

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Karine Marques Lento de Freitas



RESÍDUO SÓLIDO DE JUNÇA PARA A PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE POR *YARROWIA LIPOLYTICA*

RIO DE JANEIRO

2023

Karine Marques Lento de Freitas

RESÍDUO SÓLIDO DE JUNÇA PARA A PRODUÇÃO DE BIODERIVADO POR
Yarrowia lipolytica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Orientador(es): Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Fabiane Ferreira dos Santos

Rio de Janeiro

2023

CIP - Catalogação na Publicação

F866r Freitas, Karine Marques Lento de
RESÍDUO SÓLIDO DE JUNÇA PARA A PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE POR YARROWIA LIPOLYTICA / Karine
Marques Lento de Freitas. -- Rio de Janeiro, 2023.
68 f.

Orientadora: Priscilla Filomena Fonseca Amaral.
Coorientadora: Fabiane Ferreira dos Santos.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de
Química, Bacharel em Engenharia Química, 2023.

1. Yarrowia lipolytica. 2. levedura. 3.
biossurfactante. 4. junça. 5. milhocina. I. Amaral,
Priscilla Filomena Fonseca, orient. II. Santos,
Fabiane Ferreira dos, coorient. III. Título.

Karine Marques Lento de Freitas

RESÍDUO SÓLIDO DE JUNÇA PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR
Yarrowia lipolytica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Química da Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Engenheiro(a) Químico.

Aprovado em 21 de Dezembro de 2023.

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc., UFRJ

Fabiane Ferreira dos Santos, D. Sc., UFRJ

Rodrigo da Rocha Olivieri de Barros, D. Sc., UFRJ

Jonas de Jesus Gomes da Costa Neto, D. Sc., UFRJ

Rio de Janeiro

2023

Em memória de Maria de Lourdes.

AGRADECIMENTOS

É com imensa gratidão que expresso meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho de conclusão de curso.

Primeiramente, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Priscilla Amaral, pela orientação dedicada e valiosos insights ao longo deste percurso acadêmico. Sua paciência, expertise e incentivo foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. E também à Fabiane Santos, minha tutora, orientadora de IC, coorientadora de TCC, “mãe”, amiga, incentivadora, sem você e todas as horas dedicadas a este trabalho (inclusive aos sábados) nada disso teria sido possível.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo apoio incondicional e compreensão nos momentos desafiadores. Minha mãe, que foi minha maior incentivadora e também quem “puxou minha orelha” nas horas necessárias, quem desde o início confiou e acreditou em mim. À Roberta, mais conhecida como “Bob” por todo carinho e atenção dedicados a mim e à Deniza ou “Dê” que sempre esteve por perto cuidando de mim.

Aos amigos da faculdade que se tornaram amigos de vida, Amanda, Adryena, Gustavo ou “Sushi” e Marianne, que compartilharam desesperos, alegrias, experiências, conhecimentos e incentivaram-me nas etapas mais exigentes. A jornada acadêmica foi muito mais leve com vocês do meu lado, seja nos momentos mais críticos em provas, trabalhos e estudos, mas também nos momentos de alegria, como as famosas “boom’s”, calouradas e pizzas no laboratório. Essa etapa de nossas vidas foi enriquecida pela presença de cada um de vocês, e sou extremamente grata pela nossa amizade.

Agradeço também aos professores e funcionários da instituição, cujo comprometimento e dedicação ao ensino proporcionaram um ambiente propício para o aprendizado e crescimento pessoal. Em especial ao Marcos e Nanci, que foram essenciais para a companhia e leveza que o laboratório E123 me trazia. Agradeço também a todos os membros do E123 que se tornaram mais do que apenas colegas de trabalho, em especial ao Adejanildo ou “Deja” que se tornou um grande amigo e companheiro de conversas.

Às fontes de financiamento ou bolsas de estudo que viabilizaram este projeto, CNPq e FAPERJ o meu sincero reconhecimento. Sem esse suporte, este trabalho não teria sido possível.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho. Cada ajuda, palavra de incentivo e gesto amigável foram essenciais para o meu sucesso acadêmico.

Que este trabalho seja não apenas um reflexo do meu esforço, mas também uma celebração da colaboração e apoio que recebi ao longo desta jornada.

Muito obrigado a todos!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

RESUMO

MARQUES LENTO DE FREITAS, Karine. **Resíduo Sólido de Junça para a Produção de Biossurfactante por *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A produção de biossurfactantes destaca-se como alternativa sustentável aos surfactantes sintéticos, buscando reduzir o impacto ambiental. A matéria-prima, representando cerca de 50% dos custos totais, motiva a pesquisa de fontes de baixo custo, notadamente resíduos agroindustriais. Nesse contexto, o estudo foca na produção de biossurfactantes pela cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando resíduos agroindustriais, como resíduo de junça e milhocina, como matérias primas alternativas. A ênfase recai na viabilidade econômica e no menor impacto ambiental proporcionados por esses resíduos. O cultivo foi conduzido a 28°C, com agitação de 250 rpm, ao longo de 96 horas. Durante o processo fermentativo, foram monitorados a concentração celular, a atividade emulsificante e o pH a cada 24 horas. Os resultados revelaram que todos os resíduos testados apresentaram-se promissores como fontes de carbono e nitrogênio, alcançando aproximadamente 60% de índice de emulsificação. Notavelmente, o uso de resíduo de junça e milhocina resultou em uma produção de biossurfactante de 60% nas primeiras 48 horas. Ampliando a escala, o estudo avaliou a produção em biorreatores, utilizando resíduos industriais da junça e milhocina. No entanto, desafios foram enfrentados, como a adesão de grânulos de junça na membrana, impactando negativamente o crescimento celular. Em resumo, os resultados indicam que resíduos agroindustriais, como resíduo de junça e milhocina, são eficazes e econômicos para a produção de biossurfactantes por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, representando um avanço significativo na pesquisa de bioprodutos com potencial sustentável.

Palavras-chave: *Yarrowia lipolytica*; levedura; biossurfactante; junça; milhocina.

ABSTRACT

MARQUES LENTO DE FREITAS, Karine. **Resíduo Sólido de Junça para a Produção de Biossurfactante por *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The production of biosurfactants stands out as a sustainable alternative to synthetic surfactants, aiming to reduce environmental impact. The raw material, representing approximately 50% of total costs, motivates the research for low-cost sources, notably agro-industrial residues. In this context, the study focuses on biosurfactant production by the *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 strain, using agro-industrial residues such as tiger nuts waste and corn steep liquor as alternative raw materials. The emphasis is on economic viability and the reduced environmental impact provided by these residues. Cultivation was conducted at 28°C with agitation at 250 rpm over 96 hours. During the fermentation process, cellular concentration, emulsifying activity, and pH were monitored every 24 hours. The results revealed that all tested residues showed promise as carbon and nitrogen sources, achieving approximately a 60% emulsification index. Remarkably, the use of tiger nuts waste and corn steep liquor resulted in a biosurfactant production of 60% within the first 48 hours. Scaling up, the study evaluated production in bioreactors using industrial residues from tiger nuts and corn steep liquor. However, challenges were faced, such as the adhesion of tiger nuts granules to the membrane, negatively impacting cellular growth. In summary, the results indicate that agro-industrial residues, such as tiger nuts waste and corn steep liquor, are effective and economical for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, representing a significant advancement in the research of bioproducts with sustainable potential.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; yeast, biosurfactant; tiger nuts; corn steep liquor

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagem de microscopia ótica de *Yarrowia lipolytica* (aumento de 1000x)

Figura 2: Imagem de tubérculos de *Tiger nuts* ou “junça”

Figura 3: Imagem do resíduo sólido da junça ou “tiger nuts fiber”

Figura 4: Imagem de Milhocina ou “corn steep liquor”

Figura 5: Médias do crescimento celular do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio + extrato de lêvedo), e milhocina 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L em substituição ao extrato de lêvedo e resíduo sólido de junça (RJS) em substituição a glicose e glicerol

Figura 6: Médias do índice de emulsificação do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio + extrato de lêvedo), e milhocina 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L em substituição ao extrato de lêvedo e resíduo sólido de junça (RJS) em substituição a glicose e glicerol

Figura 7: Médias do pH do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio + extrato de lêvedo), e milhocina 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L em substituição ao extrato de lêvedo e resíduo sólido de junça (RJS) em substituição a glicose e glicerol

Figura 8: Médias do crescimento celular do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios: Sulfato de amônio (Sulfto Amo); Sulfato de Amônio (SAM) + Resíduo sólido de junça (RJ) e milhocina (MCNA) 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L

Figura 9: Médias do índice de emulsificação do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios: Sulfato de amônio (Sulfto Amo); Sulfato de Amônio (SAM) + Resíduo sólido de junça (RJ) e milhocina (MCNA) 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L

Figura 10: Médias do pH do meio de cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios: Sulfato de amônio (Sulfto Amo); Sulfato de Amônio (SAM) + Resíduo sólido de junça (RJ) e milhocina (MCNA) 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L

Figura 11: Médias do crescimento celular do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio + extrato de lêvedo), milhocina 5,0 g/L com resíduo sólido de junça (RJS) e resíduo líquido de junça (RJL).

Figura 12: Médias do pH do meio de cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio + extrato de lêvedo), milhocina 5,0 g/L com resíduo sólido de junça (RJS) e resíduo líquido de junça (RJL).

Figura 13: Médias do índice de emulsificação do meio de cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio + extrato de lêvedo), milhocina 5,0g/L com resíduo sólido de junça (RJS) e resíduo líquido de junça (RJL).

Figura 8: Médias do crescimento celular e pH da *Y. lipolytica* após 72 h de fermentação em biorreator de 5L com contactores de membrana para produção utilizando resíduo sólido de junça (RJS) 10 g/L e milhocina (MCNA) 5,0 g/L.

Figura 9: Médias do índice de emulsificação da *Y. lipolytica* após 72 h de fermentação em biorreator de 5L com contactores de membrana para produção utilizando resíduo sólido de junça (RJS) 10 g/L e milhocina (MCNA) 5,0 g/L.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.

Tabela 2 - Composição da milhocina

Tabela 3 - Composição do resíduo sólido de junça, RJS.

Tabela 4. Resultado da ANOVA para o crescimento celular obtido no planejamento fatorial 7x5x3.

Tabela 5. Resultado da ANOVA para o índice de emulsificação obtido no planejamento fatorial 7x5x3.

Tabela 6. Resultado da ANOVA para o pH obtido no planejamento fatorial 7x5x3.

Tabela 7. Resultado da ANOVA para o crescimento celular obtido para produção de biossurfactante com sulfato de amônio e resíduos (controle 2) em diferentes tempos de fermentação.

Tabela 8. Resultado da ANOVA para o índice de emulsificação obtido para produção de biossurfactante com sulfato de amônio e resíduos (controle 2) em diferentes tempos de fermentação.

Tabela 9. Resultado da ANOVA para o pH obtido para produção de biossurfactante com sulfato de amônio e resíduos (controle 2) em diferentes tempos de fermentação.

Tabela 10. Resultado da ANOVA para o crescimento celular obtido para produção de biossurfactante com diferentes meios de produção (resíduos de junça) em diferentes tempos de fermentação.

Tabela 11. Resultado da ANOVA para o pH obtido para produção de biossurfactante com diferentes meios de produção (resíduos de junça) em diferentes tempos de fermentação.

Tabela 12. Resultado da ANOVA para o índice de emulsificação obtido para produção de biossurfactante com diferentes meios de produção (resíduos de junça) em diferentes tempos de fermentação.

Tabela 13. Custo dos meios utilizados para produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*: meios controle (CT) e resíduo sólido de junça (RSJ).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAGR	<i>Compound Annual Growth Rate</i> ou Taxa de crescimento anual composta
CMC	Concentração Micelar Crítica
TNF	<i>Tiger Nut Fiber</i>
YPD	Yeast Peptone Dextrose ou extrato de levedura, peptona e glicose
MCNA	Milhocina
RJS	Resíduo Sólido de Junça
RJL	Resíduo Líquido de Junça
UV	Radiação Ultravioleta
IE	Índice de emulsificação
CT	Controle
SAM	Sulfato de Amônio
MP	Meio de Produção

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	Mililitro
L	Litro
g/L	Gramas/Litro
rpm	Rotação por minuto
h	Hora
mg	miligrama
°C	Temperatura – Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. OBJETIVOS	20
1.1.1. OBJETIVO GERAL	20
1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. SURFACTANTES.....	20
2.2. TENSÃO SUPERFICIAL	21
2.3. BIOSSURFACTANTES	22
2.3.1. Propriedades dos Biossurfactantes	22
2.3.2. Microrganismos produtores de biossurfactante.....	23
2.3.3. <i>Yarrowia lipolytica</i>	24
2.4. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE A PARTIR DE FONTES RENOVÁVEIS	25
2.3.4.1. Subprodutos da produção de leite de junça.....	26
2.3.4.2. Milhocina	28
2.5. Aplicação dos Biossurfactantes	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. MICRO-ORGANISMO	30
3.2. MATERIAIS.....	30
3.3. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE	30
.....	30
3.4. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE	31
3.4.1. Pré-inóculo	31
3.4.2. Produção de Biossurfactante em Erlenmeyer.....	31
3.4.3. Produção de Biossurfactante em Biorreator	32
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	32
3.5.1. Concentração celular	32
3.5.2. pH.....	33
3.5.3. Índice de emulsificação	33
3.5.4. Composição centesimal dos subprodutos agroindustriais.....	33
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	34

4.2. SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MILHOCINA.....	35
4.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE COM RESÍDUOS DE JUNÇA SÓLIDO E LÍQUIDO.....	45
4.4. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE EM BIORREATOR COM CONTACTORES DE MEMBRANA.....	49
4.5. RELAÇÃO DE CUSTOS DE PRODUÇÃO.....	51
5. CONCLUSÕES	53
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A busca por alternativas sustentáveis aos derivados de petróleo tem ganhado impulso devido à crescente demanda por surfactantes, que são compostos anfifílicos com amplas aplicações em diversas indústrias. Esses agentes desempenham papéis cruciais na indústria alimentícia, farmacêutica, petroquímica e em produtos de uso diário (Araujo et al., 2013). Com sua versatilidade reconhecida, os surfactantes modificam propriedades de superfície, estabilizam dispersões e aprimoram a solubilidade de compostos hidrofóbicos (Schramm et al., 2003). Em avanços recentes, observa-se o uso desses compostos em nanotecnologia, desempenhando um papel crucial ao estabilizar nanomateriais e contribuir para a produção controlada de nanopartículas (Shaban et al., 2020).

Os biossurfactantes, compostos anfifílicos produzidos por microrganismos, surgem como alternativas promissoras devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e origem renovável (Alves et al., 2017). No entanto, a adoção é limitada pelos custos de produção, especialmente substratos dispendiosos e métodos de recuperação ineficientes, com o meio de cultivo representando cerca de 50% dos custos (Makkar & Cameotra, 2002). Além de benefícios como aprimorar a recuperação de petróleo e atuar como dispersantes em derramamentos de óleo na indústria de petróleo e gás (Nikolova & Gutierrez, 2021), os biossurfactantes têm potencial em setores como agricultura, cuidados pessoais e alimentos (Drakontis & Amin, 2020).

