use of sophorolipids as subcutaneous adipose cushion regulation agents and slimming application. **World Patent: WO2004108063**, 2004.

PEREIRA, D. D. F.; DUVOISIN JR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. O Estudo da produção

de biossurfactantes por fungos amazônicos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 4, p.0688-0695, 2017.

PHULPOTO, I., A. et al. Effect of natural microbiome and culturable biosurfactants-producing bacterial consortia of freshwater lake on petroleum-hydrocarbon degradation. **Science of The Total Environment**, v.751, n.141720, p.1-11, 2021.

RAMALINGAM, V. et al. Production and structure elucidation of anticancer potential surfactin from marine actinomycete *Micromonospora marina*. **Process Biochemistry**, v.78, p. 169-177, 2019.

ROSA, C. A. et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 271–275, 2003.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tulloch) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1413-1417, 1998.

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

SANTOS, A. R. O. et al. *Starmerella camargoi* f.a., sp. nov., *Starmerella ilheusensis* f.a., sp. nov., *Starmerella litoralis* f.a., sp. nov., *Starmerella opuntiae* f.a., sp. nov., *Starmerella roubikii* f.a., sp. nov. and *Starmerella vitae* f.a., sp. nov., isolated from flowers and bees, and transfer of related *Candida* species to the genus *Starmerella* as new combinations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1333-1343, 2018.

SANTOS, D. K. F. A. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SÁENZ-MARTA, C. I. et al. Biosurfactants as Useful Tools in Bioremediation. **Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil**, p. 93-109, 2015.

SALAZAR-BYRAM, A. M. **Aproveitamento de Glicerol Residual como Fonte de Carbono para Produção de Rhamnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

SANADA, H. et al. Antifungal effect of non-woven textiles containing polyhexamethylene biguanide with sophorolipid: a potential method for *Tinea pedis* prevention. **Healthcare**, v.2, p.183–191, 2014.

SATPUTE, S. K.; PLAZA, G. A.; BANPURKAR, A. G. Biosurfactants' Production from Renewable Natural Resources: Example of Innovative and Smart Technology in Circular Bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 25, n. 1, p. 46-54, 2017.

SAWANT, R. et al. **Microbial Surfactants Volume 1: Production and Applications**. Boca Raton and Oxon: Taylor & Francis Group, LLC, 2021. p. 264-286.

SCHELGES, H.; TRETYAKOVA, M., LUDWIG, B. Cleansing agents containing biosurfactants and having prebiotic activity. **U.S. Patent Application** N°. 15/254554, 2017.

SCHELGES, H.; TRETYAKOVA, M., LUDWIG, B. PEG-free cosmetic cleansing agents comprising biosurfactants. **U.S. Patent Application** N°. 15/254512, 2017.

SHAH, M. U. H. et al. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. **Biochemical Engineering Journal**, v.127, n.15, p.60–67, 2017.

SEN, S. et al. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n.95, p. 1-14, 2017.

SHAH, M. U. H. et al. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. **Biochemical Engineering Journal**, v.127, n.15, p.60–67,

2017.

SHAH, V. et al. Utilization of Restaurant Waste Oil as a Precursor for Sophorolipid Production. **Biotechnology Progress**, v.23 , p.512–5115, 2007.

SHAKERI, F. et al. Production and Application of Biosurfactants in Biotechnology. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 10446-10460, 2021.

SHATILA, F. et al. Screening of Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica* Strains and Evaluation of Their Antibiofilm and Anti-Adhesive Activities against *Salmonella enterica* ser. enteritidis Biofilms. **Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 839–847, 2021.

SHEKHAR, S.; SUNDARAMANICKAM, A.; BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 14, p. 1522-1554, 2015.

SILVA, J. F. et al. Bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica* using residual glycerol as a carbon source. **Journal of Environmental Analysis and Progress** v.5, n.1, p.031-037, 2020.

SILVA, S.N.R.L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.79, n.1, p. 174-183, 2010.

SLEIMAN, J. N. et al. Sophorolipids as antibacterial agents. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v.39, n.1, p.60–63, 2009.

SOURAV, D., SUSANTA, M., GHOSH, A., SAHA, R., SAHA, B. A. A review on natural surfactants. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 65757–65767, 2015.

SOUZA, F. A. S. D. et al. Production of Bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in Sea Water using Diesel Oil as the Carbon Source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 01, p. 61 - 67, 2012.

SPENCER, J. F. T.; GORIN, P. A. J.; TULLOCH, A. P. *Torulopsis bombicola* sp. n. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 36, n. 1, p. 129–133, 1970.

STOYANOV S. D. et al. Novel surface tension isotherm for surfactants based on local density functional theory. **Physical Review Letters**, v. 91, n. 8, 2003.

UZOIGWE C.; BURGESS J. G.; ENNIS C. J.; RAHMAN P. K. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 245, 2015.

VAN BOGAERT, I. N. A. et al. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23–34, 2007.

VAN BOGAERT, I. N. A.; SOETAERT, W. Sophorolipids. In: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (org) Biosurfactants. **Microbiology Monographs**, v. 20, p. 179–210, 2011.

VAN RENTERGHEM, L. V. et al. From lab to market: An integrated bioprocess design approach for new-to-nature biosurfactants produced by *Starmerella bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 1195-1206, 2018.

VARJANI, S. J; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, p.389-397, 2017.

VARVARESOU, A.; LAKOVOU, K . Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, p. 214-223, 2015.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. M. Remediation of soil contaminated with copper using Rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 using waste frying rice bran oil. **Annals of Microbiology**, v. 62, p.85-91, 2012.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. M. The effect of medium composition on the production of sophorolipids and the tensiometric properties by *Starmerella bombicola* MTCC 1910. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 12, n. 2., p. 9-13, 2010.

VIEIRA, I. M. M. et al. An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p.1-18, 2021.

VIEIRA, D. P. et al. Soforolipídios: Síntese, aplicações e desafios para o desenvolvimento de uma economia mais sustentável. **Revista Metodologias e Aprendizado**, v. 4, p. 45-59, 2021

WADEKAR, S. D. et al. Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v.42, n.2, p.125-42, 2012.

WANG, H. et al. *Starmerella bombicola*: recent advances on sophorolipids production and prospects of waste stream utilization. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, p. 999-1007, 2018.

WANG, H. et al. Techno-economic evaluation of a biorefinery applying food waste for sophorolipid production – a case study for Hong Kong. **Bioresource Technology**, v. 303, n. 122852, p. 1-36, 2020.

WU, J-I. et al. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1157-1164, 2008.

YARROW, D.; MEYER, S. A. Proposal for amendment of the diagnosis of the genus *Candida* Berkhout nom. cons. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, n. 4, p. 611–615, 1978.

YAKIMOV, M. M. et al. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov, sp. nov. a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 339-348, 1998.

YALAOUI-GUELLAL, D. et al. The petroleum-degrading bacteria *Alcaligenes aquatilis* strain YGD 2906 as a potential source of lipopeptide biosurfactant. **Fuel**, v. 285, n.

119112, p. 1-7, 2021.

ZERHUSEN, C. et al. Microbial Synthesis of Nonionic Long-Chain Sophorolipid Emulsifiers Obtained from Fatty Alcohol and Mixed Lipid Feeding. **European Journal Lipid Science and Technology**, v. 122, n. 1, p. 1-12, 2019.