

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
ESCOLA DE QUÍMICA

**Juliana de Melo Lopes**



PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Yarrowia*  
*lipolytica* A PARTIR DE ÓLEO CRU PARA CASOS DE  
DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO

RIO DE JANEIRO

2024

Juliana de Melo Lopes

PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTE POR *Yarrowia lipolytica* A PARTIR DE ÓLEO  
CRU PARA CASOS DE DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO

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 Engenheira de Bioprocessos.

Orientadoras: Priscilla Filomena Fonseca Amaral Sécca  
Tatiana Felix Ferreira  
Caroline Alves Cayres

Rio de Janeiro

2024

## CIP - Catalogação na Publicação

L864p      Lopes, Juliana de Melo  
              Produção de biossurfactante por *Yarrowia*  
lipolytica a partir de óleo cru para casos de  
derramamento de petróleo. / Juliana de Melo Lopes. -  
Rio de Janeiro, 2024.  
              55 f.

              Orientadora: Priscilla Filomena Fonseca Amaral .  
              Coorientadora: Tatiana Felix Ferreira.  
              Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de  
Química, Bacharel em Engenharia de Bioprocessos,  
2024.

              1. Biorremediação. 2. Índice de emulsificação. 3.  
Levedura. 4. Resíduos Agroindustriais. 5. *Yarrowia*  
lipolytica. I. Amaral , Priscilla Filomena Fonseca  
, orient. II. Ferreira, Tatiana Felix, coorient.  
III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Juliana de Melo Lopes

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Yarrowia lipolytica* A PARTIR DE ÓLEO  
CRU PARA CASOS DE DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO

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 Engenheira de  
Bioprocessos.

Aprovado em 11 de dezembro de 2024.

---

Priscilla Filomena Fonseca Amaral Sécca, D.Sc., UFRJ

---

Tatiana Felix Ferreira, D.Sc., UFRJ

---

Caroline Alves Cayres, D.Sc., UFRJ

---

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc., UFRJ

---

Adejanildo Pereira, D.Sc., UFRJ

Rio de Janeiro  
2024

*Dedico a minha família, principalmente aos meus pais, Katia e Edmilson, por todo amor,  
incentivo e confiança. Amo vocês!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela força e perseverança, que me permitiram finalizar minha graduação.

Aos meus pais, Katia e Edmilson, por todo amor, apoio, incentivo, paciência e pelos esforços que realizaram para que eu começasse e concluísse essa etapa da minha vida.

Ao meu namorado, Nathan, pelo carinho, ajuda e paciência e por compreender os momentos em que precisei me ausentar.

Agradeço à minha família, meu irmão, meus tios e primos, por toda ajuda e torcida, em especial aos meus primos, Karla e Leo, pelo suporte no momento da pandemia.

À minha prima/irmã, Heloísa, pela amizade, companheirismo, amor, por estar presente e me apoiar em todos os momentos.

À minha tia, Nádia, minha segunda mãe, por todo carinho e apoio.

Às minhas amigas, Beatriz, Luiza, Raquel e Isabelle, por todas as risadas, conversas, companhias para almoço e festinhas, que tornaram a faculdade um pouco mais leve.

Agradeço às minhas orientadoras pelas instruções, atenção e contribuição para minha formação acadêmica. Principalmente à professora Priscilla, pela oportunidade dada para a realização deste trabalho e por me aceitar como sua orientanda.

Aos companheiros do BIOSE e By&Bio pelos ensinamentos, em especial à Nathalia, Adriano e Bruno por toda ajuda.

À FAPERJ que apoiou esse trabalho.

## RESUMO

LOPES, Juliana. **Produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* a partir de óleo cru para casos de derramamento de petróleo.** Rio de Janeiro, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas que são produzidas por diversos microrganismos. Estas substâncias apresentam inúmeras vantagens quando comparados aos surfactantes sintéticos, porém ainda não conseguem competir economicamente devido aos seus altos custos de produção. Esse problema pode ser reduzido através do uso de matérias-primas alternativas, como os óleos residuais. O Brasil é o segundo maior produtor de petróleo *offshore* do mundo e, devido à intensa atividade no mar, grandes quantidades de resíduos oleosos são descartadas na água, prejudicando o ambiente marinho. Como grande parte das moléculas presentes no petróleo são biodegradáveis, a biorremediação tem se mostrado uma técnica de degradação promissora. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo investigar a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 a partir da biodegradação de óleo cru. A influência de diferentes fontes de carbono (glicose e melaço) e de nitrogênio (sulfato de amônia (SA) e milhocina) foi avaliada na produção do biossurfactante com e sem a presença de petróleo. A influência da concentração de inóculo, da adição de extrato de levedura e da velocidade de agitação também foi analisada. Demonstrou-se que *Y. lipolytica* foi capaz de crescer e produzir biossurfactante a partir de todas as fontes investigadas, sendo o meio contendo glicose, petróleo e SA o que atingiu a maior concentração celular (aproximadamente 11,5 g/L) e o meio glicose e SA o que atingiu o maior  $\Delta$ valor de Índice de Emulsificação ( $\Delta$ IE=43,33%). Na maioria dos casos, os experimentos controle (sem petróleo) apresentaram os melhores resultados, no entanto, a produção de biossurfactante dos meios contendo o substrato hidrofóbico é subestimada, visto que o surfactante aderido à parede celular da levedura não foi quantificado. Na presença de petróleo, o maior valor de  $\Delta$ IE (30,95%) foi obtido em meio contendo glicose com sulfato de amônia após 96h. Por fim, os dados obtidos indicaram que a cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 é uma boa produtora de biossurfactante com potencial de aplicação em processos de biorremediação.

Palavras-chave: Biorremediação; Índice de emulsificação; Levedura; Resíduos agroindustriais, *Yarrowia lipolytica*.

## ABSTRACT

LOPES, Juliana. **Production of biosurfactant by *Yarrowia lipolytica* from crude oil for oil spill cases**. Rio de Janeiro, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Biosurfactants are amphipathic molecules which are produced by various microorganisms. They have numerous advantages compared to synthetic surfactants, but they are still unable to compete economically due to their high production costs. This problem can be quantitatively reduced through alternative feedstocks, such as waste oils. Brazil is the second largest producer of offshore oil in the world, and due to intense activity at sea, large amounts of oily waste are discarded into the water, harming the marine environment. As most of the molecules in the petroleum are biodegradable, bioremediation has proven to be a promising degradation technique. Therefore, this work aimed to investigate biosurfactant production from the biodegradation of crude oil. The influence of different sources of carbon (glucose and molasses) and nitrogen (ammonium sulfate (AS) and corn steep liquor) was evaluated on biosurfactant production. Then, the influence of the initial inoculum concentration, supplementation with organic compound, and agitation speed was analyzed. It was demonstrated that *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 could grow and produce biosurfactant from all sources investigated, with the medium containing glucose, petroleum and AS reaching the highest cell concentration (approximately 11.5 g/L) and the glucose and AS medium reaching the highest (Emulsification Index  $\Delta$ value ( $\Delta$ IE=43.33%). In most cases, the control experiments (without petroleum) presented the best results, however, the production of biosurfactant from the media containing the hydrophobic substrate is underestimated, since the surfactant adhered to the yeast cell wall was not quantified. In the medium containing oil, the highest value  $\Delta$ IE (30.95%) was obtained with 96 h of fermentation in the medium containing glucose and ammonium sulfate. The effects observed were different from those without oil and media with oil. Finally, the data obtained indicated that *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 is a good producer of biosurfactant with potential application in bioremediation processes.

Keywords: Agro-industrial waste; Bioremediation; Emulsification index; *Yarrowia lipolytica*; Yeast.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 2.1</b> - Representação esquemática dos surfactantes catiônicos (A), aniônicos (B), anfóteros (C) e não iônicos (D).....	16
<b>Figura 2.2</b> - Organização molecular de um surfactante em uma micela direta (A) e uma micela inversa (B).....	17
<b>Figura 3.1</b> - Morfologia microscópica da levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 (aumento de 1000x) .....	32
<b>Figura 3.2</b> – Método da determinação do índice de emulsificação.....	35
<b>Figura 3.3</b> – Fluxograma das etapas experimentais.....	36
<b>Figura 4.1</b> – Perfil de crescimento celular de <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicose ou melaço como fonte de carbono e milhocina ou sulfato de amônia (SA) como fonte de nitrogênio, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.....	37
<b>Figura 4.2</b> – Índice de emulsificação de <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicose ou melaço como fonte de carbono e milhocina ou sulfato de amônia (SA) como fonte de nitrogênio, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.....	38
<b>Figura 4.3</b> – Perfil de crescimento celular de <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v ou 2% p/v de milhocina ou 2% p/v de milhocina filtrada como fonte de nitrogênio, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo. ....	40
<b>Figura 4.4</b> – Índice de emulsificação de <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v ou 2% p/v de milhocina ou 2% p/v de milhocina filtrada como fonte de nitrogênio, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo. ....	40
<b>Figura 4.5</b> – Índice de emulsificação (IE) após 96 h subtraído pelo valor inicial de IE ( $\Delta$ IE), do cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio, a 28°C e 160 rpm; G: glicose; M: melaço; O: petróleo; CSL: Milhocina. Letras diferentes (a,b,c) significam que os valores diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).....	41

<b>Figura 4.6</b> – Perfil de crescimento celular de <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 1 g/L ou 5 g/L de inóculo, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo. ....	43
<b>Figura 4.7</b> – Índice de emulsificação de <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 1 g/L ou 5 g/L de inóculo, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.....	43
<b>Figura 4.8</b> – Índice de emulsificação <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral com 1% p/v milhocina contendo ou não extrato de levedura (YE), a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.....	45
<b>Figura 4.9</b> – Perfil de crescimento celular de <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 0,1% p/v YE, a 160 ou 250 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.....	46
<b>Figura 4.10</b> – Imagens dos frascos após 96h de crescimento de <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 0,1% p/v YE, a 250 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.....	47
<b>Figura 4.11</b> – Índice de emulsificação de <i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 0,1% p/v YE, a 160 ou 250 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> – Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.....	20
<b>Tabela 2.2</b> – Aplicações de biossurfactantes para usos industriais.....	31
<b>Tabela 4.1</b> – Concentração inicial, pH inicial (0h) e pH final (264h) dos diferentes meios de cultivo.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMC Concentração Micelar Crítica

GRAS *Gerentially Recognized as Safe*

YPD *Yeast Extract, **P**eptone, **D**extrose* – Extrato de levedura, peptona e glicose.

rpm Rotações por minuto

IE Índice de emulsificação

YE Extrato de levedura

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 SURFACTANTES.....	16
2.2 BIOSSURFACTANTES.....	18
2.2.1 Classificação química dos biossurfactantes.....	19
2.2.2 Microrganismos produtores de biossurfactantes.....	21
2.3 <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> .....	22
2.3.1 Aplicação de <i>Y. lipolytica</i> em biorremediação.....	23
2.3.2 <i>Yarrowia lipolytica</i> na produção de biossurfactante.....	24
2.4 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	25
2.4.1 Fontes de carbono.....	25
2.4.1.1 Petróleo.....	26
2.4.2 Fontes de nitrogênio.....	26
2.4.3 Fontes de origens renováveis.....	27
2.4.3.1 Melaço.....	28
2.4.3.2 Milhocina.....	28
2.4.4 Temperatura, pH, agitação e aeração.....	29
2.5 APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES.....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 MATERIAIS.....	32
3.1.1 Materias.....	32
3.1.2 Microrganismo.....	32
3.1.3 Meios de cultivo.....	33
3.2 METODOLOGIAS.....	33
3.2.1 Obtenção do inóculo.....	33
3.2.2 Condução dos experimentos.....	33
3.2.3 Amostragem.....	34
3.2.4 Quantificação do crescimento celular.....	34
3.2.5 Determinação do pH.....	34
3.2.6 Determinação da produção de biossurfactante.....	34
3.2.7 Análise estatística.....	35

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
4.1 INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO.....	37
4.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO.....	42
4.3 EFEITO DA ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA.....	44
4.4 INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO.....	45
4.5 pH DOS MEIOS DE CULTIVO.....	48
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são uma classe de surfactantes produzidos por diversos microrganismos, podendo ser encontrados em superfícies de células microbianas ou secretados extracelularmente. São substâncias formadas por moléculas anfipáticas que possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica (FONTES, 2008). Estas substâncias oferecem várias vantagens quando comparadas com os surfactantes, como menor toxicidade, biodegradabilidade e alta especificidade, o que permite que sejam utilizados em diversas aplicações industriais e ambientais (AMARAL *et al.*, 2009). As potenciais utilizações comerciais dos biossurfactantes incluem a biorremediação de ambientes contaminados com óleo, a recuperação aprimorada de petróleo, a limpeza de metais pesados na indústria de mineração, a síntese de nanopartículas na indústria de nanotecnologia, além de serem aplicados nas indústrias de alimentos, de cosméticos, de limpeza e de cosméticos (SANTOS *et al.*, 2016).