Uma série de resíduos agroindustriais têm sido utilizados com sucesso para a produção de biossurfactantes por microrganismos. Yáñez-Ocampo et al. (2017) demonstrou o uso de resíduos de óleo de cozinha e águas residuais de café, enquanto Rajasimman et al. (2021) destacou o potencial da fibra de trigo, fibras de arroz, farelo de cevada, resíduos de batata e resíduos de farinha de mandioca. Saravanan e Vijayakumar (2014) expandiram ainda mais esta lista para incluir óleo de rícino usado, óleo de coco, óleo de milho, óleo de motor, azeite, oleína, óleo de colza, óleo de girassol, farelo de cevada, resíduos de farinha de mandioca, bolo de amendoim, farelo de arroz e farelo de trigo.

As *tiger nuts*, também conhecidas como chufa ou junça (*Cyperus esculentus*), são tubérculos de alto valor nutricional, incluindo fibras, proteínas e açúcares (Sánchez-Zapata et al., 2012). Esses tubérculos são utilizados na produção de “*horchata de chufa*”, uma bebida proveniente do extrato hidrossolúvel comum na Espanha, e têm aplicações potenciais na indústria alimentícia, farmacêutica e na geração de biocombustíveis (Adenowo & Kazeem, 2020). Os subprodutos da junça, como o óleo, podem ser usados para desenvolver novos

produtos saudáveis (Roselló-Soto et al., 2018). Além disso, a junça pode ser utilizada como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes por microrganismos, que possuem características semelhantes aos surfactantes químicos (Audu et al., 2019).

A milhocina ou “*corn steep liquor*” é um subproduto do processo de moagem úmida do milho, rico em matéria orgânica e nutrientes, tornando-o um recurso valioso para diversas aplicações (Zhou et al., 2022). Tem sido utilizada como meio de cultura para a produção de desferrioxamina B em *Streptomyces pilosus*, um sideróforo com aplicações clínicas (Chiani et al., 2010). A biodisponibilidade de aminoácidos na milhocina tem sido estudada no contexto de bioprocessos, com foco na sua liberação durante a fermentação (Hofer, 2018). Além disso, a milhocina tem sido utilizada como meio de cultura para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, com a adição de certos metais que aumentam a produção de biossurfactantes (Gudiña et al, 2015).

Yarrowia lipolytica, uma levedura não-convencional, tem se mostrado uma produtora versátil de biossurfactantes, com a capacidade de utilizar diversos recursos renováveis, como glicerol bruto e suco de caju clarificado (Fontes et al., 2012). Esses biossurfactantes demonstraram possuir atividades antibiofilme e antiadesivas contra biofilmes de *Salmonella enterica* sorovar *Enteritidis* (Shatila et al., 2021). Além disso, foi demonstrado que *Y. lipolytica* produz biossurfactantes durante a biodegradação de n-parafinas, isoprenoides e hidrocarbonetos aromáticos do petróleo bruto (Ferreira et al., 2022). A produção de lactonas, um grupo de compostos de interesse para a indústria de aromas, também foi explorada em *Y. lipolytica*, com foco na biotransformação de metil ricinoleato para γ -decalactona (Waché et al., 2003).

Este trabalho concentra-se na avaliação da produção de biossurfactantes pela cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando resíduos agroindustriais, como junça e milhocina, como fontes alternativas de carbono e nitrogênio. A escolha desses resíduos baseia-se em sua riqueza nutricional, representando uma estratégia inovadora para reduzir custos e promover a sustentabilidade no processo de produção de biossurfactantes.

Explorando o potencial da levedura *Yarrowia lipolytica* e utilizando resíduos agroindustriais como substratos, este estudo visa superar os desafios econômicos associados à produção de biossurfactantes, contribuindo para avanços significativos na pesquisa de bioprodutos sustentáveis. A análise das condições de cultivo e avaliação de parâmetros como concentração celular e atividade emulsificante ao longo do processo fermentativo oferecem insights valiosos para o desenvolvimento de uma abordagem economicamente viável e ecologicamente amigável na produção de surfactantes biológicos.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade biotecnológica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 na produção de biossurfactantes, utilizando resíduos agroindustriais de junça e milhocina como matéria-prima de baixo custo.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* a partir dos resíduos agroindustriais de junça e milhocina em frascos agitados;
- Avaliar a melhor concentração de milhocina a ser utilizada na produção de biossurfactante;
- Avaliar a possibilidade de produzir biossurfactante utilizando os resíduos de junça e a milhocina em biorreator;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SURFACTANTES

Surfactantes ou tensoativos são compostos orgânicos formados por moléculas anfifílicas ou anfipáticas, capazes de reduzir a tensão superficial dos líquidos onde se encontram (Santos et al., 2016; Felix, 2012). Essas moléculas são constituídas por longas cadeias carbônicas, em geral, hidrofóbicas e com um grupo hidrofílico podendo ser iônico, não iônico ou anfotérico, em uma de suas extremidades, que interagem tanto com substâncias polares quanto apolares (Costa & Pastore, 2005).

Os surfactantes possuem propriedades tais como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases (Gouveia et al., 2003; Woods & Charles, 2004) e possuem ampla aplicabilidade nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, petroquímica, têxtil, agroindustriais além de formulações cosméticas, produtos de limpeza, entre outros (Araujo et al., 2013).

A partir de uma concentração micelar crítica, há a formação de micelas, que são uma estrutura globular formada por um agregado de moléculas do surfactante que envolvem internamente uma molécula apolar com sua cauda hidrofóbica e externamente, ficam suas cabeças polares que interagem com a água. Estas estruturas são, portanto, responsáveis pela

retirada de gorduras e por isso surfactantes estão presentes predominantemente em detergentes, sabões, xampus, entre outros (Campos & Silva, 1986; Nogueira et al., 2020).

Geralmente essas moléculas são produzidas a partir de derivados do petróleo, uma matéria prima não renovável. No entanto, o interesse do consumidor em adquirir produtos ecologicamente corretos tem estimulado o mercado de produtos com menor impacto ambiental e uma nova forma de "re-pensar a química" (Brumano et al., 2016). Além disso, eles apresentam maior toxicidade e são pouco compatíveis com o meio ambiente, estimulando a necessidade da substituição pelos biossurfactantes (Nitschke e Pastore, 2002).

No entanto, o mercado global de surfactantes ainda está em alta e foi avaliado em US\$ 39,99 bilhões em 2021 e deve chegar a US\$ 59,95 bilhões em 2030 com um CAGR (Compound Annual Growth Rate) de 4,5% durante o período de previsão (2022-2030) (SkyQuest, 2022).

2.2. TENSÃO SUPERFICIAL

A tensão superficial é um fenômeno que ocorre na camada mais externa de um líquido, fazendo com que sua superfície se comporte como uma membrana elástica. As moléculas no interior do líquido são atraídas em várias direções pelas moléculas vizinhas, resultando em forças praticamente equilibradas em cada molécula. No entanto, as moléculas na superfície do líquido experimentam atração apenas lateral e inferior (FEUP, 2014). Essa força lateral e para baixo cria tensão na superfície, fazendo com que ela se comporte como uma película elástica (Arcanjo, 2009). A tensão superficial manifesta-se em situações intrigantes, como quando uma agulha é delicadamente colocada sobre a água, permitindo que ela permaneça na superfície sem afundar, mesmo sendo mais densa que a água. Além disso, a gota d'água que se forma em uma torneira mantém sua forma devido à elasticidade na superfície da gota (Marques, 2015).

Pode-se definir a tensão superficial como a capacidade da superfície de um líquido de resistir a uma força externa, resultante da natureza coesiva de suas moléculas. Essa propriedade permite que pequenos objetos "flutuem" na superfície de um fluido, desde que o objeto não consiga romper e separar a camada superior de moléculas de água. Quando um objeto está na superfície do fluido, a superfície sob tensão age como uma "membrana elástica" (Nishida, 2019).

Existem várias abordagens para medir a tensão superficial, classificadas como estáticas, dinâmicas e de desprendimento ou separação. Entre os métodos estáticos, notáveis estão a ascensão capilar (Meyer et al., 1986), a placa de Wilhelmy (Wilhelmy, 1863) e o anel de DuNoüy (Du-Noüy, 1919). Enquanto os dois últimos demandam equipamentos específicos,

nem sempre disponíveis, o método de ascensão capilar geralmente apresenta erros experimentais significativos, superiores a 20%. Isso ocorre devido à sua precisão condicional, visto que só pode ser aplicado quando o ângulo de contato entre o menisco e a parede do tubo é zero, como no caso de capilares. No entanto, essa exigência é dificilmente atendida pelos capilares comerciais com preços acessíveis, pois requer um diâmetro uniforme ao longo do tubo. O método dinâmico da oscilação (Srisankar, et al, 1987) possibilita a determinação da tensão superficial em intervalos de tempo curtos, mas é considerado um dos métodos mais complexos. Em contrapartida, a medição da tensão superficial baseada no desprendimento, como o método do peso da gota ou volume da gota (Tate e Philos, 1864), apesar de ser um dos mais antigos é consideravelmente mais simples.

Certamente, a utilização de tensoativos, também conhecidos como surfactantes, na indústria têxtil proporciona uma excelente oportunidade para explorar a relação prática-teórica em relação à influência desses compostos na tensão superficial. Devido à capacidade de reduzir a tensão superficial de líquidos, os tensoativos são categorizados como umectantes, detergentes, emulsionantes e solventes. As moléculas desses agentes tensoativos são compostas por um grupo lipofílico e um grupo hidrofílico (Steinhart, 2000)

Surfactantes, devido ao seu grupo lipofílico, ocupam preferencialmente a superfície de um líquido, reduzindo a tensão superficial (Smith et al., 2013). No entanto, o impacto deles na tensão superficial é limitado após atingir uma concentração micelar crítica (CMC), momento em que micelas se formam (Pantina & Furst, 2008). Esse comportamento é explicado pela presença de um mínimo local de tensão superficial próximo à CMC, o qual pode ser atribuído ao comportamento das moléculas de surfactante (Morgner, 2008). A capacidade dos surfactantes de se auto-organizarem e formar estruturas supramoleculares, como micelas, é crucial na redução da tensão superficial (Indelicato et al., 2017).

2.3. BIOSSURFACTANTES

2.3.1. Propriedades dos Biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos anfifílicos com alta biodegradabilidade e baixa toxicidade, tornando-os promissores para diversas aplicações (Akbari et al., 2018). Eles são produzidos por microrganismos e possuem propriedades únicas, como maior biodegradabilidade e menor toxicidade, o que os torna adequados para uso em recuperação avançada de petróleo, biorremediação ambiental, processamento de alimentos e produtos

farmacêuticos (Muthusamy et al., 2008). Essas propriedades também os tornam eficazes na melhoria da biodegradação e solubilização de compostos de baixa solubilidade em tratamento de solo e água (Mulligan, 2005). As propriedades físico-químicas dos biossurfactantes, como a redução da tensão superficial e interfacial, baixas concentrações críticas de micelização e a capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos, os tornam particularmente úteis nessas aplicações (Jahan et al., 2019). O uso de matérias-primas mais baratas e bioprocessos otimizados pode tornar a produção de biossurfactantes economicamente mais atrativa (Saharan et al., 2011)

2.3.2. Microrganismos produtores de biossurfactante

Os microrganismos, especialmente bactérias, produzem biossurfactantes quando cultivados em substratos imiscíveis em água (Desai & Banat, 1997). Esses biossurfactantes, que possuem grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, são mais eficazes, seletivos, ambientalmente amigáveis e estáveis do que os surfactantes sintéticos (Healy et al., 1996). Os biossurfactantes mais comuns são os glicolipídios, compostos por carboidratos ligados a um ácido alifático de cadeia longa. A produção desses biossurfactantes é influenciada por fatores como a cepa microbiana, fonte de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e concentração de oxigênio e íons metálicos. O uso de substratos solúveis em água e resíduos agroindustriais para a produção de biossurfactantes também tem sido explorado (Desai & Banat, 1997).

Uma variedade de microrganismos foi identificada como capaz de produzir biossurfactantes, incluindo *Pseudomonas sp.*, *Lysinibacillus sp.* e *Bacillus sp.* (Ossa, 2020; Almeida et al., 2020). Esses biossurfactantes têm diversas aplicações, incluindo na indústria petrolífera para limpeza de tanques, recuperação avançada de petróleo e controle da poluição por óleo (Colla & Costa, 2003). Eles também desempenham um papel crucial em processos de biorremediação devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e eficácia em melhorar a biodegradação e solubilização de contaminantes (Decesaro et al., 2015).

Diversas espécies de leveduras foram identificadas como produtoras de biossurfactantes, com *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* sendo exemplos notáveis (Ribeiro et al., 2018; Oliveira, 2011). Além dos biossurfactantes, as leveduras também podem produzir outros compostos valiosos, como pectinases e lipases (Oliveira et al., 2009; Gonçalves et al., 2014).

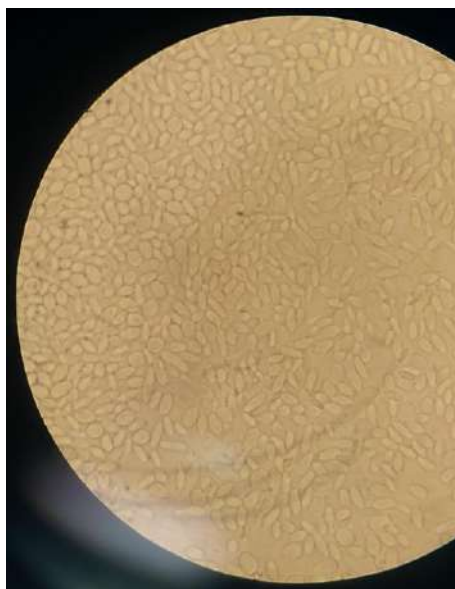
A espécie de levedura *Yarrowia lipolytica* tem se mostrado uma produtora potente de biossurfactantes, com a capacidade de reduzir a tensão superficial e inibir a formação de

biofilme (Shatila et al., 2021). Essa habilidade é ainda mais aprimorada quando a levedura é cultivada em recursos renováveis, como glicerol bruto e suco de caju clarificado (Fontes et al., 2012). As habilidades metabólicas de *Y. lipolytica* para produzir ácidos graxos e biossurfactantes têm sido exploradas, destacando seu potencial para diversas aplicações biotecnológicas (Bauer et al., 2022). A otimização da produção de biossurfactantes por *Y. lipolytica* foi alcançada por meio de um *design* fatorial, com o uso de fontes específicas de nitrogênio e carbono (Fontes et al., 2010).

2.3.3. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é uma levedura não convencional, estritamente aeróbica (Coelho et al., 2010) e não patogênica capaz de produzir metabólitos importantes e apresentar uma intensa atividade secretora e com um significativo potencial industrial, especialmente na produção de lipases e outros metabólitos (Coelho et al., 2010; Fickers et al., 2011). Além disso, é um modelo valioso para estudos de dimorfismo em leveduras. A capacidade da levedura de crescer em águas residuais de azeite e degradar compostos orgânicos, é muitas vezes acompanhada pela produção de biossurfactantes (Coelho et al., 2010). *Y. lipolytica* tem sido usada com sucesso para expressão de proteínas heterólogas e engenharia de vias metabólicas, tornando-a um sistema promissor para a biotecnologia (Madzak, 2015). Suas características fisiológicas, metabólicas e genômicas únicas a tornaram um modelo valioso para o conhecimento básico em diversos campos (Nicaud, 2012). Na Figura 1 é possível observar uma imagem microscópica da *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

Figura 1: Imagem de microscopia ótica de *Yarrowia lipolytica* (aumento de 1000x).