O uso de biossurfactantes tem sido limitado devido aos altos custos de produção, associado aos métodos ineficientes de separação do produto e ao uso de substratos dispendiosos. A substituição de surfactantes sintéticos por biossurfactantes só é viável com a redução significativa do custo da matéria-prima e do processo. (AMARAL *et al.*, 2009; FONTES, 2008). Diversas pesquisas ao redor do mundo têm estudado o uso de fontes renováveis baratas (como resíduos agroindustriais) para produzir diferentes biossurfactantes (BJERK *et al.*, 2021). Os óleos residuais de diversas indústrias também apresentam um grande potencial como substratos para produção de biossurfactante, graças aos custos reduzidos e ao potencial de melhor bioconversão ou rendimento (SOONG *et al.*, 2023).

As indústrias de petróleo produzem grandes quantidades de um resíduo oleoso denominado borra de petróleo ou borra oleosa em seus processos de exploração, transporte, armazenamento e refino do petróleo. Tem sido relatado que anualmente são produzidas mais de 60 milhões de toneladas de borras de petróleo, acumulando mais de 1 bilhão de toneladas deste resíduo em todo o mundo (COSTA, 2016).

Esses resíduos oleosos são convencionalmente tratados através de diferentes métodos físicos, químicos e biológicos. Contudo, a maioria das tecnologias de tratamento convencionais não conseguem remover pequenos conteúdos de óleo suspenso e elementos dissolvidos. Além disso, muitos tratamentos químicos envolvem elevados custos iniciais e/ou operacionais (SABIR, 2015). Como aproximadamente 60-90% da composição química do petróleo é biodegradável, a biorremediação tem se mostrado uma técnica de degradação promissora. A biorremediação consiste na degradação de hidrocarbonetos em compostos orgânicos menores

através da ação de agentes biológicos, como microrganismos, plantas ou resíduos vegetais (ADEDEJI *et al.*, 2022).

Graças à rápida taxa de crescimento e à aptidão de metabolizar e assimilar eficientemente substratos hidrofóbicos (por exemplo, glicerídeos, alcanos e ácidos graxos) como única fonte de carbono, a levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* é considerada como um dos organismos mais promissores na bioconversão de óleos e gorduras (SOONG *et al.*, 2023). Além disso, a habilidade de degradar substratos hidrofóbicos é muitas vezes acompanhada pela capacidade de produção de biossurfactante (LOBO, 2012).

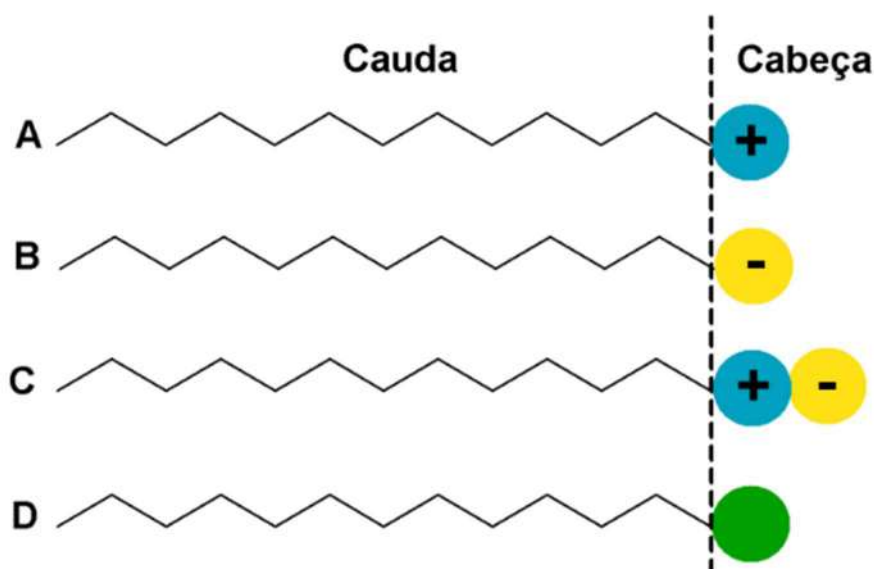
Ferreira *et al.* (2023) avaliaram a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 a partir da biodegradação de compostos presentes no petróleo. Lobo (2012) investigou a biodegradação parcial de asfaltenos (fração do petróleo com moléculas extremamente complexas) por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, que produziu biossurfactantes durante a degradação. Esses resultados demonstram o potencial de *Yarrowia lipolytica* na degradação de petróleo, podendo ser utilizada em processos de biorremediação e simultaneamente produzir biossurfactantes, mas ainda é necessário estudos mais aprofundados.

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi estudar a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, cepa isolada da Baía de Guanabara, a partir da biodegradação de óleo cru para casos de derramamento de petróleo. Substratos de origem renováveis, como melaço e milhocina, foram testados como fonte de carbono e nitrogênio a fim de diminuir ainda mais os custos da produção do bioemulsionante.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SURFACTANTES

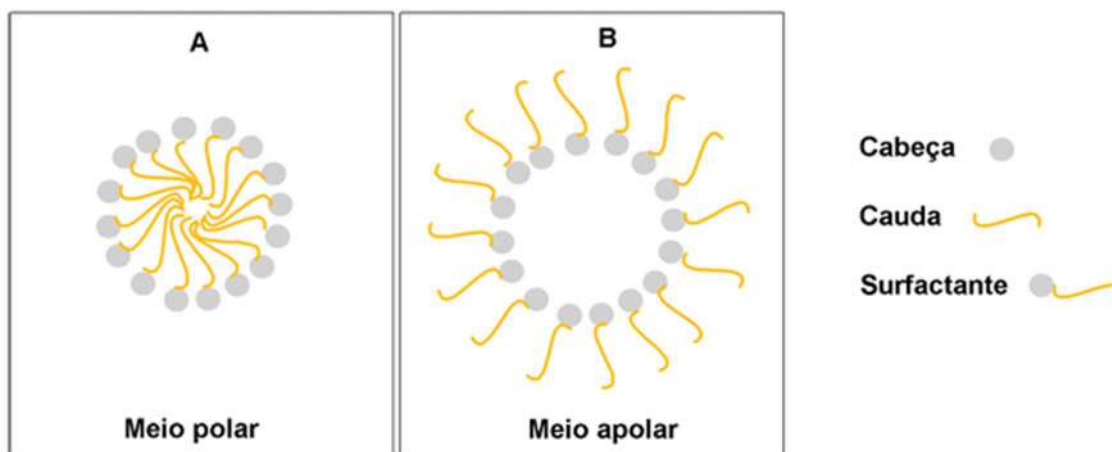
Os surfactantes são um grupo importante de compostos químicos amplamente utilizados em vários setores da indústria moderna. Eles são compostos anfipáticos que apresentam frações hidrofílicas (grupos polares) e hidrofóbicas (grupos apolares) em sua estrutura, podendo ser de origem sintética ou microbiana (BJERK *et al.*, 2021). A porção apolar, também chamada de cauda, possui uma ou duas cadeias carbônicas, ou fluorocarbônicas, ou siloxânicas. Ao passo que a porção polar, ou cabeça, é constituída por grupos iônicos (cátions ou ânions), não iônicos ou anfóteros, que se comportam como ácido ou base dependendo do pH do meio. Os surfactantes são classificados de acordo com o grupo presente na parte polar, podendo ser catiônicos, aniônicos, anfóteros ou não iônicos (Figura 2.1) (FELIPE e DIAS, 2017).



**Figura 2.1 - Representação esquemática dos surfactantes catiônicos (A), aniônicos (B), anfóteros (C) e não iônicos (D).**

Fonte: FELIPE e DIAS (2017).

Por possuírem grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes conseguem reduzir as tensões superficiais e interfaciais na interface óleo/água, aumentando assim a solubilidade das moléculas hidrofílicas. A concentração de surfactante na qual são formadas as micelas (conjunto de moléculas organizadas) é chamada de concentração micelar crítica (CMC). A CMC corresponde ao ponto em que o agente tensioativo atinge a menor tensão superficial estável (Figura 2.2) (SANTOS *et al.*, 2016).



**Figura 2.2 - Organização molecular de um surfactante em uma micela direta (A) e uma micela inversa (B).**

Fonte: FELIPE e DIAS (2017).

A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, confere as propriedades únicas dos surfactantes, uma vez que reduz a tensão interfacial e superficial. Essas características tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais, como: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A principal aplicação dos surfactantes se concentra nas indústrias de produtos de limpeza (sabões e detergentes), de petróleo e de cosméticos e produtos de higiene (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

A maioria dos surfactantes químicos produzidos são de origem petroquímica (SANTOS *et al.*, 2016). O consumo desses surfactantes derivados do petróleo já atingiu entre 70 e 75% do consumo total nos países industrializados, enquanto nos países em desenvolvimento predominava o consumo de compostos de origem natural (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Graças à natureza de sua composição, os surfactantes químicos apresentam riscos ambientais e toxicológicos (THAKUR *et al.*, 2024).

Tais riscos tem motivado a comunidade científica a procurar novas alternativas, com foco em surfactantes ecologicamente corretos e de origem biológica, buscando maior biodegradabilidade e sustentabilidade. Além dessas características, eles também devem ser ambientalmente seguros e facilmente produzidos. Surfactantes obtidos por meio da produção microbiana também são chamados de biossurfactantes (BJERK *et al.*, 2021).

## 2.2 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são compostos tensoativos de origem microbiana que apresentam estruturas semelhantes aos compostos de origem sintética (VALPUESTA, 2008). Portanto, apresentam em sua molécula uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica (FELIPE e DIAS, 2017).

Eles compõem uma das principais classes de surfactantes naturais, e são classificados de acordo com a sua origem microbiana e sua composição química (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Os microrganismos mais comumente empregados na produção de biossurfactantes são as bactérias, fungos filamentosos ou leveduras (BJERK *et al.*, 2021), e as principais classes obtidas são glicolipídios, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídios, ácidos graxos, poliméricos e particulados (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Embora os biossurfactantes apresentem uma diversidade de composição química e de propriedades, muitas características são comuns entre eles, e tais particularidades representam, em sua maioria, vantagens sobre os surfactantes convencionais (NITSCHKE e PASTORE, 2002):

- **Baixa toxicidade:** Os biossurfactantes são mais seguros para serem utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos devido a menor probabilidade de provocarem reações alérgicas (FELIPE e DIAS, 2017; NITSCHKE e PASTORE, 2002; SANTOS *et al.*, 2016);
- **Biodegradabilidade:** Os microrganismos conseguem utilizar os biossurfactantes como substrato, obtendo energia com maior facilidade, o que os torna mais convenientes para biorremediação e tratamento de resíduos (FELIPE e DIAS, 2017; LIEPINS *et al.*, 2021; NITSCHKE e PASTORE, 2002; SANTOS *et al.*, 2016);
- **Tolerância à temperatura, pH e força iônica:** Muitos biossurfactantes apresentam alta estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições extremas, onde os surfactantes químicos perdem sua eficiência. Alguns biossurfactantes também suportam uma concentração de sal de até 10%, enquanto 2% de NaCl são suficientes para inativar os surfactantes convencionais (LIEPINS *et al.*, 2021; NITSCHKE e PASTORE, 2002; SANTOS *et al.*, 2016);
- **Especificidade:** Os biossurfactantes possuem grupos funcionais específicos e, portanto, constantemente têm ação específica. Tal característica é interessante na desintoxicação de diferentes poluentes e na desemulsificação de emulsões industriais, bem como em

aplicações específicas na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (SANTOS *et al.*, 2016);

- **Utilização de substratos alternativos na produção:** Os biossurfactantes podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis de várias indústrias. A utilização destas matérias-primas encoraja ações de gerenciamento ambiental (FELIPE e DIAS, 2017; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Por outra perspectiva, a produção de biossurfactantes é um campo de estudo emergente. Para viabilizar a produção e comercialização desses compostos em escala comercial, é necessário superar alguns desafios relacionados ao processo produtivo (FELIPE e DIAS, 2017):

- **Preço:** Principal desvantagem dos biossurfactantes. Quando comparados aos surfactantes sintéticos a diferença de preço chega a ser 50 vezes maior para os biossurfactantes (FELIPE e DIAS, 2017);
- **Baixa produtividade:** Ainda não foram identificados microrganismos capazes de produzir biossurfactantes em concentrações economicamente viáveis (FELIPE e DIAS, 2017);
- **Produção de espuma durante o processo:** A agitação e o processo de aeração durante o cultivo dos microrganismos produzem espuma. A formação de espuma não é um fator desejado pois arrasta o meio de cultivo para fora do biorreator, causando perdas e favorecendo a contaminação, além de diminuir a eficiência do transporte de oxigênio (FELIPE e DIAS, 2017);
- **Purificação do biossurfactante:** São necessárias várias etapas para a obtenção do biossurfactante puro, o que diminui o percentual de produto recuperado e gera maiores quantidades de efluentes, tornando o processo economicamente inviável (FELIPE e DIAS, 2017).

Apesar dos desafios, em 2025, espera-se que o mercado global de biossurfactantes seja de cerca de 4,8 bilhões de euros, apresentando uma taxa composta de crescimento anual de 5,5% no período previsto de 2020-2025 (LIEPINS *et al.*, 2021).

### 2.2.1 Classificação química dos biossurfactantes

Diferentemente dos surfactantes sintéticos, que são classificados conforme seu grupamento polar, os biossurfactantes são classificados pela sua composição química (SANTOS *et al.*, 2021).

As principais classes de biossurfactantes são glicolipídios, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídios, ácidos graxos, poliméricos e particulados, como ilustrados na Tabela 2.1.

Entretanto, alguns autores agrupam os biossurfactantes de acordo com seu peso molecular, porque, de modo geral, os compostos de baixa massa molecular reduzem a tensão superficial de forma mais eficiente, enquanto as de alto peso molecular formam emulsões mais estáveis de sistemas óleo/água (PEREIRA, DUVOISIN JR e ALBUQUERQUE, 2017).

**Tabela 2.1 – Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.**

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
<b>Glicolipídeos</b>	
-Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
-Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídeos e lipoproteínas</b>	
-Peptídio-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
-Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
-Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
-Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
-Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
-Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
<b>Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos</b>	
-Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
-Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
-Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
-Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-Liposan/Yansan	<i>Yarrowia lipolytica</i>
-Carboidrato-lipídios-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
<b>Surfactantes particulados</b>	
-Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-Células	Várias bactérias

Fonte: NITSCHKE e PASTORE (2002).

Os glicolipídeos são o tipo mais comum de biossurfactantes (BJERK *et al.*, 2021). Eles são considerados de baixo peso molecular e apresentam em sua estrutura carboidratos (glicose,

galactose, manose ou ramnose) combinados com ácidos graxos de cadeia longa (FELIX, 2012; ROSENBERG e RON, 1999). Os ramnolipídeos, os soforolipídeos e os trealolipídeos são os mais conhecidos dentre os glicolipídeos, sendo os dois primeiros mais usados em formulações e mais discutidos cientificamente (SANTOS *et al.*, 2021).

Os lipopeptídeos e lipoproteínas são moléculas que possuem peptídeos ou proteínas ligados a ácidos graxos. A porção proteica desses compostos pode ser aniônica ou neutra e seus aminoácidos estão dispostos em forma cíclica (FELIPE e DIAS, 2017). A surfactina é o lipopeptídeo mais conhecido e estudado. Ele apresenta propriedades de emulsificação, detergência, capacidade espumante, propriedades antimicrobianas e solubilização. Tais características permitem a ampla utilização desse composto em diversos segmentos industriais (SANTOS *et al.*, 2021).

Os ácidos graxos e fosfolipídeos são sintetizados por bactérias e leveduras que utilizam alcanos como fonte de carbono e energia (FELIPE e DIAS, 2017). Já os lipídeos neutros englobam os triacilgliceróis, ácidos micólicos e ácidos graxos, no qual sua maior parte apresenta algum grau de atividade tensoativa (FELIX, 2012).

Os biossurfactantes poliméricos ou lipopolissacarídeos são caracterizados por ácidos graxos e polissacarídeos ligados covalentemente (FELIX, 2012). Emulsan, lipomanan, alasan, liposan e outros complexos de proteínas polissacarídicas são os mais bem estudados (SANTOS *et al.*, 2016).

Os surfactantes particulados são vesículas extracelulares produzidas por algumas bactérias. Essas vesículas apresentam elevada atividade tensoativa, transportando alcanos para o interior das células (FELIPE e DIAS, 2017).

### **2.2.2 Microrganismos produtores de biossurfactantes**

Os biossurfactantes são produzidos por uma variedade de microrganismos, tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (LIEPINS *et al.*, 2021), sendo os de origem bacteriana os mais relatados na literatura. Entretanto, a grande maioria dos tensoativos produzidos por bactérias não é adequada para utilização na indústria alimentícia, devido a sua possível natureza patogênica (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008).

Enquanto a produção de biossurfactantes bacterianos é bem explorada, poucos fungos filamentosos são conhecidos por produzir biossurfactantes (ALVES, 2015). As leveduras também têm sido estudadas para a produção de emulsificadores (FONTES, 2008).

Uma vantagem fundamental do uso de algumas leveduras reside no seu status *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*). Organismos com status *GRAS* não apresentam riscos de

toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008). Além disso, as leveduras oleaginosas podem produzir biossurfactantes a partir de substratos ricos em lipídios, como óleos vegetais, gorduras e seus produtos (LIEPINS *et al.*, 2021).

A utilização de diferentes fontes de carbono modifica a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes. Tais mudanças podem ser vantajosas quando se almeja propriedades específicas para uma aplicação direcionada (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008).

Entre as leveduras, inúmeros estudos têm sido feitos utilizando espécies de *Candida* e *Yarrowia*, sendo *Candida bombicola* e *Yarrowia lipolytica* as mais estudadas para produzir biossurfactantes (MARINHO, SILVA e LUNA, 2022).

### 2.3 YARROWIA LIPOLYTICA

A levedura *Yarrowia lipolytica* é um microrganismo estritamente aeróbio, eucarioto, pertencente ao reino *Fungi*, à classe Ascomycetos e subclasse Hemiascomycetos (Saccharomycetes) (FERREIRA, 2009). É uma das espécies “não convencionais” mais estudadas, devido a sua intensa atividade secretora e a capacidade de produzir metabólitos importantes, como por exemplo, ácidos orgânicos, enzimas, compostos aromáticos (COELHO, AMARAL e BELO, 2010).

Originalmente foi classificada como *Candida*, uma vez que nenhum estado sexual havia sido identificado (BARTH e GAILLARDIN, 1997). Ao observar a formação de ascos e ascósporos (células sexuais típicas aos fungos ascomycetos, responsáveis pela produção de esporos para propagação sexuada), Wickerham; Kurtzman e Herman (1970) reclassificaram a espécie como *Endomycopsis lipolytica*. Posteriormente, *Endomycopsis* foi mostrado como um sinônimo obrigatório de *Saccharomycopsis*. Dessa forma, Yarrow (1972) a alocou como *Saccharomycopsis lipolytica*. Entretanto, devido a algumas características distintas que a espécie apresentava dentre os membros do gênero *Saccharomycopsis*, como estrutura de seus ascósporos e a presença da coenzima Q9, van der Walt e von Arx (1980) propuseram que ela fosse atribuída ao novo gênero *Yarrowia* (OLIVEIRA, 2014; van der WALT e von ARX, 1980).

O nome da espécie “*lipolytica*” está associado à capacidade do microrganismo de crescer e decompor materiais hidrofóbicos (principalmente óleos e gorduras), uma vez que seus habitats naturais são ambientes ricos em lipídeos e proteínas como queijos, embutidos e iogurtes, além de ambientes poluídos por hidrocarbonetos, ambientes marinhos e até mesmo em ambientes hipersalinos (LOBO, 2012; OLIVEIRA, 2014).

*Y. lipolytica* é amplamente utilizada como modelo em estudos relacionados ao metabolismo lipídico, biogênese dos peroxissomos, vias de secreção em geral e diferenciação celular. Além disso, é empregada na produção industrial de uma série de enzimas e ácidos orgânicos, como o ácido cítrico (KRONBERG *et al.*, 2011). Esta espécie de levedura também tem sido considerada um modelo nos estudos de dimorfismo, devido à facilidade de distinguir entre suas formas morfológicas e por possuir um sistema eficiente para transformação de engenharia genética (COELHO, AMARAL e BELO, 2010).

### 2.3.1 Aplicação de *Yarrowia lipolytica* em biorremediação

Biorremediação é um processo de conversão parcial ou total de contaminantes em compostos menos tóxicos por meio da ação de agentes biológicos (microrganismos, plantas ou resíduos vegetais), restaurando assim o estado original do solo ou da água contaminados (ADEDEJI *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2016). Essa técnica utiliza a capacidade intrínseca do microrganismo nativo de agir sobre os contaminantes, ao passo em que cria condições que aumentam a taxa de biodegradação (ADEDEJI *et al.*, 2022).

A biorremediação é frequentemente utilizada como uma substituta para a limpeza química ou física de derramamentos de óleo, uma vez que requer menos equipamento ou mão de obra. No derramamento de 41 milhões de litros de óleo causado pelo petroleiro Exxon Valdez em 1989, a biorremediação desempenhou um papel crucial na limpeza das águas contaminadas do Golfo do Alasca, demonstrando que essa técnica é promissora para futuros derramamentos de óleo sob as circunstâncias apropriadas (ADEDEJI *et al.*, 2022).

*Y. lipolytica* também tem sido empregada para aplicações de biorremediação devido às suas características de parede celular e produção de surfactante (COELHO, AMARAL e BELO, 2010). Esta levedura tem capacidade de degradar eficientemente uma gama complexa de hidrocarbonetos e compostos aromáticos, para as quais tem percursos metabólicos específicos (LOBO, 2012; OLIVEIRA, 2014).

Zinjarde e Pant (2002) verificaram que 17 microrganismos isolados de ambiente marinho tropical, dentre eles bactérias e leveduras, eram capazes de degradar óleo cru. Dentre as espécies de leveduras isoladas, *Y. lipolytica* foi a que apresentou maior capacidade degradadora utilizando 78% da fração alifática do óleo cru.

Ferreira (2009) avaliou a capacidade da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50862 na degradação de óleo cru. A levedura foi capaz de degradar tanto frações leves quanto pesadas do petróleo, demonstrando potencial para aplicabilidade em processos de biorremediação de óleo cru.

Ferreira *et al.* (2023) investigaram a degradação de compostos de petróleo bruto e as possíveis biomoléculas produzidas durante esses processos por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862. A cepa foi capaz de degradar hidrocarbonetos de alto peso molecular, como n-alcanos, isoprenoides, aromáticos com dois ou três anéis aromáticos, além de hidrocarbonetos mais complexos, como terpanos tricíclicos. A produção de biossurfactante também foi observada.

Grande parte dos estudos em biorremediação está no nível de laboratório, o que pode gerar resultados diferentes dos esperados na biorremediação *in situ*. Entretanto, experimentos com *Y. lipolytica* A-101 mostraram que a levedura foi capaz de contribuir com a degradação de petróleo, *in situ*, através de uma possível ação conjunta com o microssistema local presente no solo (BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009).

### 2.3.2 *Yarrowia lipolytica* na produção de biossurfactante

A capacidade em degradar diversos compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, é constantemente acompanhada pela produção de biossurfactantes. (COELHO, AMARAL e BELO, 2010). Diversos trabalhos da literatura demonstram que *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir moléculas com atividade tensoativas.

Amaral *et al.* (2006) produziram um biossurfactante denominado Yansan, a partir de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando glicose como fonte de carbono. Fontes *et al.* (2012) sintetizaram um biossurfactante por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando diferentes recursos renováveis (glicerol bruto e suco de caju clarificado) como fonte de carbono, atingindo índices máximos de emulsificação de 68,0% no meio contendo o suco de caju clarificado e 70,2% no meio contendo o glicerol bruto.

Rufino *et al.* (2014) utilizaram resíduo do refino de óleo de soja como substrato para produzir biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988. Santos *et al.* (2017) utilizaram gordura animal e milhocina como substrato na produção de biossurfactante também por *Candida lipolytica* UCP0988. Barros *et al.* (2024) utilizaram querosene como fonte de carbono na síntese de um emulsificante por *Yarrowia lipolytica* LMS 24B.

Embora a produção de biossurfactantes ocorra na presença de fontes de carbono solúveis em água, como os açúcares, uma variedade de estudos demonstram que ao adicionar substratos hidrofóbicos há um aumento na produção (HOMMEL *et al.*, 1994).

Ferreira (2009) mostrou que fontes de carbono solúveis (glicose e o glicerol) não favoreceram a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*. Em contrapartida, a presença de substrato hidrofóbico (óleo cru) estimulou a produção de biossurfactante.

Cooper e Paddock (1984) obtiveram um rendimento muito baixo (17 g/L) utilizando apenas glicose ou óleo vegetal na produção de biossurfactante por *Torulopsis bombicola*, mas ao utilizarem ambas as fontes de carbono o rendimento aumentou para 70g/L.