Fonte: elaboração própria

É uma levedura versátil com um significativo potencial biotecnológico, especialmente na produção de lipase, ácido cítrico e aroma (Coelho et al., 2010). Sua capacidade de crescer em ambientes hidrofóbicos e produção de diversos metabólitos, incluindo biossurfactantes, a torna útil para a biorremediação, e pode ser geneticamente modificada para a produção econômica de produtos químicos e combustíveis (Gonçalves et al., 2014; Zhu & Jackson, 2015). Essa espécie fúngica também é eficiente na degradação de substratos hidrofóbicos e tem sido utilizado em biorremediação e na síntese de diversos produtos (Bankar et al., 2009).

Amaral et al. (2006) conduziram a síntese de biossurfactante usando a cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, empregando um meio de cultivo com glicose como fonte de carbono. O biossurfactante resultante, denominado Yansan, foi caracterizado como um composto lipídeo-carboidrato-protéico com notável atividade emulsionante e estabilidade em uma ampla faixa de pH (3-9). Em outro estudo, Fontes et al. (2010) empregaram uma abordagem de superfície de resposta para otimizar o meio de produção de biossurfactante utilizando a mesma cepa. Concluíram que concentrações ideais de glicose (4%), glicerol (2%), sulfato de amônio (10 g/L) e extrato de levedura (0,5 g/L) resultam em um índice de emulsificação de 81,3% e uma redução da tensão superficial de 19,5 mN/m.

A cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 demonstrou a capacidade de crescer e produzir biossurfactante em meio contendo glicerol residual e suco de caju clarificado, indicando a possibilidade de substituir fontes convencionais de carbono por resíduos industriais na produção de biossurfactantes (Fontes et al., 2012).

2.4. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE A PARTIR DE FONTES RENOVÁVEIS

Biossurfactantes, que são compostos ativos produzidos por microrganismos, têm recebido atenção devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e produção a partir de fontes renováveis (Colla & Costa, 2003). A produção de biossurfactantes a partir de fontes renováveis, como materiais amiláceos, tem sido explorada para aplicações em diversas indústrias, incluindo a biorremediação (Vieira et al., 2023). Estratégias para aumentar a produção de biossurfactantes de um isolado de *Paenibacillus sp.* têm sido investigadas, sendo as condições ótimas identificadas como uma temperatura de 30°C e um tempo de cultivo de 24 horas (Oliveira et al., 2021). Esses biossurfactantes têm potenciais aplicações em processos de biorremediação, especialmente na solubilização e biodegradação de contaminantes (Decesaro, et al., 2015).

Yáñez-Ocampo et al. (2017) e Amodu et al. (2014) ambos demonstraram o potencial dos resíduos agroindustriais na produção de biossurfactantes, com índices elevados de emulsificação de 58-59% e 65,5-95%, respectivamente. Yáñez-Ocampo et al. (2017) utilizaram óleo de cozinha usado e água residual de café, enquanto Amodu et al. (2014) utilizaram beterraba. Solanki et al. (2020) expandiu ainda mais esse tema, alcançando um índice de emulsificação de 43,12-47,41% usando casca de batata em pó e ureia. Esses estudos destacam coletivamente a eficácia dos resíduos agroindustriais na produção de biossurfactantes, com potencial para otimizações adicionais.

2.3.4.1. Subprodutos da produção de leite de junça

Tiger nuts, também conhecidos como chufa ou junça, são os tubérculos da planta *Cyperus esculentus*, amplamente consumidos na África Ocidental e na região do Mediterrâneo (Figura 2) (Temple et al., 1990). Eles são ricos em fibras, proteínas e açúcares, além de ácido oleico, glicose, fósforo, potássio, vitaminas C e E (Sánchez-Zapata et al., 2012). Essas propriedades nutricionais tornam os *tiger nuts* um alimento funcional potencial com vários benefícios para a saúde, incluindo capacidade de eliminação de radicais, inibição da peroxidação lipídica, efeitos anti-inflamatórios e anti apoptóticos (Yu, 2022). Apesar de sua subutilização, a junça tem aplicações potenciais na indústria alimentícia, formulação farmacêutica, produção agrícola e geração de biocombustíveis (Adenowo & Kazeem, 2020).

A junça é comumente cultivada, principalmente para a produção do leite de junça, também conhecido como *horchata de chufa*, uma bebida muito apreciada na Espanha. No Brasil, especialmente no Maranhão, as condições são favoráveis para o cultivo desse tubérculo, tornando-se uma das atividades agrícolas de maior importância na região interna do estado (Costa Neto et al., 2017).

O subproduto sólido da junça, chamado de *tiger nut fiber* (TNF) ou fibra de chufa (Figura 3), é gerado durante o processo de extração do leite de junça, constituindo-se como um dos principais subprodutos desse procedimento (Neto et al., 2017). É uma rica fonte de fibra dietética, proteínas e açúcares (Sánchez-Zapata et al., 2012) e também contém uma quantidade significativa de minerais e vitaminas, além de exibir propriedades antioxidantes. Essa fibra, já utilizada como componente dietético no processamento de alimentos, apresenta um potencial significativo para ser empregada como substrato em processos biotecnológicos (Sánchez-Zapata et al., 2012).

Figura 2: Imagem de tubérculos de *Tiger nuts* ou “junça”



Fonte: elaboração própria

O resíduo sólido de junça tem sido usado com sucesso como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes por microrganismos. Audu et al. (2019) isolaram uma cepa bacteriana produtora de biossurfactante e descobriram que o biossurfactante produzido compartilhava características semelhantes aos biossurfactantes padrão. Desai (1997) e Makkar (1999) discutiram o potencial do uso de fontes de carbono não convencionais, como fibra de noz-de-tigre, para a produção de biossurfactantes, destacando sua baixa toxicidade, biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica.

Figura 3: Imagem do resíduo sólido da junça ou “*tiger nuts fiber*”



Fonte: elaboração própria

2.3.4.2. Milhocina

A milhocina (*corn steep liquor*) é um subproduto agroindustrial derivado do processamento do milho, proveniente da embebição dos grãos de milho durante o fracionamento em amido e germe (óleo) (Figura 4). Composta por 40% de sólidos, destaca-se pelo seu considerável potencial de reutilização devido à sua composição e propriedades físico-químicas, além dos benefícios ambientais associados. É uma excelente fonte de carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato compondo uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio (Rivas et al., 2004; Menegassi, 2007; Fontana et al., 2000) (Tabela 1).

Figura 4: Imagem de Milhocina ou “*corn steep liquor*”



Fonte: elaboração própria

Uma variedade de estudos tem explorado o uso da milhocina como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes. Oliveira (2019) descobriu que a milhocina, combinada com outras fontes de nitrogênio e carbono, pode otimizar o processo de fermentação para a produção de esporos de *Bacillus thuringiensis*. Da mesma forma, Santos et al. (2018) demonstraram que a *Candida guilliermondii* pode crescer bem utilizando a milhocina como fonte de carbono, resultando na produção de biossurfactantes.

Yarrowia lipolytica foi eficaz na produção de biossurfactantes utilizando milhocina, um subproduto da produção do milho, como fonte de carbono (Fontes et al., 2012). Este biossurfactante apresenta potencial para aplicações industriais devido à sua capacidade de reduzir a tensão superficial e emulsificar. O uso de milhocina como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes por *Y. lipolytica* tem o potencial de diminuir os custos de

produção e aumentar a sustentabilidade (Silva et al., 2020). A otimização adicional da produção de biossurfactantes por *Y. lipolytica* utilizando milhocina como fonte de carbono pode ser alcançada através do uso de fontes específicas de nitrogênio e carbono, como sulfato de amônio e extrato de levedura, e uma combinação de glicose e glicerol (Fontes et al., 2010).

Tabela 1 - Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.

Aminoácidos (g de aminoácido/100g de proteína)					
Alanina	9,83	Glicina	5,27	Metionina	1,98
Arginina	3,68	Histidina	3,72	Fenilalanina	2,85
Ácido aspártico	5,82	Isoleucina	3,07	Prolina	9,64
Cistina	2,2	Leucina	8,28	Serina	5,18
Ácido glutâmico	18,07	Lisina	4,75	Treonina	4,08
Triptofano	-	Tirocina	3,09	Valina	5,16
Vitaminas (mg/kg)					
Biotina	0,3	Ácido pantotênico	15		
Cholina	3.500,0	Piridoxina	9,0		
Inositol	6.000,0	Riboflavina	6,0		
Niacina	80,0	Tiamina	3,0		
Minerais					
Cálcio (%)	0,14	Magnésio (%)	0,6	Selênio (mg/kg)	0,3
Cobre (mg/kg)	15,0	Potássio (%)	2,8	Zinco (mg/kg)	60,0
Manganês (mg/kg)	20,0	Sódio (%)	0,1	Enxofre (%)	0,6
Ferro (mg/kg)	100,0	Fósforo (%)	1,8		

Fonte: Menegassi, 2007

2.5. Aplicação dos Biossurfactantes

Biossurfactantes, produzidos por microrganismos, oferecem inúmeras vantagens em relação aos surfactantes químicos, incluindo biodegradabilidade, baixa toxicidade e funcionalidade em condições extremas. Eles têm uma ampla gama de aplicações, incluindo nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e petroquímica (Colla & Costa, 2003; Silva et al., 2016). Na indústria do petróleo, são particularmente úteis para a limpeza de tanques de armazenamento de óleo, recuperação avançada de petróleo e controle de poluição por óleo (Colla & Costa, 2003; Marinho et al., 2022). O uso de biossurfactantes nessas aplicações não é apenas eficaz, mas também sustentável ambientalmente (Silva et al., 2016; Marinho et al., 2022). Sua produção a partir de recursos renováveis e seu potencial para substituir surfactantes

sintéticos derivados do petróleo os tornam uma alternativa promissora no mercado industrial (Silva et al., 2016).

Santos (2003) detectou uma significativa taxa de biodegradação do óleo de motor por *Candida lipolytica*, quando apenas o biossurfactante foi empregado, atingindo 19,8%, o que evidencia sua capacidade de aumentar a disponibilidade dos hidrocarbonetos para a ação dos microrganismos. Os índices de biodegradação situaram-se na faixa de 19 a 26%, sendo esses valores mais baixos atribuídos ao excesso de compostos recalcitrantes resultantes do processo de intemperização do solo.

Resultados obtidos por Moraes & Abud (2013) mostraram que os biossurfactantes produzidos em meio mineral suplementado com óleo e manipueira, em concentrações de 1,5%, conseguiram remediar o óleo da areia de praia contaminada pelo petróleo em cerca 83%, para o microrganismo isolado do solo. Esse percentual foi superior aos biossurfactantes comerciais ou sintéticos existentes e disponíveis no mercado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MICRO-ORGANISMO

Yarrowia lipolytica 583 IMUFRJ 50682, uma cepa de levedura isolada de um estuário na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil, e identificada pelo Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foi empregada neste estudo.

3.2. MATERIAIS

Os componentes do meio de cultivo consistiram em peptona e extrato de levedo (Kasvi – PR, Brasil), glicose (Reagen– RJ, Brasil), agar-agar, sulfato de amônio e glicerol (Vetec – RJ, Brasil).

3.3. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Dois subprodutos agroindustriais diferentes foram experimentados na produção de biossurfactantes: o resíduo sólido de junça e a milhocina. O resíduo de junça foi obtido por meio da extração realizada por COSTA NETO (2016) a partir da junça adquirida de agricultores locais em um mercado municipal no Maranhão. A parte líquida proveniente dessa

maceração é conhecida como leite de junça e foi chamada de “junça líquido” no presente trabalho, enquanto a parte sólida, foi peneirada e chamada de “resíduo sólido de junça” (RJS). Quanto à milhocina, 4 kg foram gentilmente doados pela empresa Ingredion Brasil. Estes materiais foram armazenados em recipientes fechados em uma geladeira a 4 °C.

3.4. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

3.4.1. Pré-inóculo

Para a manutenção de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682), foi utilizado um meio YPD composto por 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 3% de ágar, armazenado a uma temperatura de 4 °C em placas de Petri. Após essa etapa, as células de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682) foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio YPD sem a presença de ágar. A cultura resultante foi então submetida à agitação orbital a 160 rpm, mantida a uma temperatura de 28 °C por um período de 72 horas. Uma quantidade adequada dessas células foi posteriormente utilizada para a inoculação de 1 mg de células secas por mL do meio destinado à produção de biossurfactante.

3.4.2. Produção de Biossurfactante em Erlenmeyer

A produção de biossurfactante ocorreu em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 1 litro, contendo 500 mL do meio de cultivo. O meio de cultura, conforme otimizado por Fontes et al. (2010), foi composto por 0,5 g/L de extrato de levedo, 10 g/L de sulfato de amônio, 4% de glicose e 2% de glicerol, sendo utilizado como controle neste estudo.

Os meios de cultura que continham subprodutos agroindustriais foram preparados inicialmente com as mesmas quantidades de extrato de levedo (0,5 g/L) e sulfato de amônio (10 g/L) presentes no controle. A glicose e o glicerol foram substituídos por 10 g/L do RJS (resíduo sólido de junça).

Para avaliar a substituição do extrato de levedo pela milhocina (MCNA), diferentes concentrações de MCNA (1,0; 3,0 e 5,0 g/L) foram usadas, mantendo 10 g/L de sulfato de amônio e 10 g/L do RJS.

Além disso, foram testados meios que continham apenas sulfato de amônio (10 g/L), apenas MCNA (1,0; 3,0 e 5,0 g/L), e meios que continham o RJS a 10 g/L e MCNA nas concentrações mencionadas.

Os meios líquidos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Para reduzir a carga microbiana nos subprodutos agroindustriais, estes foram expostos à radiação ultravioleta (UV) por 20 minutos em placas de Petri contendo 5 g de RJS e 2,5 g de MCNA. Após a esterilização, os resíduos, que foram sanitizados pela exposição à UV, foram adicionados ao meio líquido de forma asséptica.

Após a inoculação das células nos meios de cultura, os frascos de Erlenmeyer foram mantidos em um incubador rotatório (*shaker*) por 96 horas, a uma temperatura de 28 °C e uma velocidade de agitação de 250 rpm. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 horas e submetidas a análises após centrifugação.

3.4.3. Produção de Biossurfactante em Biorreator

A produção de biossurfactante foi realizada em um biorreator acoplado a contactores de membrana modelo BioFlo IIc (Batch/Continuous Fermentor; New Brunswick Scientific; EUA). Este biorreator possui uma capacidade nominal de 5,0 L e um volume útil médio de 3,0 L. Após inoculação das células, a temperatura de operação foi mantida constante a 28 °C, 300 rpm e a aeração foi realizada de maneira não dispersiva, utilizando um cilindro de oxigênio puro. Antes de cada produção, tanto o biorreator quanto os frascos contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. O sistema de oxigenação foi esterilizado mediante a circulação de uma solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 hora. Após esse procedimento, água destilada estéril foi circulada pelo sistema para eliminar quaisquer vestígios de cloro, permitindo assim a inoculação dos microrganismos (KRONENBERGER et al., 2008). O meio de cultivo foi preparado com uma concentração de 10 g/L de resíduo sólido de junça e 5 g/L de milhocina.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1. Concentração celular

A determinação da concentração celular envolveu a medição da densidade óptica a 570 nm, e esses valores foram posteriormente convertidos em g/L, aplicando um fator de conversão previamente estabelecido, conforme descrito por Amaral et al. (2006).

3.5.2. pH

A leitura do pH do meio de fermentação foi realizada utilizando um potenciômetro (Digimed – DM-22), que foi devidamente calibrado com soluções tampão de pH 4,01 e pH 6,86.