## 2.4 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

A natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como a presença de ferro, manganês, fósforo e magnésio no meio de produção, influenciam a composição e as características dos biossurfactantes produzidos por microrganismos. Além disso, outros parâmetros como tempo do processo fermentativo, temperatura, velocidade de agitação, forma de condução do processo, pH do meio e adição de nutrientes são de extrema importância na qualidade e rendimento do biossurfactante produzido (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008; MARINHO, SILVA e LUNA, 2022).

### 2.4.1 Fontes de carbono

A fonte de carbono desempenha um papel fundamental no crescimento e produção de biossurfactantes por microrganismos e difere de espécie para espécie (SANTOS *et al.*, 2016). As fontes desse elemento podem ser de origem hidrofílicas (glicose, lactose, entre outros) ou hidrofóbicas (hexadecano, óleos vegetais, parafina, entre outros). Os substratos hidrofílicos são inicialmente utilizados pelo microrganismo para o metabolismo celular e para a produção da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008; SANTOS *et al.*, 2021).

Sarubbo *et al.* (2001) utilizaram glicose como fonte de carbono na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* IA 1055. Amaral *et al.* (2006) também utilizaram glicose como fonte de carbono para síntese de um biossurfactante denominado Yansan, a partir de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Tais resultados vão em desacordo com os estudos de Zinjarde e Pant (2002) que mostraram que a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* utilizando substratos solúveis como fonte de carbono não é viável.

Cirigliano e Carman (1984) demonstraram que *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono, tais como hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão, sendo que com hexadecano obteve-se a maior produção.

Apesar da produção de biossurfactantes ocorrer tanto na presença de fontes de carbono de origem hidrofílica quanto na presença de fontes de origem hidrofóbica, alguns trabalhos enfatizam a importância da combinação entre um substrato insolúvel em água e um carboidrato no meio de cultura (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008; SANTOS *et al.*, 2021).

Cooper e Paddock (1984) aumentaram o rendimento na produção de biossurfactante por *Torulopsis bombicola*, ao combinar glicose e óleo vegetal como fontes de carbono. Os experimentos contendo apenas uma das fontes obtiveram rendimentos muito baixos.

#### 2.4.1.1 Petróleo

Petróleo também tem sido utilizado como fonte de carbono para testar o potencial de alguns microrganismos na produção de biossurfactantes simultânea à biodegradação de hidrocarbonetos (BORAH e YADAV, 2017; FERREIRA *et al.*, 2023; MNIF *et al.* (2011)).

O petróleo é uma mistura complexa de ocorrência natural, normalmente apresenta-se como um líquido escuro, oleoso, inflamável à temperatura ambiente e suas propriedades físicas apresentam grandes variações. Sua composição química inclui uma combinação complexa de hidrocarbonetos aromáticos, hidrocarbonetos alifáticos, compostos heterocíclicos, asfaltenos e compostos não hidrocarbonetos (ADEDEJI *et al.*, 2022).

Os petróleos podem ainda ser classificados pelo seu °API, que é uma medida indireta da qualidade do petróleo. Quanto maior o °API, menor sua densidade. O óleo pode ser classificado como extraleve (°API > 40), leve (40 > °API > 33), médio (33 > °API > 27), pesado (19 > °API > 27), extrapesado (19 > °API > 15), asfáltico (°API < 15) (LOBO, 2012).

Mnif *et al.* (2011) relataram produção de biossurfactante por *Lisinibacillus fusiformis* utilizando petróleo. Ferreira *et al.* (2023) mostraram que *Yarrowia lipolytica* produz biossurfactante durante o processo de biodegradação de óleo cru. Tais trabalhos demonstraram que os respectivos microrganismos são promissores para remediação em locais contaminados por hidrocarbonetos.

#### 2.4.2 Fontes de nitrogênio

O nitrogênio é o segundo suplemento mais importante na produção de biossurfactantes por microrganismos. Nos processos fermentativos, a relação C/N afeta o acúmulo de metabólitos. Em baixos níveis de nitrogênio (altas relações C/N) o crescimento microbiano é limitado, favorecendo o metabolismo celular em direção à produção de metabólitos. Em

contrapartida, altos níveis de nitrogênio (baixas relações C/N) levam à síntese de material celular e limita o acúmulo de produtos (SANTOS *et al.*, 2016).

Diversos compostos nitrogenados têm sido empregados na produção de biossurfactantes, tais como ureia, peptona, sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de amônio, extrato de levedura, entre outros. O extrato de levedura é a fonte de nitrogênio mais utilizada, mas sua concentração varia de acordo com o meio de produção e o microrganismo (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008).

Zinjarde e Pant (2002) estudaram o efeito da fonte de nitrogênio, tais como sulfato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio, ureia e nitrato de sódio, na produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*. Os autores observaram que o sulfato de amônio e cloreto de amônio foram as fontes que propiciaram maior atividade emulsificante, enquanto o nitrato de amônio e ureia reduziram a atividade de emulsificação à metade. Não foi detectada atividade emulsificante na utilização de nitrato de sódio.

Cooper e Paddock (1984) avaliaram a produção de biossurfactante por *T. bombicola* frente a diferentes fontes de nitrogênio, tais como nitrato de sódio, cloreto de amônio, nitrato de amônio, ureia e extrato de levedura. Os autores observaram que o nitrato não é uma boa fonte de nitrogênio, assim como Zinjarde e Pant (2002), uma vez que apresentou redução na produção da biomassa. Na presença do extrato de levedura, na concentração de 5 g/L, a produção do biossurfactante foi favorecida. Ao substituir o extrato de levedura por peptona ou ureia, a produção diminuiu.

#### **2.4.3 Fontes de origens renováveis**

Pode-se destacar ainda a utilização de fontes de origens renováveis, facilmente disponíveis e de baixo custo, na produção de diferentes biossurfactantes. O uso dessas fontes alternativas como matéria-prima reduz os custos de produção e, consequentemente elimina problemas relacionados ao armazenamento, tratamento e disposição final desses resíduos (BJERK *et al.*, 2021).

Na literatura, tem-se encontrado cada vez mais trabalhos fazendo uso de substratos mais baratos e renováveis de várias indústrias, como agrícola (melaço, milhocina, resíduos de óleo, soro de leite), resíduos de destilaria, indústrias de óleo, alimentícia, gordura animal, entre outras (BANAT *et al.*, 2014). Considerando que o Brasil é um país essencialmente agrícola, a disponibilidade de quantidade e facilidade de acesso aos subprodutos agroindustriais é bastante significativa (MARINHO, SILVA e LUNA, 2022). Outra fonte de baixo custo facilmente

disponível são os resíduos gerados na indústria de processamento de petróleo (SANTOS *et al.*, 2021).

O principal problema da utilização dos substratos renováveis encontra-se em determinar o equilíbrio correto de carboidratos e lipídeos para proporcionar o crescimento do microrganismo no meio fermentativo e a consequente produção de biossurfactante. Os resíduos agroindustriais possuem grande quantidade de carboidratos e lipídeos, atendendo assim os requisitos como substratos para a produção de biossurfactante. Dentre os resíduos agroindustriais, o melaço e a milhocina são um dos mais comumente empregados na produção de biossurfactantes. (BANAT *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016).

#### 2.4.3.1 Melaço

O melaço é subproduto do processamento da cana-de-açúcar e da beterraba. Esta matéria-prima possui 75% de matéria seca, entre 9% e 12% de matéria orgânica não açucarada, 2,5% de proteína, entre 1,5% e 5% de potássio e aproximadamente 1% de magnésio, fósforo e cálcio. Outros componentes como inositol, biotina, tiamina e ácido pantotênico conferem ao melaço sua aparência espessa e marrom escura. O alto teor de açúcar, variando aproximadamente entre 48% e 56%, torna o melaço adequado para a produção de biossurfactante. Entretanto, quando o melaço é utilizado como substrato, é ideal que ele seja clarificado, do contrário, alguns dos seus componentes podem conferir cor desfavorável ao biossurfactante, reduzindo seu valor. (BANAT *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016).

Joshi *et al.* (2008) utilizaram melaço e soro de leite como fontes de nutrientes na produção de biossurfactante a partir de cepas de *Bacillus*. Santos *et al.* (2010) utilizaram melaço como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio na produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*. Takahashi *et al.* (2011) produziram soforolipídeos por *Starmerella bombicola* utilizando apenas melaço como fonte de nutrientes.

#### 2.4.3.2 Milhocina

A milhocina, também conhecida como licor de maceração de milho, é um subproduto da água de lavagem e imersão dos grãos de milho, bem como do fracionamento em amido e germen (óleo) contendo 40% de matéria sólida. Este substrato contém entre 21% e 45% de proteínas, entre 20% a 26% de ácido láctico, aproximadamente 8% de cinzas, por volta de 3% de carboidratos e um baixo teor de gordura, entre 0,9% e 1,2%. Os subprodutos sólidos e líquidos gerados pela agroindústria de produtos à base de milho por meio do processamento

úmido tornam-se uma fonte de contaminação e danos ao meio ambiente quando não descartados adequadamente (SANTOS *et al.*, 2016).

Patel e Desai (1997) produziram biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando melão e milhocina como fontes primárias de carbono e nitrogênio, respectivamente. Gudiña *et al.* (2015) avaliaram a produção de biossurfactante por uma cepa de *B. subtilis* utilizando milhocina em um meio suplementado com metais (ferro, magnésio e manganês). Santos *et al.* (2018) utilizaram milhocina e um subproduto da produção do leite de junça (*tiger nuts* em inglês) para produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* e obtiveram IE de 60%.

#### 2.4.4 Temperatura, pH, agitação e aeração

O controle e a otimização das condições operacionais como temperatura, pH, velocidade de agitação e disponibilidade de oxigênio são essenciais para o sucesso do escalonamento da produção de biossurfactantes (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008).

Os microrganismos são capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura, sendo essa variação maior para alguns do que para outros. A temperatura ideal de crescimento é aquela na qual um determinado microrganismo cresce mais rapidamente. Por outro lado, os microrganismos conseguem crescer em uma faixa de pH entre 2 e 11, e algumas espécies modificam o pH do meio durante seu crescimento (SERAFIM, 2017).

A influência do pH e da temperatura na produção de biossurfactantes tem sido estudada. Espécies do gênero *Candida* apresentam rendimentos máximos de biossurfactantes em uma vasta faixa de pH, como pH 5,0 para *C. lipolytica*, pH 5,7 para *C. glabrata* UCP 1002, pH 6,0 para *C. batistae* e pH 7,8 para *Candida sp* SY16 (SANTOS *et al.*, 2016).

Fontes (2008) estudou a influência do pH inicial na produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*. A autora constatou que não é necessário o ajuste do pH inicial, uma vez que os resultados produzidos foram semelhantes nos meios com pH inicial entre 5,0 e 9,0.

Estudos demonstram que a temperatura ideal de crescimento para a produção de biossurfactantes por diferentes espécies de *Candida*, como *Candida sp.* SY16, *C. bombicola* e *C. batistae*, é de 30 °C. No caso de *C. lipolytica*, 27 °C foi considerado a temperatura ideal (SANTOS *et al.*, 2016).

Agitação e aeração são fatores que facilitam a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa, portanto apresentam grande influência na produção de biossurfactantes. Fontes (2008) estudou o efeito da mudança na velocidade de agitação, de 160 para 250 rpm, e na aeração (volume de meio ( $V_m$ )/volume de frasco ( $V_f$ )), de 0,3 para 0,5 ( $V_m/V_f$ ), na síntese

de biossurfactante por *Y. lipolytica*. Os resultados demonstraram que o aumento da velocidade de agitação promoveu melhor transferência de oxigênio, aumentando assim a taxa específica de crescimento celular da levedura, devido ao seu metabolismo estritamente aeróbio. Consequentemente houve um aumento na produção de biossurfactante. Em relação à aeração, a autora avaliou que o aumento na razão  $V_m/V_f$  promoveu aumento na produção de biossurfactante. Tal resultado foi relacionado à formação intensa de espuma quando a razão  $V_m/V_f$  é menor (0,3) e a agitação é de 250 rpm. A formação de espuma não é desejada, uma vez que retira as células e o biossurfactante da fase aquosa, diminuindo a eficiência do transporte de oxigênio no meio líquido, limitando assim o rendimento dos metabólitos.

Em contrapartida, Cunha *et al.* (2004) encontraram que a agitação teve um efeito negativo no estudo da produção de biossurfactante por *Serratia sp.* SVGG16. Os melhores resultados de redução da tensão superficial foram obtidos com os valores mais baixos da agitação.

## **2.5 APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES**

Os biossurfactantes podem ser aplicados em diversos setores, tais como nas indústrias de petróleo, de alimentos, de bebidas, cosméticos, detergentes, têxteis, tintas, mineração, celulose, farmacêutica e nanotecnologia. O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde eles podem ser usados para recuperação de resíduos de óleo de tanques de armazenamento, limpeza de derramamentos de óleo e biorremediação de solo e água (SANTOS *et al.*, 2016). A Tabela 2.2 apresenta um resumo das aplicações dos biossurfactantes em diferentes indústrias.

**Tabela 2.2 – Aplicações de biossurfactantes para usos industriais.**

Indústria	Aplicações	Papel dos biossurfactantes
Ambiental	Biorremediação; Operações de limpeza de derramamento de óleo; Remediação e lavagem de solos	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, dispersão de óleos, solubilização de óleos, umectação, espalhamento, detergentência, formação de espuma, inibição de corrosão em óleos combustíveis e equipamentos, lavagem de solo.
Petróleo	Recuperação aprimorada de óleo; Desemulsificação	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, desemulsificação de emulsões de óleo, solubilização de óleos, redução da viscosidade, dispersão de óleos, umectação de superfícies sólidas, espalhamento, detergentência, formação de espuma, inibição de corrosão em óleos combustíveis e equipamentos.
Mineração	Operações de limpeza de metais pesados; Remediação de solos; Flotação	Umectação e formação de espuma, coletores e espumantes, remoção de íons metálicos de soluções aquosas, solo e sedimentos, sequestrantes de metais pesados, espalhamento, inibição de corrosão em óleos.
Alimentícia	Emulsificação e desemulsificação; Ingrediente funcional	Solubilização de óleos aromatizados, controle de consistência, emulsificação, agente umectante, espalhante, detergente, espumante, espessante.
Medicamento	Microbiológicos; Produtos farmacêuticos e terapêuticos	Agentes antiadesivos, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, agentes antivirais, vacinas, terapia genética, moléculas imunomoduladoras.
Agricultura	Biocontrole; Fertilizantes	Umectação, dispersão, suspensão de pesticidas e fertilizantes em pó, emulsificação de soluções de pesticidas, facilitação de mecanismos de biocontrole de micróbios, eliminação de patógenos de plantas e aumento da biodisponibilidade de nutrientes para micróbios benéficos associados às plantas.
Cosméticos	Produtos de saúde e beleza	Emulsificação, agentes espumantes, solubilização, agentes umectantes, agentes de limpeza, agentes antimicrobianos, mediadores de ação enzimática
Limpeza	Detergentes para lavagem	Detergentes e sanitizantes para lavagem, umedecimento, espalhamento e inibição de corrosão.
Têxteis	Preparação de fibras; Tingimento e estampagem; Acabamento de têxteis	Umectação, penetração, solubilização, emulsificação, detergentência e dispersão, umectação e emulsificação em formulações de acabamento, amaciamento.
Nanotecnologia	Síntese de nanopartículas	Emulsificação, estabilização.

Fonte: SANTOS *et al.* (2016).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Materiais

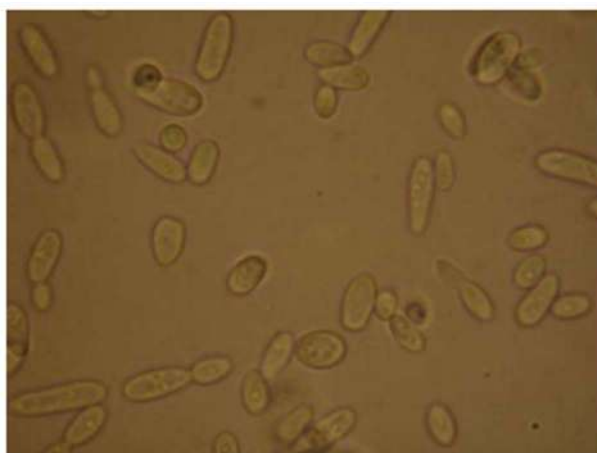
O reagente utilizado no índice de emulsificação foi o hexadecano (*Sigma-Aldrich CO* (MO, USA)).

O óleo cru utilizado foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Desenvolvimento e Otimização de Processos Orgânicos (DOPOLAB), tendo como principais características: 19,39 °API; asfaltenos = 3,2 %; relação resinas/asfaltenos = 7,5; relação saturados /aromáticos = 2,1; densidade 25°C (g/cm<sup>3</sup>) = 0,9337.

Os componentes utilizados no meio de cultura foram: glicose (*Vetec*, Duque de Caxias, Brasil), milhocina e melaço. A milhocina foi obtida da Ingredion como subproduto residual. O melaço foi gentilmente doado pelo Departamento de Engenharia Bioquímica (DEB), sendo que a sacarose/glicose/frutose foi responsável por 58%.

##### 3.1.2 Microrganismo

A levedura empregada no presente estudo é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 IMUFRJ 50682 (Figura 3.1) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FERREIRA, 2009).



**Figura 3.1 - Morfologia microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 1000x).**

Fonte: FONTES (2008).

### 3.1.3 Meios de cultivo

Para o preparo do meio mineral foram utilizados os componentes (em g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,15;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,06.

Para preparo do meio YPD (“Yeast Extract, Peptone, Dextrose”) foram utilizados: extrato de levedo 1% p/v, peptona 2% p/v e glicose 2% p/v.

## 3.2 METODOLOGIAS

### 3.2.1 Obtenção do inóculo

As células foram conservadas a 4 °C em meio sólido YPD (1% p/v de extrato de levedura, 2% p/v de peptona, 2% p/v de glicose, 3% p/v de ágar). Com uma alça de platina, em ambiente estéril, as células foram inoculadas em 200 mL de meio líquido YPD em Erlenmeyer de 500 mL, por 72 horas, a 160 rpm e 28° C. Após o crescimento, foi realizada a leitura da absorvância (570 nm) de uma alíquota do cultivo. Posteriormente, as células eram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em meio de cultivo estéril servindo de inóculo dos experimentos subsequentes. O volume centrifugado era determinado baseando-se na concentração inicial de células desejada para o experimento.

### 3.2.2 Condução dos experimentos

Os experimentos foram realizados em duplicata em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio mineral, 1% v/v de óleo cru e concentração celular inicial variada, entre 1 g/L e 5 g/L. Combinações diversas entre as fontes de carbono e nitrogênio foram testadas para melhorar a produção de biossurfactante. As fontes de carbono utilizadas foram glicose (1% p/v) e melaço (1,7% p/v) e as fontes de nitrogênio foram sulfato de amônio (1% p/v) e milhocina (1% p/v, ou 2% p/v ou 2% p/v filtrada em papel de filtro qualitativo). A concentração de melaço foi calculada de modo a se obter a concentração inicial de glicose de 1% p/v.

Os experimentos foram conduzidos durante 264 horas, a 28°C e em incubador rotatório (shaker) em duas agitações diferentes (160 e 250 rpm) para verificar o efeito da velocidade de agitação no crescimento celular e na produção de biossurfactante. A adição de extrato de levedura (0,1% p/v) como vitamina para o microrganismo também foi avaliada.

Experimentos controle, sem o petróleo, foram realizados para verificar se a presença do substrato hidrofóbico influencia a produção do biossurfactante. Estes ensaios foram conduzidos nas mesmas condições que os outros experimentos.

### 3.2.3 Amostragem

Em todos os experimentos foram retiradas alíquotas após 0, 48, 96, 168, 216 e 264 horas. O procedimento consistiu em retirar três amostras do meio fermentado: uma para leitura em espectrofotômetro e obtenção da concentração celular, outra para determinação de pH, e a outra para análise do índice de emulsificação, sendo todas retiradas com o auxílio de pipetas estéreis e de forma asséptica em Capela de fluxo laminar equipada com luz UV – *BioFlux II 90*.

### 3.2.4 Quantificação do crescimento celular

A amostra retirada para quantificação do crescimento celular foi centrifugada (Centrífuga *Eppendorf* modelo *Centrifuge 5804R*) a 3000 rpm durante 10 minutos, sendo o precipitado diluído em água destilada.

A concentração celular foi acompanhada através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *SpectraMax M2e* a 570 nm e correlacionada com o peso seco das células utilizando uma curva padrão que foi previamente obtida.

### 3.2.5 Determinação do pH

O pH do meio foi determinado utilizando-se um pHmetro *TECNAL* modelo *TEC-5* na temperatura ambiente (27°C).

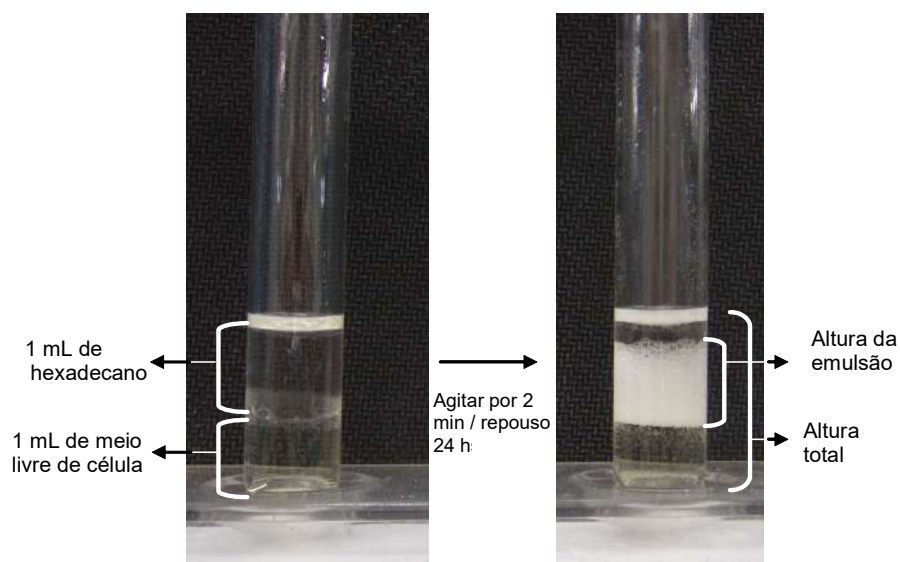
### 3.2.6 Determinação da produção de biossurfactante

A amostra retirada para determinação do índice de emulsificação era centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado para análise posterior.

O método utilizado para acompanhar a produção do biossurfactante foi o índice de emulsificação (IE). A Figura 3.2 mostra o procedimento do método.

Este procedimento consistiu em colocar 1 mL do meio de cultura fermentado (livre de células) em tubo de ensaio, adicionando o mesmo volume de hexadecano, seguidos por agitação em alta velocidade em vórtex durante 2 minutos. Após 24 horas, calculou-se o índice de emulsificação segundo a Equação 3.1, sendo  $H_{\text{emulsão}}$  a altura da região emulsificada e  $H_{\text{total}}$  a altura total.

$$IE (\%) = \frac{H_{emuls\tilde{a}o}}{H_{total}} * 100 \quad (3.1)$$



**Figura 3.2 – Método da determinação do índice de emulsificação.**

Fonte: FONTES (2008).