3.5.3. Índice de emulsificação

A avaliação do índice de emulsificação foi conduzida utilizando amostras do meio de cultivo sem células, seguindo o protocolo de Cooper e Goldenberg (1987). Este procedimento envolveu a combinação de 1 mL do meio de cultura fermentado (isento de células) com um volume equivalente de hexadecano em tubos de ensaio. A mistura foi agitada vigorosamente em um agitador vortex por dois minutos. Os tubos foram deixados em repouso por 24 horas, e o cálculo do índice de emulsificação foi realizado com base na seguinte fórmula:

$$\text{Índice da emulsão IE(\%)} = He \times 100 / Ht \quad (1)$$

He = altura da emulsão;

Ht = altura total do líquido.

O resultado obtido foi expresso como porcentagem.

3.5.4. Composição centesimal dos subprodutos agroindustriais

As determinações da composição centesimal do RJS e da MCNA, incluindo umidade, cinzas, lipídeos e proteína, seguiram o método da AOAC (2005). Para os carboidratos, a análise foi realizada por meio do cálculo da diferença em relação aos resultados das demais análises.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações coletadas foram submetidas a uma análise estatística por meio do *software* SAS (*Statistical Analysis System*), empregando uma análise de variância fatorial (ANOVA), considerando um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A composição de matérias-primas utilizadas em culturas microbiológicas é crucial por diversas razões, como por exemplo, garantir nutrientes adequados, pH controlado, fontes de carbono e energia, aminoácidos essenciais, equilíbrio iônico e prevenção de contaminação. Gouveia (2013) destaca a importância de recursos de baixo custo em microbiologia, o que pode ser alcançado por meio do uso de métodos e materiais alternativos. Isso é especialmente relevante no contexto de culturas microbiológicas, pois a escolha das matérias-primas pode impactar significativamente o custo e a acessibilidade. Portanto, a composição de matérias-primas utilizadas em culturas microbiológicas é importante para custo, acessibilidade e qualidade.

As Tabelas 2 e 3 fornecem os resultados da análise da composição centesimal dos resíduos da milhocina e da junça.

Tabela 2 - Composição da milhocina

Componente	Quantidade (%)	Componente	Quantidade (%)
Umidade	49,84	Carboidratos	23,76
Proteína	18,03	Cálcio*	2,00
Lipídeos	0,36		
Cinzas	8,01		
Ferro*	6,47		

*Unidade em mg/100g

Tabela 3 - Composição do resíduo sólido de junça, RJS.

Componente	Quantidade (%)	Componente	Quantidade (%)
Amido	11,9	Carboidratos	22,07
Umidade	67,06	Ferro*	3,10
Proteína	3,60	Cálcio*	42,5
Lipídeos	7,86	Vitamina C*	1,76
Cinzas	0,56		

*Unidade em mg/100g

A composição da milhocina inclui cerca de 18% de proteínas, 8% de cinzas, 0,3% de lipídeos e 23% de carboidratos, conforme observado por Akhtar et al. (1997). Essa substância apresenta um teor proteico de 18%, sendo uma fonte promissora de nitrogênio para o desenvolvimento celular e o metabolismo de micro-organismos, conforme destacado por Sobrinho et al. (2007) e Moraes et al. (2001).

Quanto ao resíduo sólido da junça, evidencia-se um notável conteúdo de nutrientes, indicando seu potencial em aplicações biotecnológicas, especialmente como fonte de carbono e nitrogênio. Os resultados obtidos para o resíduo sólido da junça superam as quantidades de proteína, cálcio e ferro encontradas por Sanchez-Zapata et al. (2012), atingindo valores de 1,75 mg/100g, 10,45 mg/100g e 3,0 mg/100g, respectivamente.

Diversos estudos destacaram a importância das fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes. Dias e Nitschke (2022) descobriu que o uso de óleo de girassol como fonte de carbono aumentou significativamente a produção de biossurfactantes em duas cepas de *Paraburkholderia diazotrophica*. Luna et al. (2008) também enfatizou o potencial da produção de biossurfactantes em meios de baixo custo, incluindo aqueles formulados com água do mar.

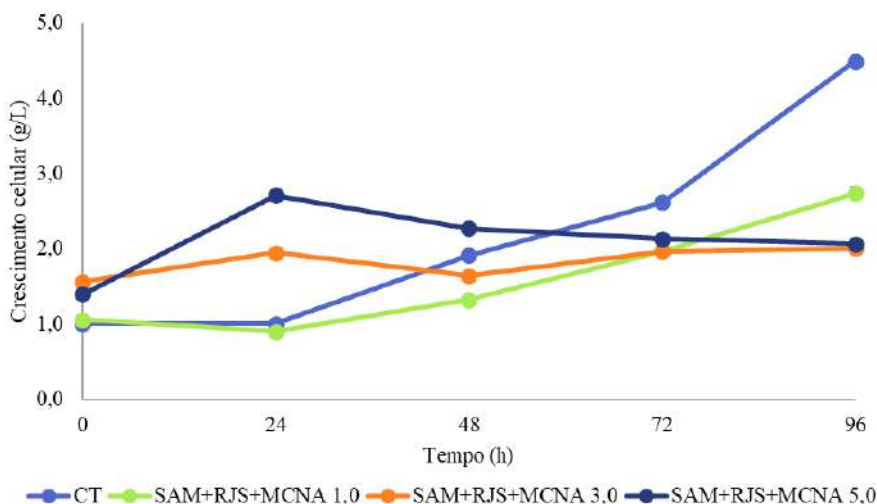
4.2. SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MILHOCINA

Fontes et al. (2010) otimizaram um meio de produção utilizando glicose, glicerol, sulfato de amônio e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio para a produção de biossurfactante. Neste estudo, esse meio foi adotado como controle (CT), e as mesmas fontes de carbono e nitrogênio são utilizadas para avaliar a produção com os resíduos agroindustriais provenientes da junça e da milhocina.

Foi conduzido um estudo sobre os efeitos das diversas concentrações de MCNA (1,0 g/L; 3,0 g/L e 5,0 g/L) como substituto do extrato de levedura e dos diferentes tempos de fermentação, utilizando um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, a fermentação foi conduzida ao longo de 96 h.

Na figura 5, observa-se os resultados encontrados para o crescimento celular, produção de biossurfactante e pH durante os cultivos.

Figura 5: Médias do crescimento celular do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio SAM + extrato de lêvedo), e milhocina MCNA 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L em substituição ao extrato de lêvedo e resíduo sólido de junça (RJS) em substituição a glicose e glicerol.



Conforme indicado na Figura 5, os resultados demonstram um aumento na concentração celular ao longo do tempo de fermentação no meio de cultivo CT, após uma fase lag inicial de 24 h, atingindo 4,5 g/L, valor mais alto quando comparado aos meios contendo resíduos de junça e milhocina. De maneira geral, observa-se, que os meios de cultura contendo resíduos com milhocina nas concentrações de 1, 3 e 5 g/L apesar de enriquecidos com sulfato de amônio, apresentaram baixos valores de crescimento celular (2,7; 2,0; 2,1 g/L, respectivamente) ao longo de todo o processo de cultivo.

Apesar de *Y. lipolytica* ser uma levedura oleagínosa eficaz na utilização de lipídios como fonte de carbono (Amaral et al., 2006), e mesmo apresentando uma considerável quantidade de lipídeos em sua composição, aproximadamente 8% (Tabela 2), o crescimento da biomassa celular foi limitado quando se utilizou resíduo de junça, independentemente da quantidade de milhocina adicionada (1,0; 3,0; 5,0 g/L).

A redução nas concentrações celulares observadas nesses meios pode ser atribuída à migração das células de *Y. lipolytica* para a superfície dos grânulos de junça, depositados no fundo do frasco Erlenmeyer. Conforme sugerido por diversos autores, a presença de biossurfactantes é essencial para que os microrganismos possam assimilar substratos insolúveis em água (Mulligan, 2005; Hamme et al., 2006).

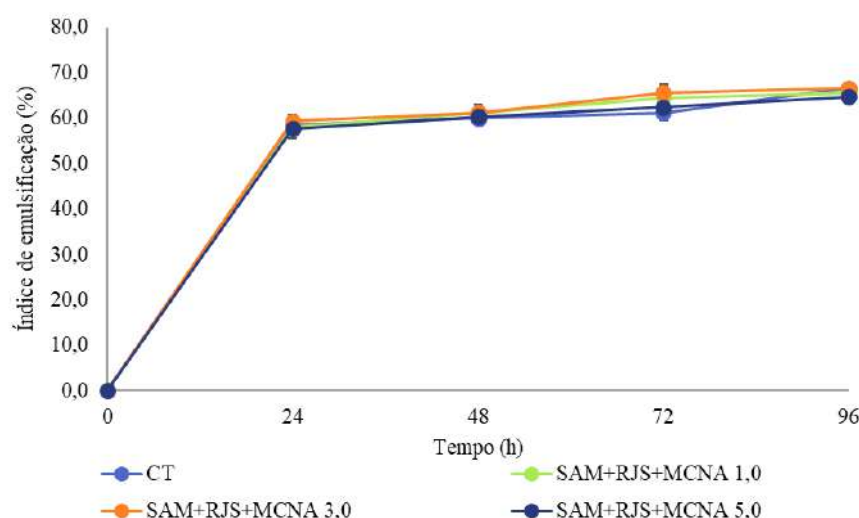
Hommel (1994) e Ron (2002) destacam ambos o papel dos biossurfactantes em aumentar a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, promovendo assim o crescimento de bactérias e acelerando a taxa de biorremediação. Hua et al. (2003) apoia ainda mais essa ideia,

demonstrando que os biossurfactantes podem influenciar positivamente a emulsificação e biodegradação de n-alcanos. Perfumo et al. (2010) acrescenta que os biossurfactantes são uma resposta fisiológica a requisitos ambientais específicos e podem ser influenciados pelo substrato, tornando-os particularmente ativos em relação ao mesmo substrato.

A análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 4, evidencia que tanto os meios de produção (CT, ou RJS+SAM+MCNA) quanto o tempo de fermentação e a concentração de milhocina mostraram-se significantes para o crescimento celular ($p < 0,05$), assim como a interação entre esses fatores. É relevante ressaltar que esses fatores não operam de maneira independente, impossibilitando a avaliação separada das variáveis.

Na figura 6, observa-se os resultados encontrados para o índice de emulsificação para a produção de biossurfactante.

Figura 6: Médias do índice de emulsificação do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio SAM + extrato de lêvedo), e milhocina MCNA 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L em substituição ao extrato de lêvedo e resíduo sólido de junça (RJS) em substituição a glicose e glicerol.



O meio controle (CT) demonstra um índice de emulsificação significativo de 58,6% nas primeiras 24 horas, atingindo 66,7% ao fim do cultivo. Isso confirma que o meio otimizado por Fontes et al. (2012) proporciona uma significativa produção de biossurfactante. Accorsini (2010) obteve com os isolados de *Candida albicans*, mais especificamente o LBPF 9, uma redução na tensão superficial do meio de cerca de 43% em 24 h de incubação, utilizando glicerol como substrato. Segundo Volpato et al. (2022) o biossurfactante derivado de *B. subtilis* N3-4P, produzido com glicerol como fonte de carbono, mostrou-se altamente eficaz na

remoção de petróleo bruto em um sistema de solo contaminado, alcançando 65,2% de remoção do óleo bruto com uma concentração de 8 g L⁻¹.

Tabela 4. Resultado da ANOVA para o crescimento celular obtido no planejamento fatorial 7x5x3.

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Meios de Produção	1	1,9591	1,9591	1599,4	0,000000
Tempo de Fermentação	4	36,6978	9,1745	7489,8	0,000000
Concentração de milhocina	2	0,6752	0,3376	275,6	0,000000
MP X T	4	16,5498	4,1374	3377,7	0,000000
MP X []MCNA	2	0,6752	0,3376	275,6	0,000000
T X []MCNA	8	1,9197	0,2400	195,9	0,000000
MP X T X []MCNA	8	1,9197	0,2400	195,9	0,000000
Resíduo	30	0,0367	0,0012		
Total	59	58,5135			

Nota: MP: Meio de produção; T: Tempo de fermentação (h); []MCNA: Concentração de milhocina; FV: Fontes de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste de fisher; p-valor: probabilidade.

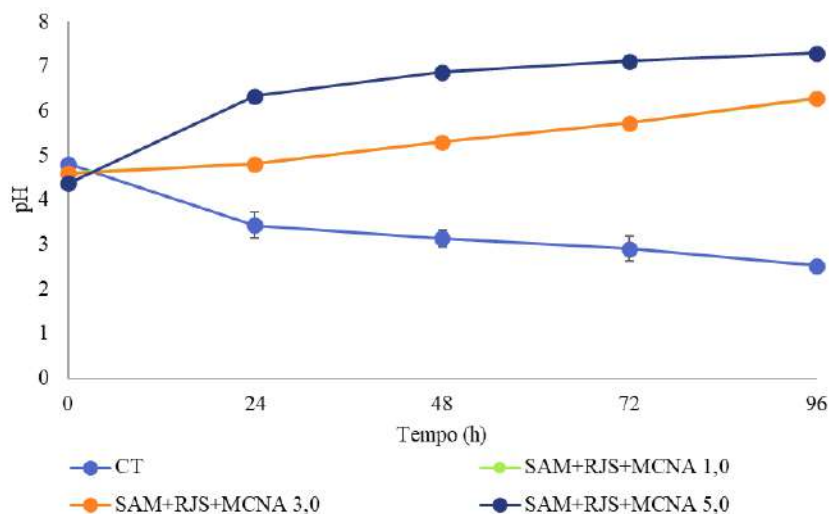
A Figura 6 também revela que, em 24 horas de fermentação, tanto o meio controle quanto os meios com SAM + RJS + MCNA atingiram aproximadamente 60% de índice de emulsificação, destacando o meio contendo 3,0 g/L de milhocina, que atingiu o mesmo índice de emulsificação do controle (66,7%). No entanto, as diferenças entre os resultados dos diferentes meios não parecem ser significativas. Silva et al. (2010) encontraram menores valores de tensão (31,68 e 33,72 mN/m) nas condições dos meios contendo, respectivamente, (5% de milhocina e 5% de óleo queimado de motor) e (10% milhocina e 5% óleo de motor) por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como matéria-prima.

Após o período de 96 h, os índices de emulsificação de todos os meios se igualaram, alcançando aproximadamente 65%, destacando a capacidade da *Y. lipolytica* em produzir biossurfactante a partir de resíduos de baixo custo.

De acordo com a ANOVA (Tabela 5), o meio de produção, tempo de fermentação e a concentração de milhocina e a interação entre eles foram significativos ($p < 0,05$) para o índice de emulsificação. É relevante ressaltar que esses fatores não operam de maneira independente, impossibilitando a avaliação separada das variáveis.

Na figura 7, observa-se os resultados encontrados para o pH na produção de biossurfactante.

Figura 7: Médias do pH do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio SAM + extrato de levedo), e milhocina MCNA 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L em substituição ao extrato de levedo e resíduo sólido de junça (RJS) em substituição a glicose e glicerol.



Conforme apresentado na Figura 7, o pH do meio apresentou uma redução significativa nas fases iniciais do crescimento celular no meio controle, atingindo valores em torno de 3,0 a partir das 48 h, com variação mínima até o término do cultivo. Como demonstrado por Wei et al. (2003) a produção de biossurfactante pode levar à acidificação do meio em culturas enriquecidas com ferro de *Bacillus subtilis*. Essa acidificação pode ser influenciada por diversos fatores, como as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio (Makkar & Cameotra, 1997; Silva et al., 2010; Suryanti, 2015). Também pode ser atribuída à liberação de produtos metabólicos da levedura, incluindo ácidos orgânicos (Fickers et al., 2005)

Tabela 5. Resultado da ANOVA para o índice de emulsificação obtido no planejamento fatorial 7x5x3.