### 3.2.7 Análise estatística

Os dados obtidos para concentração celular e índice de emulsificação (IE%) foram analisados por meio de métodos estatísticos para identificar possíveis diferenças entre os grupos experimentais. Inicialmente, uma Análise de Variância (ANOVA) unidirecional foi realizada para testar a hipótese nula de que todas as médias dos grupos eram iguais. A ANOVA divide a variabilidade total em dois componentes: variabilidade entre grupos (devido a diferenças entre as médias dos grupos) e variabilidade dentro do grupo (variação aleatória dentro dos grupos). A estatística F e seu valor de p associado foram usados para avaliar a significância estatística. Aplicou-se um nível de significância padrão de 0,05. Quando os resultados da ANOVA sugeriram diferenças potenciais ( $p \leq 0,05$ ), foram realizadas comparações post-hoc pareadas usando o teste de Diferença Significativa Honesta (HSD) de Tukey. O teste de Tukey se ajusta para comparações múltiplas e fornece a diferença média, intervalos de confiança e valores de p ajustados para todas as comparações possíveis de grupos pareados. Para todas as análises, foi utilizado o software STATISTICA 7.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

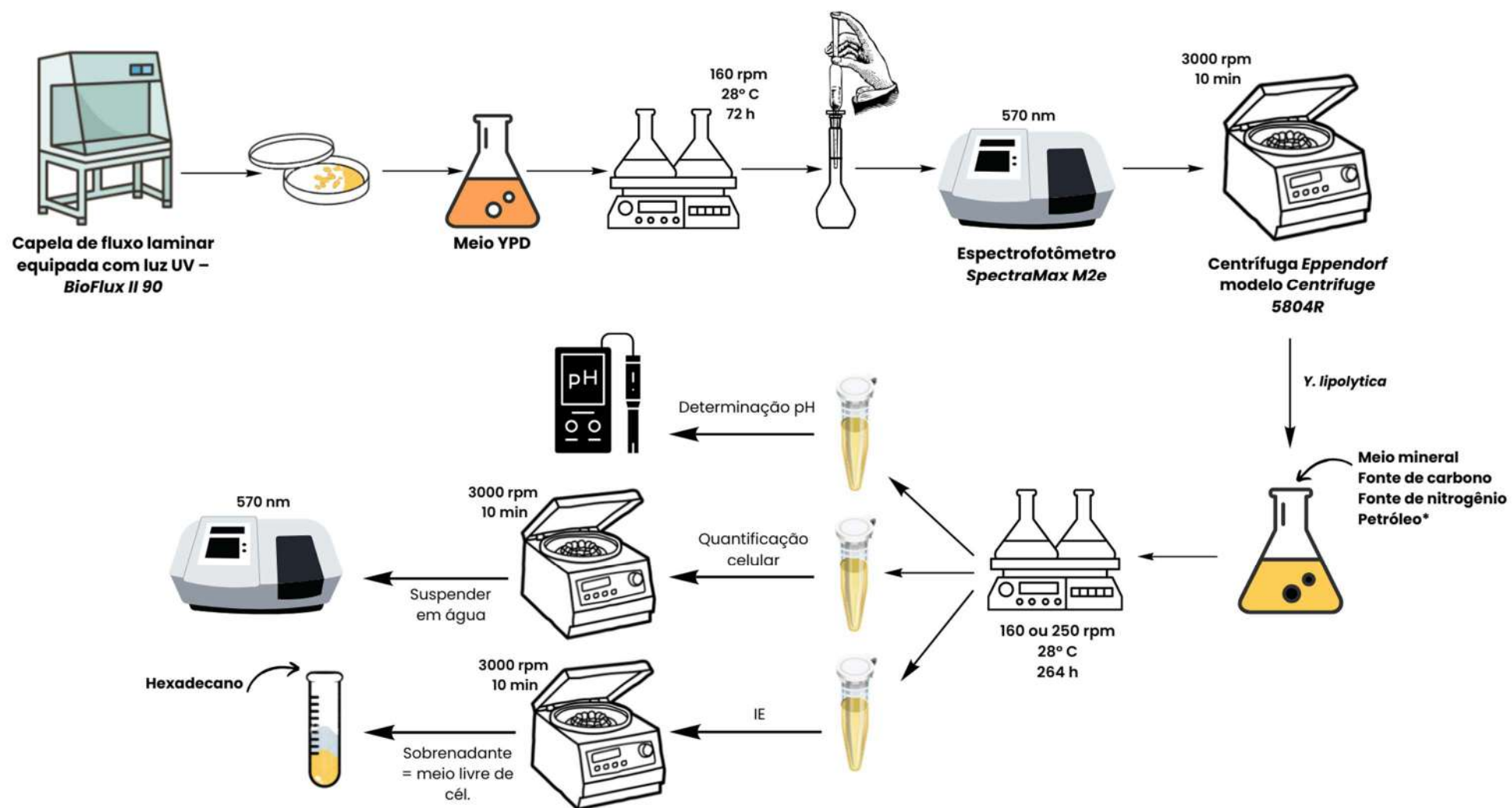


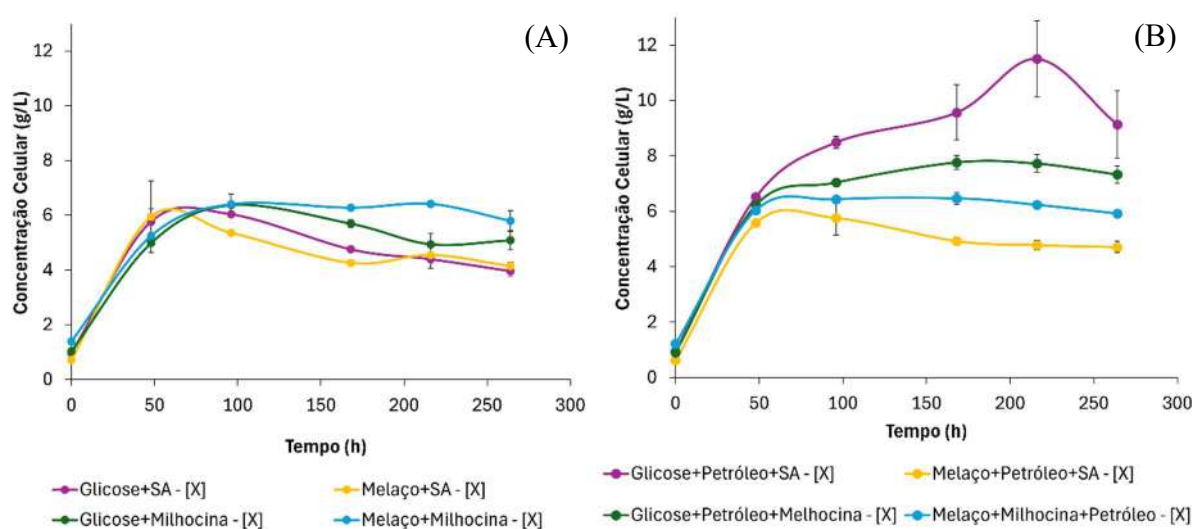
Figura 3.3 – Fluxograma das etapas experimentais

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

A fim de verificar a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* em meio mineral foi realizado um estudo variando as fontes de carbono e de nitrogênio, na presença e ausência de petróleo. As fontes de carbono utilizadas foram glicose (1% p/v) e melaço (1,7% p/v) e as fontes de nitrogênio foram sulfato de amônio (1% p/v) e milhocina (1% p/v).

Na Figura 4.1 (A) pode-se observar o perfil de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* nos diferentes meios de cultivo sem petróleo (controle), e a Figura 4.1 (B) mostra o perfil desta mesma cepa crescendo nos mesmos meios com a adição de 1% v/v de petróleo. Os resultados apresentados foram obtidos a partir da média dos valores das duplicatas.



**Figura 4.1 – Perfil de crescimento celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicose ou melaço como fonte de carbono e milhocina ou sulfato de amônia (SA) como fonte de nitrogênio, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.**

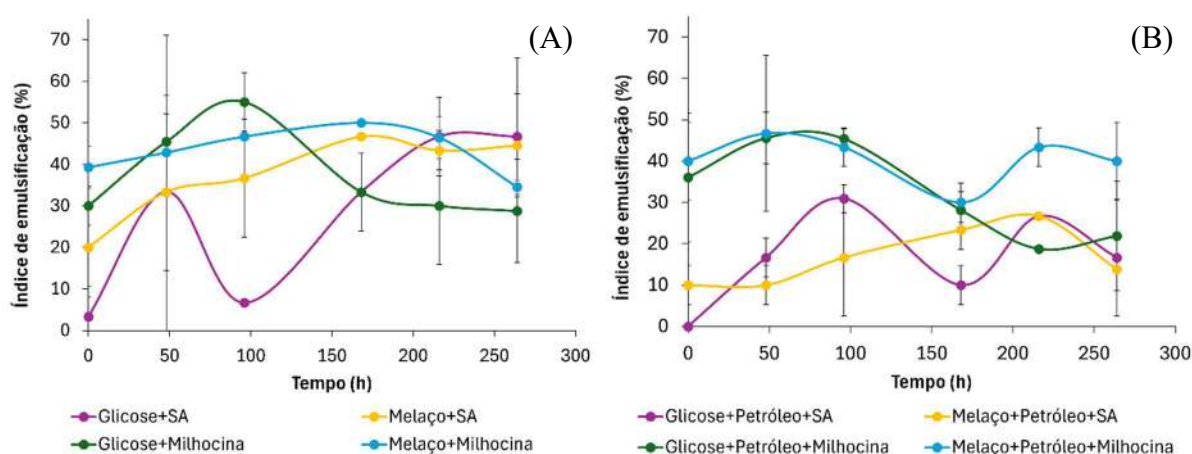
É possível perceber que, nos meios sem petróleo (Figura 4.1 A), houve crescimento celular, com uma fase exponencial de crescimento ocorrendo entre 0 e 48 h (podendo ter sido inferior a esse período já que não houve amostragem nesse intervalo). O meio de cultivo contendo melaço e milhocina apresentou um crescimento celular ligeiramente superior. Ao adicionar o

petróleo foi possível notar um aumento no crescimento celular de modo geral (Figura 4.1 B), sugerindo o consumo do petróleo pela levedura.

A ANOVA (Análise de Variância) foi utilizada para verificar se havia diferenças significativas entre os diferentes meios em relação às concentrações celulares ao longo do tempo. A análise ANOVA resultou em um valor de F de 3,40 e um valor de p de 0,0236, indicando que há uma diferença significativa entre as concentrações celulares nos diferentes meios. Um teste post-hoc, o HSD de Tukey, foi realizado para identificar as diferenças entre duas médias.

O meio contendo petróleo e glicose (substrato mais facilmente assimilado), apresentou a maior concentração celular (aproximadamente 11,5 g/L em cerca de 216 h de fermentação), diferindo significativamente de outros meios. Não foram encontradas diferenças significativas para os demais meios e eles também suportaram concentrações celulares relativamente altas, demonstrando a adaptabilidade de *Y. lipolytica* para utilizar substratos à base de melaço, isoladamente ou em combinação com petróleo bruto.

Ao avaliar o índice de emulsificação (Figura 4.2), o meio contendo glicose e milhocina apresentou o maior valor, atingindo um pico de 55% após 96 h de cultivo. No entanto, a ANOVA resultou em uma estatística F de 2,20 e um valor de p de 0,098, indicando que não há evidência estatística de diferenças significativas entre os meios.



**Figura 4.2 – Índice de emulsificação de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicose ou melaço como fonte de carbono e milhocina ou sulfato de amônia (SA) como fonte de nitrogênio, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo**

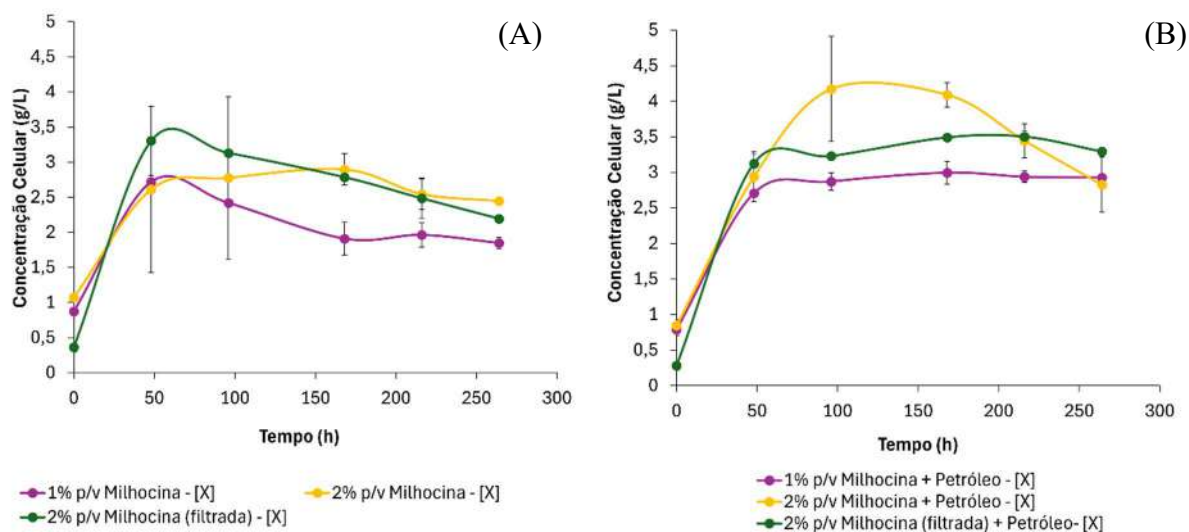
Os resultados mostram que *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foi capaz de produzir biossurfactante a partir de todas as fontes de carbono e de nitrogênio investigadas, tanto na presença quanto na ausência do petróleo.

Além disso, nota-se que em alguns meios, principalmente os contendo os resíduos agroindustriais, o valor do índice de emulsificação inicial foi superior a zero (Figura 4.2). Possivelmente essa condição se deve à presença de compostos emulsificantes nos resíduos, sobretudo na milhocina. Dessa forma, os valores de IE foram analisados subtraindo-se o valor inicial ( $\Delta IE$ ).