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Meios de Produção	1	341,1	341,1	182,06	0,000000
Tempo de Fermentação	4	34902,7	8725,7	4657,30	0,000000
Concentração de milhocina	2	988,5	494,3	263,81	0,000000
MP X T	4	799,9	200,0	106,73	0,000000
MP X []MCNA	2	988,5	494,3	263,81	0,000000
T X []MCNA	8	1422,2	177,8	94,89	0,000000
MP X T X []MCNA	8	1422,2	177,8	94,89	0,000000
Resíduo	30	56,2	1,9		

Total 59 40921,3

Nota: MP: Meio de produção; T: Tempo de fermentação (h); [J]MCNA: Concentração de milhocina; FV: Fontes de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste de Fisher; p-valor: probabilidade.

Por outro lado, os meios que incluíam junça e milhocina apresentaram um aumento no pH durante as primeiras 48 h, chegando a valores próximos a 7,0. De acordo com a explicação de De Lima e Silva et al. (2010), esse aumento no pH está associado ao consumo da fonte de nitrogênio presente na milhocina, principalmente aminoácidos. O metabolismo dessas substâncias resulta na formação do íon amônio, que eleva o pH. Em um estudo anterior, esses autores também observaram um pH em torno de 7,0 ao empregar meios contendo milhocina na produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens*.

É evidente que os meios com resíduo de junça e milhocina apresentam diferença em relação ao controle após 48 h de fermentação. Não foram realizados ajustes de pH durante o processo fermentativo, uma escolha que, segundo Cui (2017) levou a um aumento da produção de ácido succínico por *Yarrowia lipolytica* quando o pH não foi controlado, sugerindo um potencial aumento na produção de biossurfactantes. Essa constatação foi confirmada por Fontes (2008), o qual notou que, para a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*, não é essencial ajustar o pH inicial. Isso porque esses compostos foram gerados de maneira semelhante em meios com pH inicial variando de 5,0 a 9,0.

Os resultados da análise de variância (ANOVA), conforme apresentados na Tabela 6, indicam a significância do meio de produção, do tempo de fermentação e da concentração de milhocina ($p < 0,05$) na variação do pH do meio de cultivo, bem como a interação entre esses fatores. Dado que a interação é estatisticamente significativa, esses fatores não operam de forma independente, tornando impraticável a análise separada de cada um.

Tabela 6. Resultado da ANOVA para o pH obtido no planejamento fatorial 7x5x3.

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Meios de Produção	1	81,527	81,527	3960,81	0,000000
Tempo de Fermentação	4	0,572	0,143	6,95	0,000439
Concentração de milhocina	2	3,672	1,836	89,19	0,000000
MP X T	4	33,519	8,380	407,11	0,000000
MP X [J]MCNA	2	3,672	1,836	89,19	0,000000
T X [J]MCNA	8	1,497	0,187	9,09	0,000003
MP X T X [J]MCNA	8	1,497	0,187	9,09	0,000003

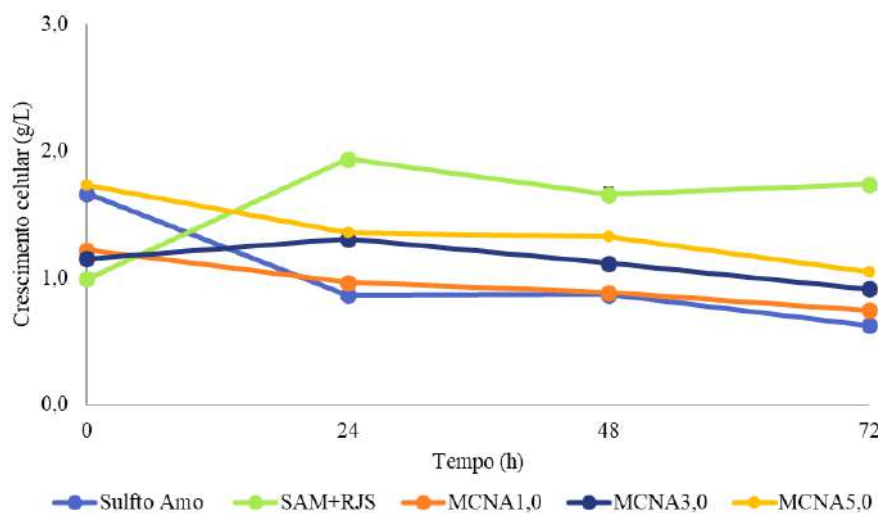
Resíduo	30	0,618	0,021
Total	59	126,574	

Nota: MP: Meio de produção; T: Tempo de fermentação (h); []MCNA: Concentração de milhocina; FV: Fontes de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste de fisher; p-valor: probabilidade.

Considerando as informações sobre o desenvolvimento celular, pH e índice de emulsificação, foi necessário investigar separadamente a influência e a habilidade de produção de biossurfactante desses componentes. Nesse sentido, foi realizado um experimento adicional, chamado de controle 2, no qual o resíduo de milhocina foi testado puro nas mesmas condições testadas anteriormente (1,0; 3,0 e 5,0 g/L). Testou-se também um meio contendo apenas sulfato de amônio e outro com sulfato de amônio e resíduo sólido de junça.

Na figura 8, observa-se os resultados encontrados para o crescimento celular no cultivo para a produção de biossurfactante.

Figura 8: Médias do crescimento celular do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios: Sulfato de amônio (Sulfto Amo); Sulfato de Amônio (SAM) + Resíduo sólido de junça (RJS) e milhocina (MCNA) 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L



Ao analisar a Figura 8, é evidente que houve um crescimento celular limitado, não excedendo 2,0 g/L em todos os meios testados em comparação com o controle que continha glicerol, glicose, extrato de levedo e sulfato de amônio, o qual apresentou aproximadamente 4,5 g/L (conforme indicado anteriormente na Figura 5). A redução na multiplicação celular nesses meios pode ser atribuída às concentrações baixas de nutrientes. A introdução de compostos como o extrato de levedura em conjunto com o sulfato de amônio desencadeia a biossíntese de biossurfactante (Amaral et al, 2010). O extrato de levedura é uma fonte rica em

proteínas, peptídeos de cadeia curta, carboidratos, aminoácidos livres e ácidos nucleicos, sendo supostamente uma fonte abundante de carbono, nitrogênio e oligoelementos essenciais (Lotfabad et al., 2009). Fontes et al. (2012) também afirmaram que a adição de sulfato de amônio ao suco de caju clarificado, um subproduto agroindustrial da produção de caju, não promoveu o crescimento celular.

Daverey e Pakshirajan (2009) constataram uma quantidade reduzida de biomassa ao utilizar apenas melaço de cana-de-açúcar e óleo no meio para a produção de biossurfactante por *C. bombicola*. Os autores concluíram que esse resultado pode ser atribuído principalmente ao fato do meio não ter sido suplementado com fontes externas de nitrogênio (extrato de levedura e ureia).

Os impactos dos diversos meios de produção e dos períodos de fermentação foram analisados por meio de um delineamento totalmente casualizado em um esquema fatorial. A Tabela 7 revela que o meio de produção, o tempo de fermentação e a interação MP x Tf são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para o crescimento celular.

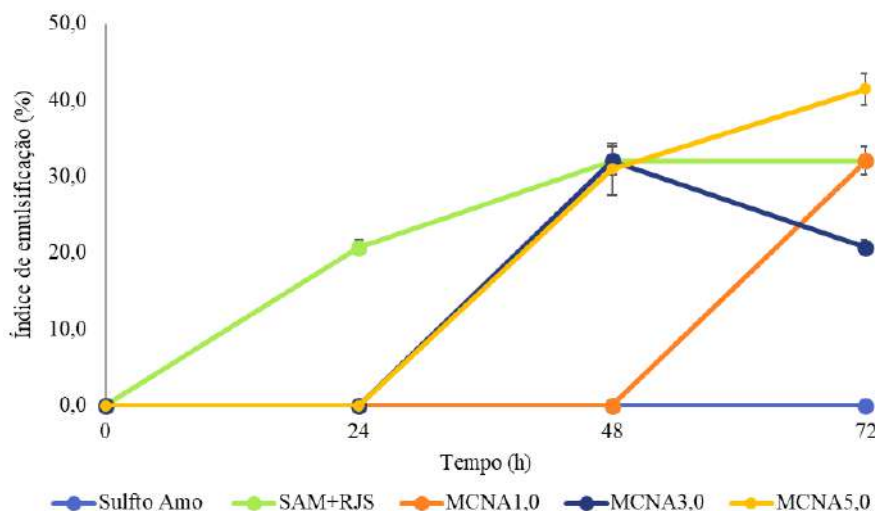
Tabela 7. Resultado da ANOVA para o crescimento celular obtido para produção de biossurfactante com sulfato de amônio e resíduos (controle 2) em diferentes tempos de fermentação.

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Meios de Produção	4	2,21721	0,55430	564,16	0,000000
Tempo de Fermentação	3	0,65893	0,21964	223,55	0,000000
MP X T	12	2,44369	0,20364	207,26	0,000000
Resíduo	20	0,01965	0,00098		
Total	39	5,33948			

Nota: MP: Meio de produção; T: Tempo de fermentação (h); FV: Fontes de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste de fisher; p-valor: probabilidade.

Na figura 9, observa-se os resultados encontrados para o índice de emulsificação na produção de biossurfactante.

Figura 9: Médias do índice de emulsificação do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios: Sulfato de amônio (Sulfto Amo); Sulfato de Amônio (SAM) + Resíduo sólido de junça (RJS) e milhocina (MCNA) 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L



Conforme previsto, a utilização de uma única fonte de nutrientes não conseguiu estimular a síntese de biossurfactante, pois não foi adequada para impulsionar o desenvolvimento celular. Dados resultados da Figura 9, mostram que o índice de emulsificação foi baixo (<40%) para todos os meios de produção, destacando-se a ausência de índice de emulsificação para o meio somente com sulfato de amônia. A produção de biossurfactantes depende crucialmente do nitrogênio para o crescimento celular, sendo o extrato de levedura a principal fonte desse elemento nesse processo (Abouseoud et al., 2008)

No meio composto por sulfato de amônio e RJS (controle 2), a produção insuficiente de biossurfactante não ultrapassou 35% de índice de emulsificação (Figura 9), evidenciando a importância da presença de MCNA nesse meio para uma produção mais elevada (>60%), conforme observado na Figura 6. Na presença apenas de MCNA, também se observa valores baixos, sendo a condição mais adequada a maior concentração desse composto (5 g/L).

A análise de variância (ANOVA) revelou que o meio de produção, o tempo de fermentação e a interação entre ambos são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para o índice de emulsificação. O desdobramento dessa interação é apresentado na Tabela 8.

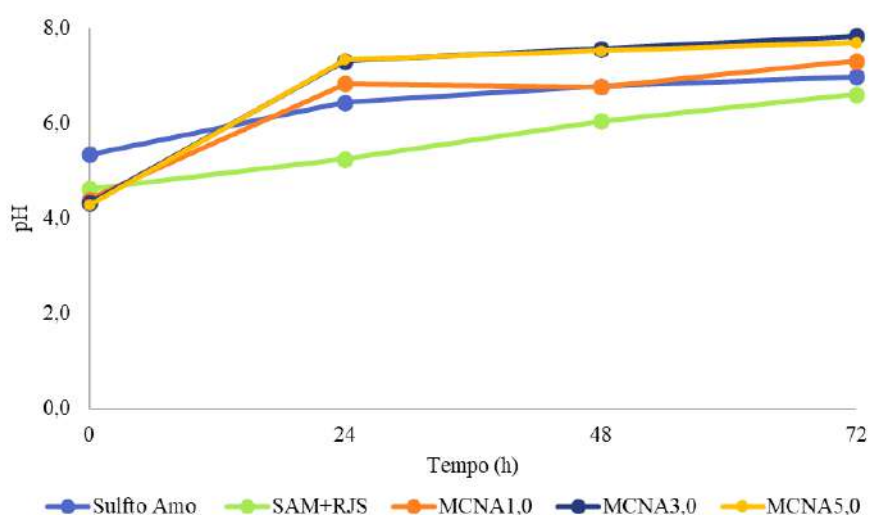
Tabela 8. Resultado da ANOVA para o índice de emulsificação obtido para produção de biossurfactante com sulfato de amônio e resíduos (controle 2) em diferentes tempos de fermentação.

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Meios de Produção	4	2265,086	566,271	369,996	0,000000
Tempo de Fermentação	3	4303,863	1434,621	937,368	0,000000
MP X T	12	2857,299	238,108	155,578	0,000000
Resíduo	20	30,610	1,530		
Total	39	9456,858			

Nota: MP: Meio de produção; T: Tempo de fermentação (h); FV: Fontes de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste de fisher; p-valor: probabilidade.

Na figura 10, observa-se os resultados encontrados para o pH na produção de biossurfactante.

Figura 10: Médias do pH do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios: Sulfato de amônio (Sulfto Amo); Sulfato de Amônio (SAM) + Resíduo sólido de junça (RJS) e milhocina (MCNA) 1,0 g/L, 3,0 g/L e 5,0 g/L



Ao longo da fermentação, observa-se um aumento do pH, indicando que todos os meios de produção seguiram um comportamento semelhante. Durante todo o período de cultivo os meios apresentaram um pH médio em torno de 7. Esses resultados estão em concordância com os mencionados anteriormente ao utilizar meio contendo SAM+RJ+MCNA. Antunes (2013) também obteve um pH em torno de 7 ao empregar 10% da milhocina e 5% do óleo de girassol pós-fritura para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens*.

Os resultados apresentados na Tabela 9 indicam significância estatística ($p < 0,05$) para o meio de produção e o tempo de fermentação na análise de variância (ANOVA) referente à variação do pH do meio de cultivo. Além disso, a interação MP x T também demonstrou ser estatisticamente significativa.

Tabela 9. Resultado da ANOVA para o pH obtido para produção de biossurfactante com sulfato de amônio e resíduos (controle 2) em diferentes tempos de fermentação.

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Meios de Produção	4	6,490	1,622	1270	0,000000
Tempo de Fermentação	3	43,686	14,562	11399	0,000000
MP X T	12	6,072	0,506	396	0,000000
Resíduo	20	0,026	0,001		
Total	39	56,274			

Nota: MP: Meio de produção; T: Tempo de fermentação (h); FV: Fontes de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste de fisher; p-valor: probabilidade.

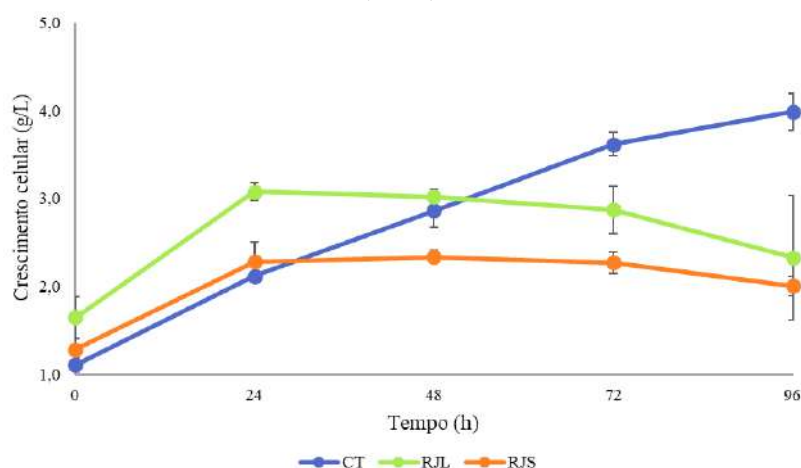
Considerando os resultados (Figura 9), constatou-se que tanto a milhocina quanto o sulfato de amônio isoladamente não foram eficazes para um índice de emulsificação elevado (acima de 50%) necessário para se considerar uma boa produção de biossurfactante (Fontes et al., 2012). Diante disso, visando reduzir ainda mais os custos de produção, foi avaliado o uso exclusivo dos resíduos em conjunto. Ao buscar a concentração ideal de milhocina, foi observado que vários pesquisadores empregaram concentrações elevadas do material. Santos et al. (2013) relataram uma redução para 25 mN/m usando 9% de milhocina em um meio para *Candida sphaerica*, enquanto Gudiña et al. (2015) alcançou uma produção de biossurfactantes de 1,3 g/L usando 10% de milhocina em um meio para *Bacillus subtilis*. Sendo assim, para o presente estudo foi escolhida a maior concentração de milhocina (5,0 g/L).

4.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE COM RESÍDUOS DE JUNÇA SÓLIDO E LÍQUIDO

Nessa etapa, avaliou-se o uso dos resíduos de junça com milhocina, visto que ambos se mostraram significativos para a produção de biossurfactante, mas na ausência de sulfato de amônia, que não apresentou relevância para o índice de emulsificação. Os efeitos dos diferentes meios de produção (controle - CT; resíduo da junca líquido e milhocina RJL+MCNA e resíduo da junca sólido e milhocina RJS+MCNA) e dos tempos de fermentação (0, 24, 48, 72, 96 h) foram estudados por meio de um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial.

Na Figura 11, observa-se os resultados encontrados para o crescimento celular durante a produção de biossurfactante.

Figura 11: Médias do crescimento celular do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio + extrato de lêvedo), milhocina 5,0 g/L com resíduo sólido de junça (RJS) e resíduo líquido de junça (RJL).



Os resultados da Figura 11 indicam que os meios contendo resíduos de junça com milhocina não estimularam o crescimento celular, alcançando valores de biomassa que não ultrapassaram 3 g/L ao longo de 24 horas de cultivo. No entanto, esse valor está em conformidade com o valor encontrado anteriormente no meio utilizando SAM+RJ+MCNA 5,0 (Figura 5) que apresentou um valor máximo de 2,7 g/L. O meio controle, atinge o valor de aproximadamente 4 g/L, que também está de acordo com o encontrado anteriormente para esse meio (Figura 5).

É interessante observar que os comportamentos de crescimento celular para RJL e RJS são semelhantes. Durante o processo fermentativo do RJL, ocorreu uma notável formação de espuma, sugerindo que uma parte significativa das células migrou do meio reacional para a espuma, explicando o baixo crescimento celular. Esse efeito semelhante foi observado no RJS, onde também ocorreu migração de células de *Y. lipolytica* para a superfície dos grânulos de junça, depositados no fundo do Erlenmeyer.

Os resultados da Tabela 10 indicam que tanto os diferentes meios de produção quanto os tempos de fermentação foram estatisticamente significativos para o crescimento celular ($p < 0,05$). A interação entre esses fatores também mostrou significância, destacando que eles não operam de forma independente.

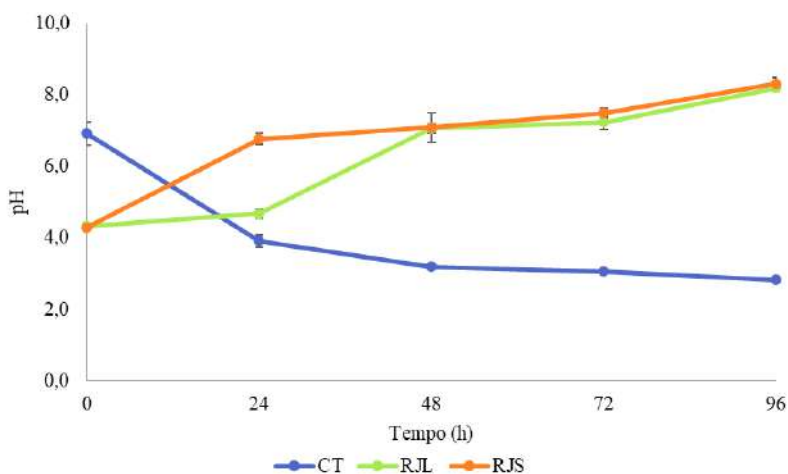
Tabela 10. Resultado da ANOVA para o crescimento celular obtido para produção de biossurfactante com diferentes meios de produção (resíduos de junça) em diferentes tempos de fermentação.

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Meios de Produção (MP)	2	2,7547	1,3774	21,672	0,000038
Tempo de Fermentação (Tf)	4	9,7603	2,4401	38,393	0,000000
MP X Tf	8	5,4427	0,6803	10,705	0,000058
Resíduo	15	0,9533	0,0636		
Total	29	18,911	4,5614		

FV: Fontes de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste de fisher; p-valor: probabilidade.

Na figura 12, observa-se os resultados encontrados para o pH na produção de biossurfactante.

Figura 12: Médias do pH do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio + extrato de levedo), milhocina 5,0 g/L com resíduo sólido de junça (RJS) e resíduo líquido de junça (R JL).



De acordo com os dados apresentados nos experimentos anteriores, a Figura 12 mostra que o pH dos meios contendo resíduo de junça, atingem o pH de aproximadamente 7 após 48h de fermentação, alcançando um valor pouco acima de 8 para ambos os meios no tempo de 96h. O meio controle, tem o pH acidificado ao longo da fermentação, atingindo um mínimo de aproximadamente 3, conforme observado anteriormente (Figura 7). Estudando a influência do pH na produção do biossurfactante por *Y. lipolytica*, Zinjarde e Pant (2002) observaram que em pH em torno de 8,0 foi obtida melhor produtividade.

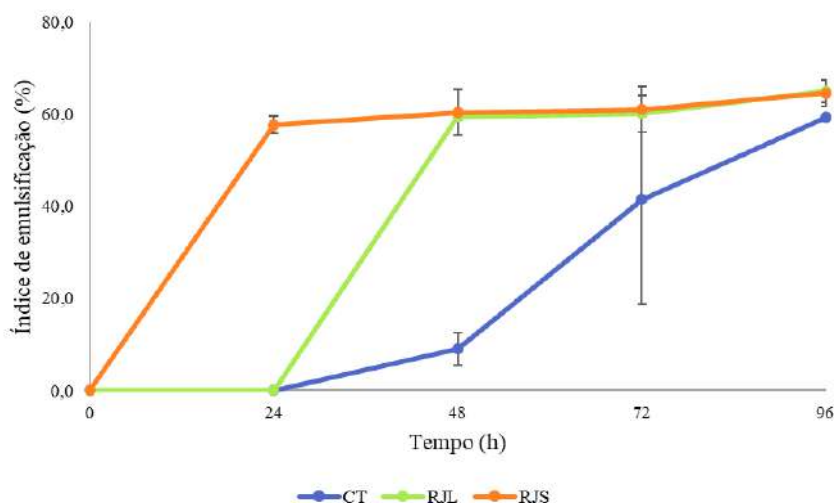
De acordo com a ANOVA, o meio de produção, tempo de fermentação e a interação entre eles foram significativos ($p < 0,05$) para o índice de emulsificação e o desdobramento dessa interação pode ser visto na tabela 11.

Tabela 11. Resultado da ANOVA para o pH obtido para produção de biossurfactante com diferentes meios de produção (resíduos de junça) em diferentes tempos de fermentação.

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Meios de Produção (MP)	2	45,0168	22,5084	722,39	0,000000
Tempo de Fermentação (Tf)	4	7,2547	1,8137	58,21	0,000000
MP X Tf	8	57,0301	7,1288	228,79	0,000000
Resíduo	15	0,4674	0,0312		
Total	29	109,769	31,4821		

FV: Fontes de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste de fisher; p-valor: probabilidade.

Figura 13: Médias do índice de emulsificação do cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios de produção de biossurfactante, realizado em Erlenmeyer de 1 L com 500 mL de meio de cultivo nos seguintes meios CT (glicose + glicerol + sulfato de amônio + extrato de levedo), milhocina 5,0 g/L com resíduo sólido de junça (RJS) e resíduo líquido de junça (RJL).



Na figura 13, observa-se os resultados encontrados para o índice de emulsificação durante a produção de biossurfactante. O meio contendo resíduo sólido de junça com milhocina promoveu a produção de biossurfactante, atingindo valores de índice de emulsificação em torno de 60% já nas primeiras 24 h de cultivo, enquanto o CT e RJL+MCNA permanecem em 0%, indicando que, mesmo com as células aderidas aos grânulos de junça, produção de biossurfactante para o meio. Sabe-se que a produção de biossurfactante está correlacionada ao crescimento celular, no entanto, a presença de um maior número de células não implica

necessariamente em uma concentração elevada de biossurfactante produzido. De acordo com as observações de Rodrigues et al. (2006) e Sharma et al. (2014), a produção de biossurfactante ocorre durante a fase de crescimento exponencial.

O índice de emulsificação do meio constituído por junça líquida com adição de milhocina foi equivalente ao controle a partir de 72 horas de fermentação (Figura 13). Antunes (2010) estudou o potencial de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 na produção de biossurfactante utilizando 3,5% de milhocina e outros resíduos, encontrando IE em torno de 70% em 72 h de cultivo. Após 72 h, os índices de emulsificação de todos os meios não diferem entre si e os meios contendo resíduo de junça e milhocina alcançam resposta em torno de 60%.

Na Tabela 12 observa-se por meio da ANOVA que o meio de produção, tempo de fermentação e a interação MP x Tf também foram significativos ($p < 0,05$) para o índice de emulsificação.

Tabela 12. Resultado da ANOVA para o índice de emulsificação obtido para produção de biossurfactante com diferentes meios de produção (resíduos de junça) em diferentes tempos de fermentação.

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Meios de Produção (MP)	2	3609,86	1804,93	45,9193	0,000000
Tempo de Fermentação (Tf)	4	16108,27	4027,07	102,4527	0,000000
MP X Tf	8	4825,96	603,25	15,3472	0,000006
Resíduo	15	589,60	39,31		
Total	29	25133,69	6474,56		

FV: Fontes de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste de fisher; p-valor: probabilidade.

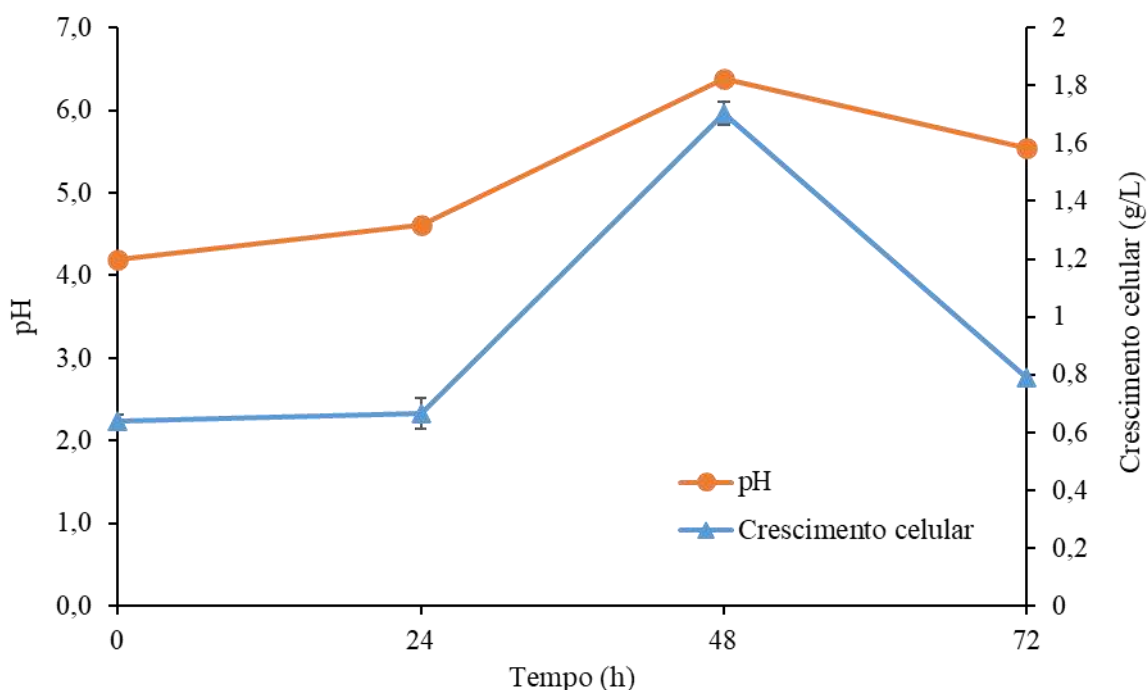
4.4. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE EM BIORREATOR COM CONTACTORES DE MEMBRANA

Com base nos resultados obtidos anteriormente para a produção de biossurfactante pela levedura *Y. lipolytica* (em torno de 60% de índice de emulsificação) em meio contendo apenas resíduos agroindustriais, testou-se a produção em biorreatores a fim de avaliar sua produção em maior escala.

Os resultados fornecidos na Figura 8 indicam um crescimento celular máximo de 1,7 g/L em 48 horas, confirmando o resultado obtido utilizando RJS+MCNA no experimento em Erlenmeyer. Este baixo crescimento pode ser atribuído à aderência dos grânulos de junça aos poros da membrana contactora, resultando na falta de nutrientes no meio para favorecer o desenvolvimento do micro-organismo. Outra possível explicação para essa ocorrência é a migração das células para a superfície dos grânulos de junça, buscando facilitar o acesso aos

nutrientes, embora não tenha eliminado o fato de que esses grãos permaneceram aderidos à membrana porosa. Segundo Beopoulos (2009) as respostas fisiológicas de *Y. lipolytica* a substratos hidrofóbicos incluem processos de transporte mediados pela superfície e interação direta na interface, a produção de biossurfactantes, a hidrofobização da membrana citoplasmática e a formação de protrusões.

Figura 14. Médias do crescimento celular e pH de *Y. lipolytica* após 72 h de fermentação em biorreator de 5L com contactores de membrana para produção utilizando resíduo sólido de junca (RJS) 10 g/L e milhocina (MCNA) 5,0 g/L.