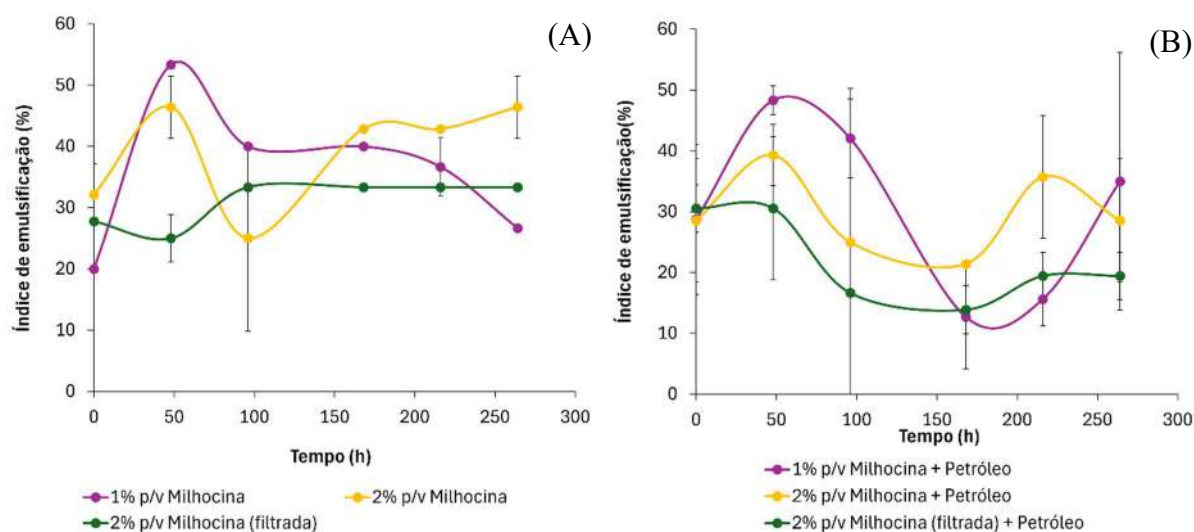
Aspirando também a degradação do óleo, considerando que a levedura deve degradar preferencialmente o petróleo, optou-se por utilizar um meio contendo apenas a milhocina, com o intuito de evitar competição entre fontes de carbono. A fim de estabelecer a melhor concentração de milhocina para a produção do biossurfactante, foram avaliados outros meios com diferentes concentrações do resíduo agroindustrial, contendo apenas o petróleo como fonte de carbono. Além dos experimentos com 1% p/v, foram testados meios com 2% p/v e com 2% p/v de milhocina filtrada, buscando diminuir a quantidade de sólidos suspensos no meio de cultivo.

Ao aumentar a concentração do resíduo agroindustrial, foi possível notar também um aumento na concentração celular (Figura 4.3), sendo o meio contendo 2% p/v de milhocina e 1% v/v de petróleo o que atingiu as maiores concentrações (4,17 g/L) (Figura 4.3 (B)). Também foi possível observar que *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foi capaz de crescer no meio suplementado apenas com a milhocina, sem fonte de carbono adicional, porém apresentou menor crescimento celular. Além disso, quando o petróleo bruto foi adicionado, nota-se um aumento no crescimento celular, reforçando que o petróleo está sendo usado como fonte de carbono.

A Figura 4.4 mostra os resultados de índice de emulsificação dos meios com concentrações variadas de milhocina. Em relação à atividade emulsificante, o meio contendo 1% p/v de milhocina apresentou os melhores resultados (pico de IE = 53,33% e  $\Delta IE$  = 33,33%) (Figura 4.4 (A)), mesmo sendo o que proporcionou o menor crescimento celular (aproximadamente 3 g/L) (Figura 4.3 (A)). O meio contendo petróleo e 1% p/v de milhocina resultou em uma variação dos valores de IE ( $\Delta IE$ , de 0 a 96 h) de 20%, que foi ligeiramente inferior ao meio contendo apenas glicose como fonte de carbono ( $\Delta IE$  = 25%).

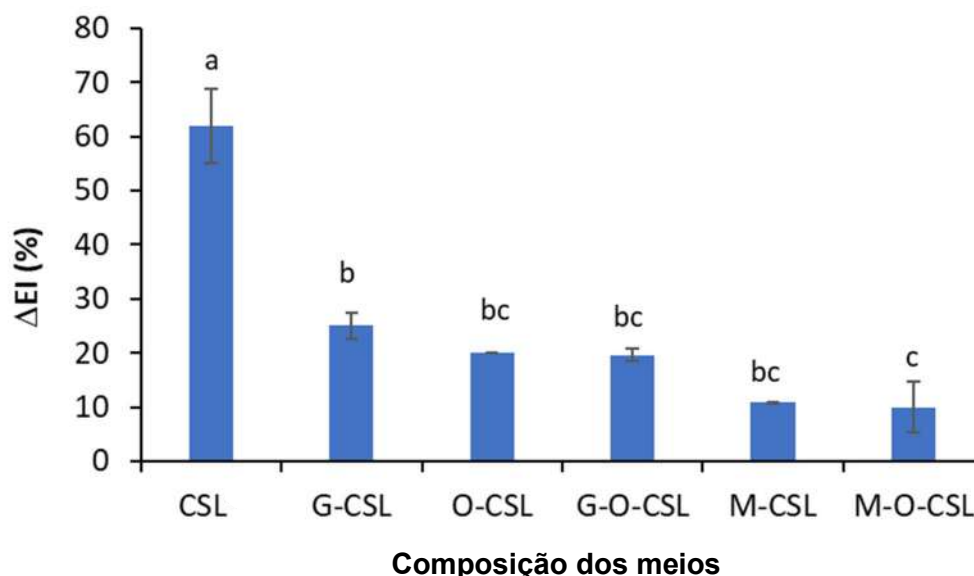


**Figura 4.3 – Perfil de crescimento celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v ou 2% p/v de milhocina ou 2% p/v de milhocina filtrada como fonte de nitrogênio, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.**



**Figura 4.4 – Índice de emulsificação de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v ou 2% p/v de milhocina ou 2% p/v de milhocina filtrada como fonte de nitrogênio, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.**

Os  $\Delta$ valores de IE de 96 h de processo de alguns meios foram comparados, conforme mostrado na Figura 4.5. A ANOVA realizada para esses valores resultou em uma estatística F de 58,61 e um valor de p de 0,00,005, indicando evidência estatística de diferenças significativas entre as médias.



**Figura 4.5 – Índice de emulsificação (IE) após 96 h subtraído pelo valor inicial de IE ( $\Delta$ IE), do cultivo de *Y. lipolytica* em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio, a 28°C e 160 rpm; G: glicose; M: melaço; O: petróleo; CSL: Milhocina. Letras diferentes (a,b,c) significam que os valores diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).**

De acordo com Fontes, Amaral e Coelho (2008), a maioria dos biossurfactantes geralmente é produzida durante a fase estacionária de crescimento, entretanto algumas espécies podem apresentar produção durante a fase exponencial. A partir dos resultados, foi possível detectar uma atividade de emulsificação significativa na fase de crescimento exponencial, entre 48 e 96 h de cultivo.

Um resultado similar foi observado por Amaral *et al.* (2006) na produção de bioemulsionante por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. A produção do biossurfactante ocorreu durante a fase exponencial, porém a atividade emulsionante mais significativa ocorreu durante a fase estacionária.

Fontes *et al.* (2012) também identificaram atividade emulsificante significativa durante a fase exponencial na produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* utilizando suco de caju clarificado com e sem sulfato de amônia.

A presença de um ou mais “vales” no perfil de IE durante diferentes tempos da fermentação foi outro fenômeno observado. Essa diminuição do índice de emulsificação pode ser atribuída à existência de proteases produzidas pela levedura, que, segundo Grangemard *et al.* (1999),

diminuem a eficiência do surfactante, uma vez que atuam sobre sua porção peptídica gerando um lipopeptídeo de cadeia aberta. De acordo com Fontes (2008), outra possibilidade é que a levedura utilize o biossurfactante produzido como fonte de carbono durante este período.

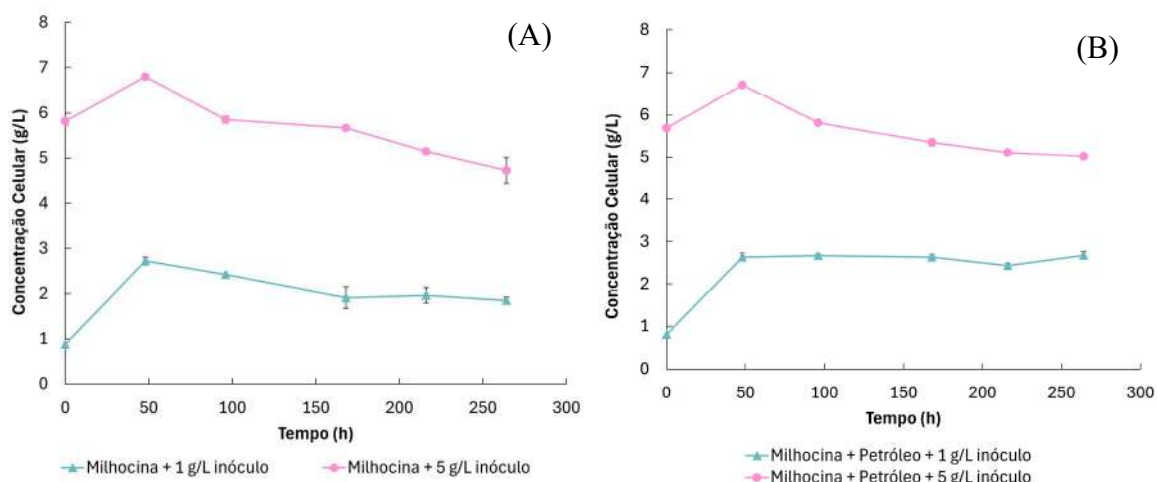
Além disso, também foi possível notar que os resultados do índice de emulsificação dos experimentos controle foram superiores aos ensaios com o petróleo, sugerindo que quando *Y. lipolytica* foi cultivada com o substrato hidrofóbico como fonte de carbono, a produção de biossurfactante não foi favorecida. De acordo com Fontes (2008), isso pode ser atribuído a associação do surfactante produzido à parede celular da levedura. Segundo LANG e PHILP (1998) apenas uma pequena porção do surfactante produzido é liberado quando substratos hidrofóbicos são utilizados como fonte de carbono para produção de biossurfactante por microrganismos. Como o surfactante aderido à parede celular da levedura não foi quantificado, há uma subestimação da produção de biossurfactante nesses meios.

Com base nos resultados obtidos foi selecionado o meio suplementado por 1% p/v de milhocina para a continuidade deste estudo.

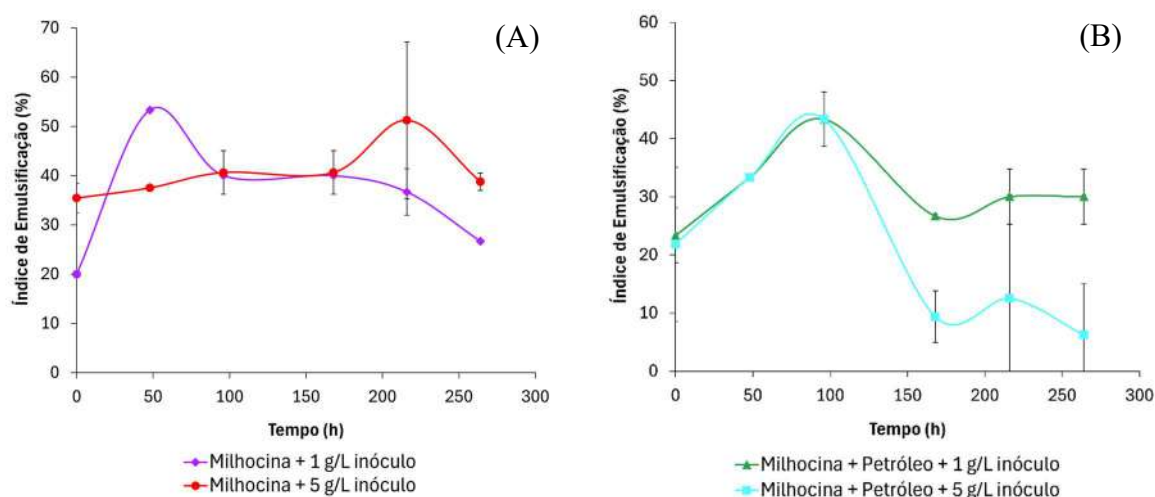
## 4.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO

Alguns trabalhos na literatura indicam um efeito positivo causado pela concentração de inóculo na biodegradação do petróleo. Ferreira (2009) reportou um efeito positivo da concentração de inóculo na remoção de óleo cru. Os ensaios realizados utilizando o maior nível de concentração resultaram nas maiores porcentagens de remoção. Medeiros, Nascimento e Ribeiro (2007) também analisaram o efeito da concentração de inóculo no consumo de petróleo por *Yarrowia lipolytica* e constataram que o parâmetro teve um efeito positivo.