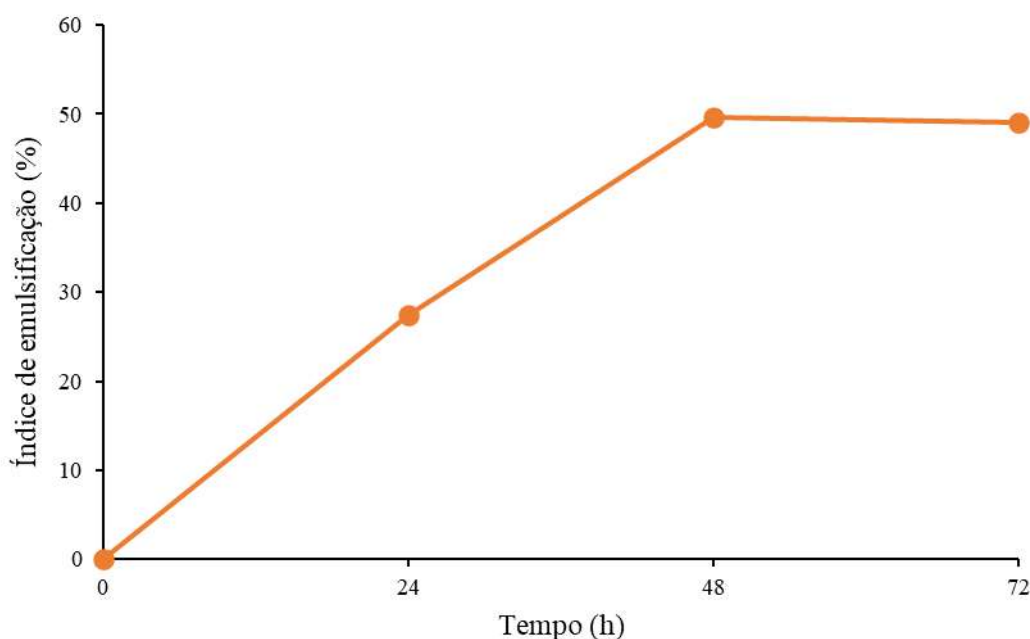


Conforme evidenciado pelos resultados na Figura 14, o pH inicial do meio situou-se em aproximadamente 4, alinhando-se com os observados ao empregar o meio contendo RJS+MCNA. O valor máximo de pH atingido foi de 6,4 em 48 horas, decrescendo para 5,5 em 72 horas. Este padrão não condiz com o esperado, uma vez que geralmente o pH se mantém entre 7-8; essa variação pode ser atribuída à contaminação bacteriana, resultando na produção de produtos secundários. Sánchez-Clemente (2020) demonstrou que a fonte de carbono no meio pode levar a alterações de pH durante o crescimento bacteriano, no meio com glicose como fonte de carbono, foi observada leve acidificação do meio para todas as cepas testadas no estudo.

A perda significativa de células do meio reacional pode ter comprometido a produção de biossurfactante, que não alcançou valores obtidos em Erlenmeyer. Mesmo assim, valores

superiores a 50% foram obtidos em 72 h de cultivo (Figura 15). Importante destacar que, ao contrário do observado no experimento em Erlenmeyer, os resíduos sólidos de junça agora não permanecem mais no meio reacional, conforme mencionado anteriormente. Esta alteração se configura como um dos fatores responsáveis pela remoção das células do meio, e consequentemente, a baixa produção de biossurfactante. A adesão de *Y. lipolytica* a substratos foi investigada por Lehocký et al. (2008), que descobriram que filmes finos semelhantes a teflon preparados com plasma eram adequados para adesão forte e seletiva das células de levedura.

Figura 15. Médias do índice de emulsificação da *Y. lipolytica* após 72 h de fermentação em biorreator de 5L com contactores de membrana para produção utilizando resíduo sólido de junca (RJS) 10 g/L e milhocina (MCNA) 5,0g/L.



4.5. RELAÇÃO DE CUSTOS DE PRODUÇÃO

A Tabela 13 apresenta a análise comparativa dos custos de produção de biossurfactante, sendo confrontado o meio controle otimizado conforme Fontes et al. (2010) com o meio escolhido neste estudo, compostos exclusivamente por resíduos agroindustriais.

Tabela 13. Custo dos meios utilizados para produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*: meios controle (CT) e resíduo sólido de junca (RSJ).

	Marca	Preço (R\$/kg)	Meio pré- inóculo ¹ (R\$/L)	Meio de produção(R\$/L)	
				CT ²	MCNA ³
Ext.levedura ⁴	Hunan Insen Biotech Co., Ltd	49,4	0,494	0,02	-

Peptona ⁴	Wuxi Inmetro New Materials Co., Ltd.	128,44	2,57	-	-
Glicose ⁴	FuFeng	3,46	0,07	0,14	-
Glicerol ⁴	Xi'an International Healthcare Factory Co., Ltd.	13,83	-	0,28	-
Sulf. Amônio ⁴	Wuxi Volksky New Materials Co., Ltd.	24,7	-	0,25	-
Milhocina ^{*4}	Intas Pharmaceuticals e Pharmanza India Ltd	1,48	-	-	0,07
Junça ^{*5}	Grau alimentício	2,47	-	-	0,25
Total			3,13	0,69	0,32

*Cotação do dia 11/12/2023 dólar a R\$4,94

1 Meio de pré-inóculo utilizado para os experimentos de produção de biossurfactante: YPD (1% extrato de levedo; 2% de peptona e 2% de Glicose)

2 CT: meio controle (glicose (4%), glicerol (2%), sulfato de amônio (10 g/L) e extrato de levedura (0,5 g/L)

3 RSJ: meio contendo 10 g/L de resíduo sólido de junça e 5 g/L de milhocina.

4 Preço obtido através do site alibaba

5 Resíduo de junça não é vendido comercialmente, foi considerado o preço da junça in natura, da empresa PRX ALIMENTOS LTDA

Na tabela 13, é notável que a adoção de matéria-prima mais econômica resulta na diminuição dos custos associados ao meio de produção de biossurfactante. Mesmo ao empregar fontes de carbono e nitrogênio mais dispendiosas no meio de crescimento celular (meio de pré-inóculo), o custo é duas vezes inferior no caso do meio de produção utilizando resíduo de junça quando comparados aos custos do meio de produção CT.

A seleção cuidadosa de componentes econômicos é crucial para o desenvolvimento de processos mais acessíveis (Makkar & Cameotra, 2002). Para isso, subprodutos ou resíduos agroindustriais contendo carboidratos, lipídios e proteínas foram escolhidos para suportar o crescimento e a síntese de surfactantes. Os custos de tratamento e descarte desses resíduos são significativos para indústrias que buscam alternativas para reduzir, reutilizar, reciclar e valorizar seus resíduos. Com a ênfase na construção de uma sociedade sustentável em harmonia com o meio ambiente, a introdução da tecnologia verde em todos os setores da indústria é um dos desafios mais importantes (Nitschke & Costa, 2007).

Nesse contexto, a utilização de materiais primários de baixo custo, especialmente resíduos agroindustriais, é crucial para a produção de biossurfactantes devido ao potencial de redução de custos de produção e impacto ambiental (Lourenço et al., 2021, Saravanan & Vijayakumar, 2014). Além de reduzir os custos de produção, o uso de resíduos agroindustriais contribui para a sustentabilidade ambiental ao reaproveitar materiais residuais (Neboh et al., 2016; Rivera et al., 2019).

5. CONCLUSÕES

Este estudo ressalta o potencial biotecnológico da levedura *Yarrowia lipolytica* 50682 na produção de biossurfactantes, utilizando resíduos agroindustriais como meio de cultivo alternativo e de baixo custo. Os resultados obtidos, principalmente com relação aos custos de produção evidenciam que o custo de produção pode ser duas vezes menor quando comparado ao meio controle, otimizado por Fontes et al. (2010).

A combinação dos resíduos agroindustriais resíduo sólido de junça e milhocina, mostrou-se uma excelente estratégia para fornecer nutrientes favoráveis ao crescimento microbiano e à biossíntese de biossurfactantes. As concentrações de 10 g/L para o resíduo de junça e 5 g/L para milhocina, resultaram um índice de emulsificação superior a 60%, o que demonstra ser promissor para obtenção de elevada concentração de surfactante.

A ampliação da escala de produção em biorreatores demonstrou desafios associados à aderência dos grânulos de junça na membrana contactora, impactando negativamente o crescimento celular e a produtividade. A implementação de um sistema de filtração ou peneiramento acoplado ao contactor de membranas surge como uma solução, porém, a pré-avaliação é crucial para evitar complicações operacionais.

Conclui-se que a *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir biossurfactantes, utilizando a combinação do resíduo sólido de junça e milhocina, destacando-se como um meio nutricionalmente rico, proporcionando resultados promissores.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Utilização de biorreatores com fracionamento de espuma. Chen (2006) desenvolveu um método de produção em lote com fracionamento de espuma, que aumentou significativamente o rendimento do biossurfactante. A espuma foi encaminhada através da coluna de fracionamento de espuma até um rompedor mecânico de espuma, e um espumado enriquecido com biossurfactante foi coletado. A concentração de surfactina no produto espumado foi cerca de 50 vezes maior que a do meio de cultura. Utilizando o reator integrado, foram produzidos 136 mg L⁻¹ de surfactina, significativamente mais do que foi alcançado em frascos agitados (92 mg L⁻¹).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSEOUD, M., Maachi, R.R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A.S. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, 223, 143-151, 2008.

ABREU, M.M., & TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**, 2, 237-252, 2008.

ACCORSINI, F. R. **Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono**. Tese (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

ADENOWO, A.F., & KAZEEM, M.I. Tiger Nut as A Functional Food, Pharmacological and Industrial Agent: A Mini Review. **Annals of Science and Technology**, 5, 31-38, 2020.

AKBARI, S., ABDURAHMAN, N.H., YUNUS, R.B., FAYAZ, F., & ALARA, O.R. (2018). Biosurfactants-a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, 2, 81-90, 2018.

AKHTAR, M., Blanchette, R.A., Kent Kirk, T. Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 57, 159-195, 1997.

ALMEIDA, G.A., VIEIRA NETA, M.D., SILVA, G.T., PRADO, P.F., ALMEIDA, M.A., DUARTE, I.C. (2020). Produção de biossurfactante por *Lysinibacillus sp.* e *Bacillus sp.* a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. **Matéria (Rio de Janeiro)**, 2020.

ALVES, L. A. D. F., et al.. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1–19, 2017.

AMARAL, P. F.F., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., & Coutinho, J. A. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. **Biosurfactants**, 236-249, 2010.

AMARAL, P. F. F.; DA SILVA, J. M.; LEHOCKY, B. M., BARROS-TIMMONS A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**. 41, 1894–1898, 2006.

AMODU, O.S.; Ntwampe, S.K.; Ojumu, T.V. Emulsification of hydrocarbons by biosurfactant: Exclusive use of agrowaste. **BioResources**, 9, 3508–3525, 2014.

ANTUNES, A. A. **Produção, caracterização e aplicação do biossurfactante isolado de *Chromobacterium violaceum* em meios alternativos e de baixo custo**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 2010.

ANTUNES, A. A., ARAÚJO, H. W. C. D., SILVA, C. A. A. D., ALBUQUERQUE, C. D. D. C., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arquivos do Instituto Biológico**, 80, 334-341, 2013.

ARAÚJO, L. V. D., FREIRE, D. M. G., NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, 36(6), 848-858, 2013.

ARAÚJO, R., et al. Surfactants as Renewable Building Blocks for the Synthesis of Amphiphilic Compounds. **Molecules**, 18(7), 7670–7702, 2013.

ARCANJO, S. A. **Preparação de emulsões complexas a partir de dispositivos de microfluídica**. Tese (Mestrado em Física Aplicada) - Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

AUDU, H., JIMOH, A., PAUL, S. Production of Biosurfactant from microorganism using tigernut as sole carbon source, 2019.

BANKAR, A.V., KUMAR, A.R., ZINJARDE, S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 84, 847-865, 2009.

BARBOSA, C.K., COSTA, J.P., BONFIM, F.P., ALMEIDA, A.C., MARTINS, E.R. Qualidade microbiológica de plantas medicinais cultivadas e comercializadas em Montes Claros, MG. **Biotemas**, 23, 77-81, 2011.

BARBOSA, P. M., SANTOS, M. D., SANTOS, E. G., BATISTOTE, M., LEITE, R. S. Leveduras selvagens isoladas do caldo de cana com perfil para a produção de enzimas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 17, 2020.

BAUER, C. M., SCHMITZ, C., LANDELL, M. F., MARASCHIN, M. Biosynthesis of fatty acids and biosurfactants by the yeast *Yarrowia lipolytica* with emphasis on metabolic networks and bioinformatics. **Biotechnology Research and Innovation**, 2022.

BEOPOULOS, A., CESCUI, J., HADDOUCHE, R., URIBELARREA, J., MOLINA-JOUVE, C., NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, 48(6), 375–387, 2009.

BRUMANO, L. P., SOLER, M. F., DA SILVA, S. S. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, 12(1), 31–39, 2016.

CAMEOTRA, S. S., & MAKAR, R. S. Synthesis of Biosurfactants. **Biotechnology Letters**, 24(22), 1707–1714, 2002.

CAMPOS, O. F., & SILVA, A. G. Fontes alternativas de proteína no sucedâneo do leite para bezerros: Revisão da literatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 21, 1089–1099, 1986.

CHEN, C., BAKER, S. C., DARTON, R. C. Batch production of biosurfactant with foam fractionation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 81, 1923–1931, 2006.

CHIANI, M., AKBARZADEH, A., FARHANGI, A., MR, M. Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. **Pakistan journal of biological sciences : PJBS**, 13 23, 1151-5, 2010.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2, 930–944, 2010.

COLLA, L. M., & COSTA, J. A. Obtenção e aplicação de biossurfactantes, **VETOR - Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, 13, 85, 2003.

COOPER, D. G., & GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, 53(2), 224–229, 1987.

COSTA, G. A. N. & PASTORE, G. M. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, 2005.

COSTA NETO, J. J. G., AMARAL, P. F. F., FONTES, G. C., LEÃO, M. H. R.(2016). Otimização de um processo de extração de leite de junça via estratégia sequencial de planejamentos. **COBEQ Fortaleza**, Ceará.

CUI, Z., GAO, C., LI, J., HOU, J., LIN, C. S., QI, Q. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH. **Metabolic Engineering**, 42, 126–133, 2017.

DAVEREY, A., & PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low-cost fermentative media. **Food Research International**, 42, 499–504, 2009.

DE LIMA E SILVA, T. A., DE LUNA, J. M., DE MORAES FILHO, M. A., DE CAMPOS TAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, 8(1), 19–26, 2010.

DECESARO, A., BERTICELLI, R., MAGRO, F. G., COLLA, L. M. Biossurfactantes em processos de biorremediação, **Revista Ciências Exatas e Naturais**, 17, 1, 119-143, 2015.

DESAI, J. D., & BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61, 47–64, 1997.

DIAS, M., & NITSCHKE, M. Produção de biossurfactantes por bactérias diazotróficas utilizando diferentes fontes de carbono. **Anais do II Congresso Brasileiro de Biotecnologia On-line**, 2022.

DRAKONTIS, C. E., & AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 48, 77–90, 2020.

DU-NOUY, P. L. A new apparatus for measuring surface tension. **Journal of General Physiology**, 1 (5), 521, 1919.

FELIX, A. K. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju.** Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

FERREIRA, T. F., MARTINS, F. F., CAYRES, C. A., AMARAL, P. F., AZEVEDO, D. D., COELHO, M. A. Biosurfactant Production from the Biodegradation of n-Paraffins, Isoprenoids and Aromatic Hydrocarbons from Crude Petroleum by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. **Fermentation**, 2022.

FEUP. Tensão superficial. 10 de julho de 2014. <https://biblioteca.fe.up.pt/arquivo/glossario/tensaosuperficial/index.html> (acessado em 30 de novembro de 2023).

FICKERS, P., BENETTI, P. H., WACHE, Y., MARTY, A., MAUERSBERGER, S., SMIT, M. S., NICAUD, J. M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS Yeast Research**, 5, 527–543, 2005.

FICKERS, P., MARTY, A., NICAUD, J. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, 29(6), 632–644, 2011.

FONTANA, J. D., MENDES, S. V., PERSIKE, D. S., PERACETTA, L., PASSOS, M. Carotenóides Cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 13, 40–45, 2000.

FONTES, G. C. **Produção de Biossurfactante por *Yarrowia lipolytica***. Tese (Mestrado em em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Cidade Universitária, 122p., 2008.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., NELE, M., COELHO, M. A. Z. Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

FONTES, G. C., RAMOS, N. M., AMARAL, P. F. F., NELE, M., COELHO, M. A. Z. Renewable Resources for Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 29(03), 483–493, 2012.

FREITAS, M. DE F. M., CAVALCANTE, L. S., GUDIÑA, E. J., SILVÉRIO, S. C., RODRIGUES, S., RODRIGUES, L. R., GONÇALVES, L. R. B. Sustainable Lipase Production by *Diutina rugosa* NRRL Y-95 Through a Combined Use of Agro-Industrial Residues as Feedstock. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 193(2), 589–605, 2021.

Global Surfactants Market Size, Skyquestt, Outubro, 2022. Disponível em: <<https://www.skyquestt.com/report/surfactants-market>> Acesso em: 20 de nov. de 2023

GONÇALVES, F., COLEN, G., TAKAHASHI, J. A. *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. **The Scientific World Journal**, 2014.

GOUVEIA, Ester R.; LIMA, Danielle P. A.; SOCORRO-DUARTE, Maria do; SOUZA-LIMA, Gláucia M. de; ARAÚJO, Janete M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 30, 39-45, 2003.

GOUVEIA, F. B. Propostas para a prática de microbiologia utilizando recursos de baixo custo, **Maiêutica-Ciências Biológicas**, 1, 1, 2013.

GUDIÑA, E. J., FERNANDES, E. C., RODRIGUES, A. I., TEIXEIRA, J. A., RODRIGUES, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in Microbiology**, 6, 2015.

HAMME, J. D. V., SINGH, A., WARD, O. P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, 24(6), 604–620, 2006.

HEALY, M. G., DEVINE, C., MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. **Studies in Environmental Science**, 66, 1996.

HOFER, A., HAUER, S., KROLL, P., FRICKE, J., & HERWIG, C. In-depth characterization of the raw material corn steep liquor and its bioavailability in bioprocesses of *Penicillium chrysogenum*. **Process Biochemistry**, 2018.

HOMMEL, R. K. Formation and function of biosurfactants for degradation of water-insoluble substrates. **Biochemistry of microbial degradation**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. p. 63-87, 1994.

HUA, Z., CHEN, J., LUN, S., WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganisms and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, 37(17), 4143–4150, 2003.

INDELICATO, S., BONGIORNO, D., CALABRESE, V., PERRICONE, U., ALMÉRICO, A. M., CERAULO, L., PIAZZESE, D., TUTONE, M. Micelles, Rods, Liposomes, and Other Supramolecular Surfactant Aggregates: Computational Approaches. Interdisciplinary Sciences: **Computational Life Sciences**, 9, 392–405, 2017.

JAHAN, R., BODRATTI, A. M., TSIANOU, M., ALEXANDRIDIS, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, 102061, 2019.

KRIEGER, N., CAMILIOS NETO, D., MITCHELL, D. A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 672, 203–210, 2010.

KRONEMBERGER, F. D. A. et al. Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 147(1-3), 33–45, 2008.

LEHOCKÝ, M., AMARAL, P. F., ŠTAHEL, P., COELHO, M. A., BARROS-TIMMONS, A., COUTINHO, J. A. Deposition of *Yarrowia lipolytica* on plasma-prepared Teflon-like thin films. **Surface Engineering**, 24, 23–27, 2008.

LOTFABAD, T.B.; SHOURIAN, M.; ROOSTAAZAD, R.; NAJAFABADI, A.R.; ADELZADEH, M.R., An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, 69, 183-193, 2009.

LOURENÇO, L.A., RODRIGUES, É.F., SIMÃO, L., JÚNIOR, A.H.S., OLIVEIRA, C.R.S. BIOSURFACTANT PRODUCTION FROM FOOD AND AGROINDUSTRIAL WASTE: A BRIEF REVIEW. **Inovação, Gestão e Sustentabilidade na Agroindústria**, 2021.

LUNA, J. M., RUFINO, R. D., SARUBBO, L. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**, 6, 2, 209-216, 2008.

MADZAK, C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 99, 4559–4577, 2015.

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**, 58, 428–434, 2002.

MAKKAR, R. S., & CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 18, 37–42, 1997.

MARINHO, P. S., SILVA, R. M., LUNA, J. M. Biossurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, 2022.

MARQUES, M. **Revestimentos Anti-fingerprint**, Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto. Portugal, 2015.

MENEGASSI, B. Extrusão de farinha de mandioca-salsa: efeito da temperatura, rotação e umidade nas características físicas dos extrusados. **Braz J Food Technol.**, 10(4), 252–258, 2007.

MEYER, E. F.; WYSEL, G. M.; J. The cross-sectional area of the t-butyl group from surface tension data: A modification of a physical chemistry experiment. **Journal of Chemical Education**, 63(11), 996, 1986.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M.F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Porto Alegre: Edgar Blücher, v. 3, p. 245-265, 2001.

MORAIS, R. K. S. de, & ABUD, A. K. S. Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. **Scientia Plena**, 8(10), 2013.

MORGNER, H. Behavior of surfactant molecules near the critical micelle concentration: a statistical treatment. **The journal of physical chemistry. B**, 112(5), 1383–1390, 2008.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, 133(2), 183–198, 2005.

MUTHUSAMY, K. K., GOPALAKRISHNAN, S., RAVI, T., SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, 94, 736–747, 2008.

NEBOH, H. A.; ABU, G. O.; UYIGUE, L. Utilization of agro-industrial wastes as substrates for biosurfactant production. **International Journal of Geography and Environmental Management**, 2504-8821, 2016.

NETO, J. C., AMARAL, P., LEÃO, M. R., GOMES, T., SANT'ANA, G. Optimization of the extraction and nutritional value of tiger nut milk by sequential design strategy. **Journal of Food Studies**, v. 6, p. 14-30, 2017.

NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, 29, 2012.

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**, 9, 2021.

NISHIDA, Luiz. Tensão superficial - Será que a agulha afunda? UNESP, 2019. Disponível em: <<https://www.ibb.unesp.br/#!//extensao/projetos/fazendo-ciencias-estimulando-o-interesse-e-a-construcao-de-conhecimentos-de-alunos-dos-anos-iniciais/experimentos-de-fisica/tensao-superficial/>> Acesso em 29 de Nov. de 2023.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, [s.l.], 25, 5,772-776, 2002.

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

NOGUEIRA, W. V., de Oliveira, F. K., Garcia, S. D., Sibaja, K. V., Tesser, M. B., Garda Buffon, J. Sources, quantification techniques, associated hazards, and control measures of mycotoxin contamination of aquafeed. **Critical Reviews in Microbiology**, 46, 26-37, 2020.

OLIVEIRA, E. M., SALES, V. H., DIAS, E. D., BORGES, W. L., ANDRADE, M. S., SOUZA, T. M. Diferentes estratégias para aumentar a produção de biossurfactante de um isolado de *Paenibacillus sp.* (BR13834). **Research, Society and Development**, 2021.

OLIVEIRA, E. V. **Obtenção de esporos de *Bacillus thuringiensis* utilizando milhocina como substrato**, Tese (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

OLIVEIRA, N. A. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. Tese (Mestrado em Microbiologia Ambiental e Industrial) - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

OLIVEIRA, R. D., GÓES-NETO, A., UETANABARO, A. P., ROSA, C. A., ASSIS, S. A. Produção de pectinases por leveduras: uma revisão. **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**, 2009.

OSSA, S. N. **Bioprospección de microorganismos presentes en hidrocarburos para determinar el potencial productor de biosurfactantes y determinación de equipos principales para su producción**. Tese (Mestrado em Engenharia de Processos) - Faculdade de Engenharia, Universidad EAN. Colômbia, Bogotá D.C, 2020.

PANTINA, J. P., &FURST, E. M. Micromechanics and contact forces of colloidal aggregates in the presence of surfactants. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, 24(4), 1141–6, 2008.

PERFUMO, A., SMYTH, T. J., MARCHANT, R., BANAT, I. M. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Springer, 1501-1512, 2010.

RAJASIMMAN, M., SUGANYA, A., MANIVANNAN, P., & PANDIAN, A.M. Utilization of agroindustrial wastes with a high content of protein, carbohydrates, and fatty acid used for mass production of biosurfactant. **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**, 2021

RIBEIRO, B. G., MEDEIROS, A. O., GUERRA, J. M., SARUBBO, L. A. Biosurfactante Produzido Pela Levedura *Candida Utilis*: Produção E Isolamento. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, 2018.

RIVAS B, MOLDES AB, DOMÍN GUEZ JM, PARAJO JC. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International journal of food microbiology**, 97, 93-98, 2004.

RIVERA, A.D.; URBINA, M. A.M.; LÓPEZ, V.E.L. Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 35 (10), 155, 2019.

RODRIGUES, L., MOLDES, A., TEIXEIRA, J., OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, 28, 109-116, 2006.

RON, E.Z., & ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current opinion in biotechnology**, 13(3), 249-52, 2002.

ROSELLÓ-SOTO, E., POOJARY, M.M., BARBA, F.J., LORENZO, J., MAÑES, J., MOLTÓ, J.C. Tiger nut and its by-products valorization: From extraction of oil and valuable compounds to development of new healthy products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 45, 306-312, 2018.

SAHARAN, B.S., SAHU, R.K., SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives, **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, 2011(1), 1-14, 2011.

SÁNCHEZ-ZAPATA, E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Tiger Nut (*Cyperus esculentus*) Commercialization: Health Aspects, Composition, Properties, and Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 11, 366-377, 2012.

SANTOS, A.P., SILVA, M., COSTA, E.V. Biossurfactantes: Uma alternativa para o mercado industrial. *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, 5, 88-103, 2016.

SANTOS, D.K., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SANTOS, V., SALGUEIRO, A.A., SARUBBO, L.A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 105, 43-50, 2013.

SANTOS, L. C. D. Avaliação da potencialidade do uso de biossurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru, Trabalho apresentado na XI Jornada de Iniciação Científica.

Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2003.

SANTOS, R.B., SILVA, J.M., SILVA, C.D., NASCIMENTO, M.D., SANTOS, T.M., COSTA, J.H. Qualidade microbiológica de alimentos in natura minimamente processados. **Global Science and Technology**, 12, 2019.

SANTOS, S.F., MELO, A.L., LIMA, A.K., PEREIRA, L.M., SANTOS, F.A., MEDEIROS, N.M., SILVA, M.G. Avaliação da produção de biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*, 2018.

SARAVANAN, V., & VIJAYAKUMAR, S. (2014). Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* PB3A using agro- industrial wastes as a carbon source. **Malaysian Journal of Microbiology**, 2014.

SCHRAMM, L.L., STASIUK, E.N., MARANGONI, D.G. Surfactants and their applications, **Annual Reports Section" C"(Physical Chemistry)**, 99, 3-48. 2003.

SHABAN, S.M., KANG, J., KIM, D. Surfactants: Recent advances and their applications. **Composites Communications**, 2020.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. **International Journal of Microbiology**, 2014, 7, 2014.

SHATILA, F., UYAR, E., YALCIN, H.T. Screening of Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica* Strains and Evaluation of Their Antibiofilm and Anti-Adhesive Activities against *Salmonella enterica* ser. Enteritidis Biofilms. **Microbiology**, 90, 839-847, 2021.

SILVA, A.D., VIEIRA, I.M., MOURA, T.M., RUZENE, D.S., SOUZA, R.R., SILVA, D.P. Aplicação de biossurfactantes: avaliação de meios de cultivo a base de amido. **Anais do VIII SIMPROD**, 2016.

SILVA, J.F., SILVA, L.F., BARBOSA, M.R., HOULLOU, L.M., MALAFAIA, C.B. Bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica* using residual glycerol as a carbon source. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, 5(1), 031-037, 2020.

SILVA, S., FARIAS, C.B., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. Colloids and surfaces. B, **Biointerfaces**, 79(1), 174-83, 2010.

SILVA, T.A., LUNA, J.M., FILHO, M.A., TAMBOURGI, E.B., TAKAKI, G.M. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, 8(1), 19-26, 2010.

SMITH, G.N., BROWN, P., ROGERS, S.E., EASTOE, J. Evidence for a critical micelle concentration of surfactants in hydrocarbon solvents. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, 29(10), 3252-8, 2013.

SOBRINHO, H. B. D. S. Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Tese (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - **Universidade Católica de Pernambuco**, Recife, 2007.

SOLANKI, J., More, S., Jodhani, K., Patel, D., Nataraj, M. Efficacy of biosurfactant as a coating material for post-harvest preservation of jamun fruit (*Syzygium cumini*). **Environmental and Experimental Biology**, 20(1), 11–23, 2022.

SRISANKAR, E. V.; SHAH, J. P.; NARAYAN, K. S.; J. A simple apparatus for measuring dynamic surface tension. **Journal of Chemical Education**, 64(4), 378, 1987.

STEINHART, M. R. Auxiliares têxteis do ponto de vista dos tensoativos. **Revista Química Têxtil**, 61, 76, 2000.

SUITA, S.M. **O uso da dextrose como fonte de carbono no desenvolvimento de bio-flocos e desempenho do camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em sistema sem renovação de água.** Tese (Mestrado em Aquicultura) - Instituto de Oceanografia. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2009.

SURYANTI, V., MARLIYANA, S.D., WULANDARI, A. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* growing on molasses and its application in phenol degradation, **AIP conference proceedings**, AIP Publishing, 2015.

TAKEYAMA, M.M., KAWAGUTI, H.Y., KOBLITZ, M.G., FAI, A.E. Resíduos agroindustriais como insumos promissores para obtenção de bioprodutos por leveduras - uma breve revisão. **Research, Society and Development**, 2020.

TATE, T.; PHILOS. On the magnitude of a drop of liquid formed under different circumstances. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, 27(181), 176-180, 1864.

TEMPLE, V.J., OJOBE, T.O., KAPU, M. Chemical analysis of tiger nut (*Cyperus esculentis*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 50, 261-263, 1990.

VIEIRA, S.P., MOREIRA, T.D., NINK, R.A. Cultivo de fontes amiláceas e produção de bioetanol: uma análise do território de identidade Itaparica. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, 2023.

VOLPATO, C. P. T., HECK, M. C., GIGLIOLLI, A. A. S., YOSHIMOTO-HIGAKI, M., de GODOY, M. A. F., MAGNONI, D. M., VICENTINI, V. E. P. Utilização de glicerol como substrato na produção de biossurfactante. **Research, Society and Development**, 11(16), e474111638391-e474111638391, 2022.

WACHÉ, Y., AGUEDO, M., NICAUD, J., BELIN, J. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 61, 393-404, 2003.

WEI, Y., WANG, L., CHANGY, J., KUNG, S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, 96(2), 174-8, 2003.

WILHELMY, L.; Ueber die Abhängigkeit der Capillaritäts-Constanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des benetzten festen Körpers. **Annalen der Physik**, 195(6), 177-217, 1863.

WOODS J. R.; CHARLES E. **Examination of the effects of biosurfactant concentration on natural gas hydrate formation in seafloor porous media**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Mississippi State University. EUA, Mississippi, 28 f, 2004.

YAÑEZ-OCAMPO, G., SOMOZA-COUTIÑO, G., BLANCO-GONZÁLEZ, C., WONG-VILLARREAL, A. Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from chiapas. **Open agriculture**, 2(1), 341-349, 2017.

YU, Y., LU, X., ZHANG, T., ZHAO, C., GUAN, S., PU, Y., GAO, F. Tiger nut (*Cyperus esculentus* L.): nutrition, processing, function and applications. **Foods**, 11(4), 601, 2022.

ZHU, Q.Q., & JACKSON, E.N. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. **Current opinion in biotechnology**, 36, 65-72, 2015.

ZHOU, K., YU, J., MA, Y., CAI, L., ZHENG, L., GONG, W., & LIU, Q. Corn Steep Liquor: Green Biological Resources for Bioindustry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 194, 3280 - 3295, 2022.

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