Uma vez selecionada a concentração de milhocina que levou aos melhores resultados, também foi feito o estudo do efeito da concentração de inóculo (1 e 5 g/L) na produção do biossurfactante. Os experimentos foram realizados em meio mineral suplementado com 1% p/v de milhocina (meio controle) e em meio mineral com milhocina 1% p/v e 1% v/v petróleo. A Figura 4.6 mostra o perfil de crescimento celular e a Figura 4.7 o índice de emulsificação sob as diferentes concentrações de inóculo.



**Figura 4.6 – Perfil de crescimento celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 1 g/L ou 5 g/L de inóculo, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.**



**Figura 4.7 – Índice de emulsificação de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 1 g/L ou 5 g/L de inóculo, a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.**

É possível notar, que o perfil de crescimento celular em ambas as concentrações de inóculo, com e sem a adição de petróleo, foram semelhantes (Figura 4.6). No entanto, essa semelhança não foi observada no índice de emulsificação (Figura 4.7).

Nos meios controle (Figura 4.7 (A)), o maior valor de índice de emulsificação foi similar em ambas as concentrações iniciais, sendo de 53,33% ( $\Delta IE = 33,33\%$ ) para o experimento com

1g/L de células e 51,25% ( $\Delta IE = 21,25\%$ ) para o experimento com 5 g/L. Entretanto, os dois valores foram observados em fases diferentes do crescimento celular.

Já nos meios contendo petróleo (Figura 4.7 (B)), os experimentos apresentaram perfis semelhantes no início da fermentação, ambos obtendo o pico de índice de emulsificação (43,33%) em 96 h e  $\Delta IE$  de aproximadamente 17%. Após esse tempo, os perfis se distanciaram, sendo o experimento com 1g/L de células o que apresentou os maiores resultados de atividade emulsionante.

A partir dos dados foi possível concluir que a concentração de inóculo nessas condições não apresentou efeitos significativos sobre a produção do biossurfactante. Tal resultado é discordante ao observado por Ferreira (2009), que mostrou que o efeito da concentração do inóculo foi positivo.

Apesar da influência não ter sido significativa na produção de biossurfactante, concentrações iniciais de células superiores a 1 g/L ainda foram utilizadas, devido à possibilidade do aumento na biodegradação do petróleo.

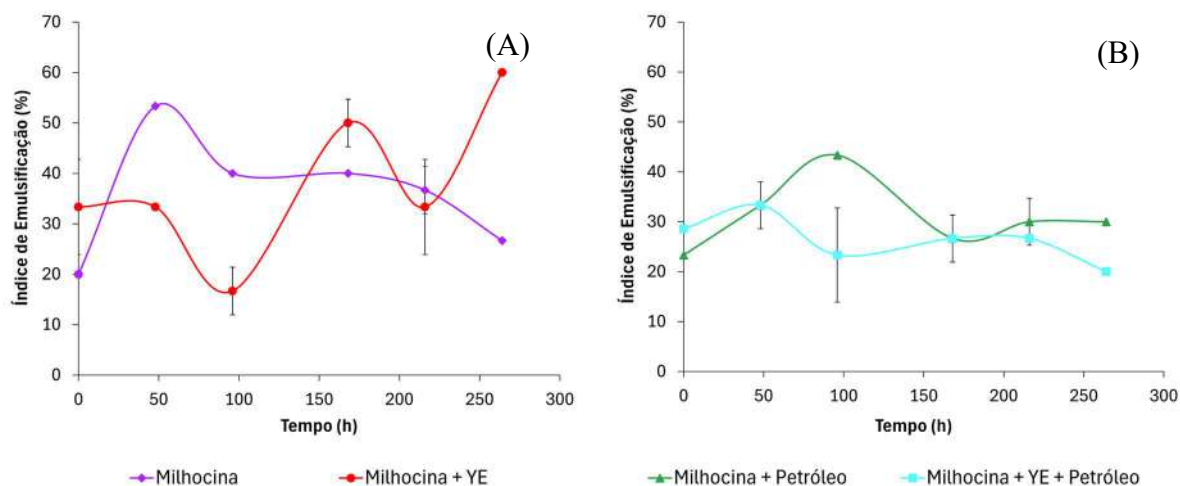
### 4.3 EFEITO DA ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA

Kim *et al.* (2000) relataram que a atividade emulsificante do biossurfactante pode ser influenciada pela adição de suplementos ao meio de cultivo. Fundamentado nisso, foi avaliado o efeito da adição de extrato de levedura (0,1% p/v) no meio de cultura na produção do biossurfactante. Os experimentos foram realizados em meio mineral com 1% p/v de milhocina, 0,1% p/v de extrato de levedura (YE), 1% v/v de petróleo e 5 g/L de concentração de inóculo. A Figura 4.8 apresenta os dados referentes ao índice de emulsificação dos meios com e sem suplementação da vitamina.

Nos meios controle (Figura 4.8 (A)), a adição do extrato de levedura apresentou um efeito levemente positivo, sendo 60% o maior valor observado do índice de emulsificação e  $\Delta IE$  de 33,33% para o meio com a suplementação do nutriente. Em contrapartida, a produtividade do meio sem suplementação foi maior, pois apresentou índice de emulsificação alto nas primeiras 48 h de cultivo, enquanto o meio suplementado apresentou valores significativos de emulsificação apenas a partir de 168 h.

Já nos meios contendo o petróleo (Figura 4.8 (B)), a adição do extrato de levedura aparentemente não favoreceu significativamente a produção do biossurfactante, apesar do conteúdo de sais minerais e vitaminas desse nutriente. O maior valor do índice de emulsificação

(43,33%) e de  $\Delta$ IE (20,05%) foi observado no meio sem a suplementação do composto orgânico.



**Figura 4.8 – Índice de emulsificação *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral com 1% p/v milhocina contendo ou não extrato de levedura (YE), a 160 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.**

Tais resultados podem ser atribuídos ao nível de nitrogênio no meio de cultivo, uma vez que foram utilizados dois compostos nitrogenados, a milhocina e extrato de levedura. O alto nível de nitrogênio promove o crescimento microbiano e limita a produção de metabólitos. Segundo Casas e Ochoa (1999), a produção de biossurfactante diminui em altas concentrações de extrato de levedura devido à exaustão da fonte de carbono, motivada pelo grande crescimento celular.

De acordo com Fontes *et al.* (2010), a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* foi favorecida em concentrações mais baixas de YE (0,5 g/L), obtendo índice de emulsificação de aproximadamente 73%. Na concentração mais alta de YE (5 g/L) a produção de biossurfactante foi prejudicada, chegando a valores de IE de aproximadamente 45%.

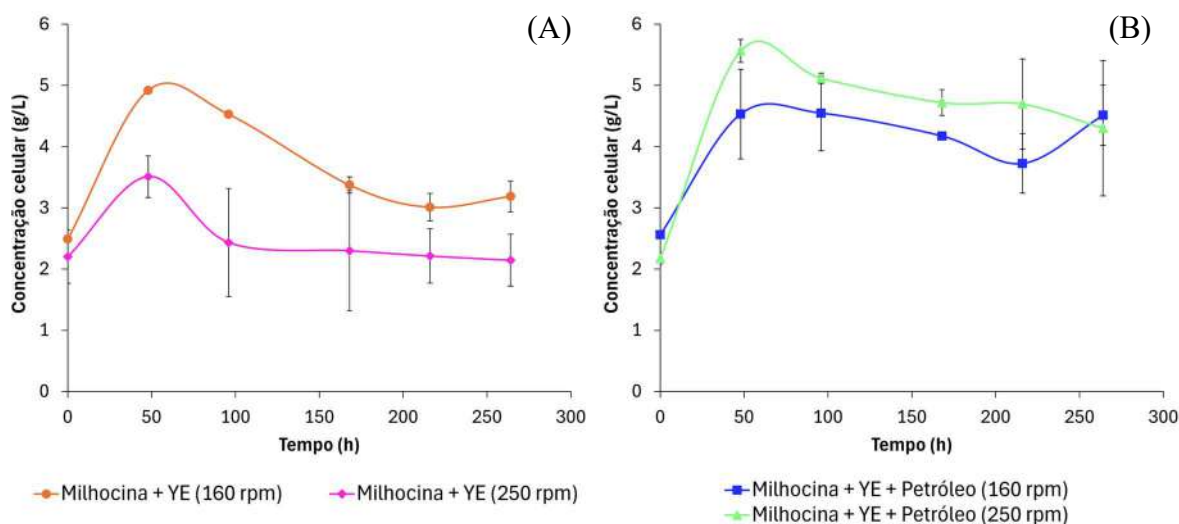
Apesar do extrato de levedura ser a fonte de nitrogênio mais utilizada, sua concentração ótima ainda não está clara (FONTES *et al.*, 2010).

#### 4.4 INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO

A velocidade de agitação é um parâmetro de grande influência para o crescimento celular e para a produção de biossurfactante. Alguns trabalhos da literatura também reportaram um efeito positivo do aumento da agitação na biodegradação do petróleo.

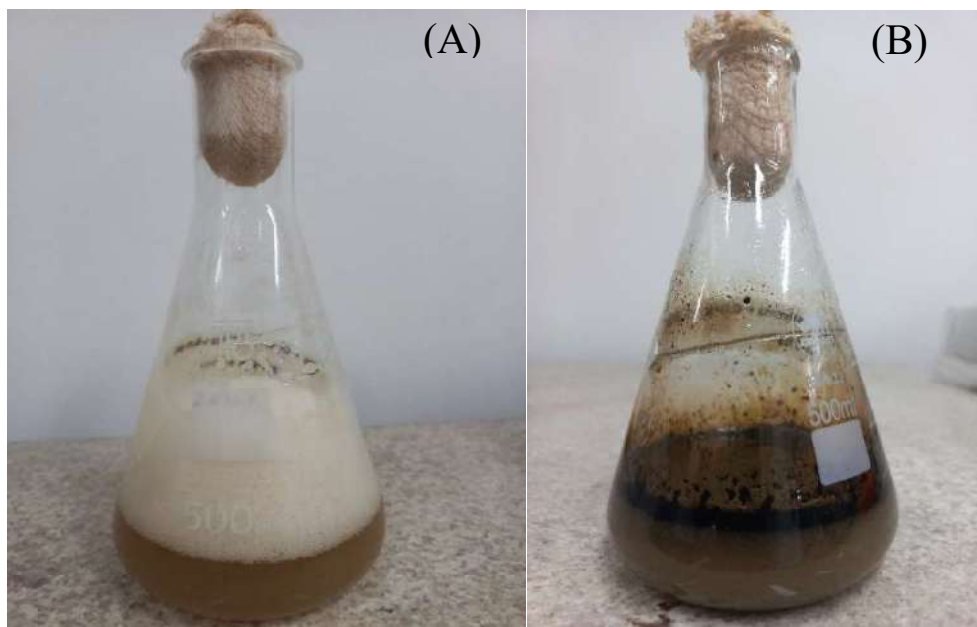
Considerando isso, estudou-se a influência da velocidade de agitação na produção do biosurfactante neste trabalho. Para esse estudo foram utilizados meios contendo 1% p/v de milhocina, 0,1% p/v de extrato de levedura (YE) e 1% v/v de petróleo, com uma concentração de inóculo de aproximadamente 2,5 g/L. A concentração inicial desejada era de aproximadamente 5 g/L, conforme utilizado nos estudos da influência da concentração de inóculo e no efeito da adição de extrato de levedura, entretanto, devido à não linearidade, variabilidade e complexidade dos bioprocessos, a levedura não cresceu de forma similar aos demais experimentos. Apesar disso, os resultados ainda foram analisados, mas há a necessidade de repetição para obtenção de dados mais realistas.

A Figura 4.9 representa os perfis de crescimento celular dos experimentos realizados a 160 rpm e 250 rpm. É possível observar que o experimento contendo petróleo realizado na maior agitação (250 rpm) apresentou uma variação de biomassa maior (aumentando 155% em 48h, que foi o ponto máximo de crescimento), assim como um crescimento mais acelerado. Em contrapartida, o meio controle realizado a 250 rpm foi o experimento que apresentou menor crescimento celular. Tal resultado pode ser explicado pela formação intensa de espuma do meio controle com o aumento da velocidade, enquanto no meio contendo o substrato hidrofóbico não houve formação de espuma (Figura 4.10).



**Figura 4.9 – Perfil de crescimento celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 0,1% p/v YE, a 160 ou 250 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.**

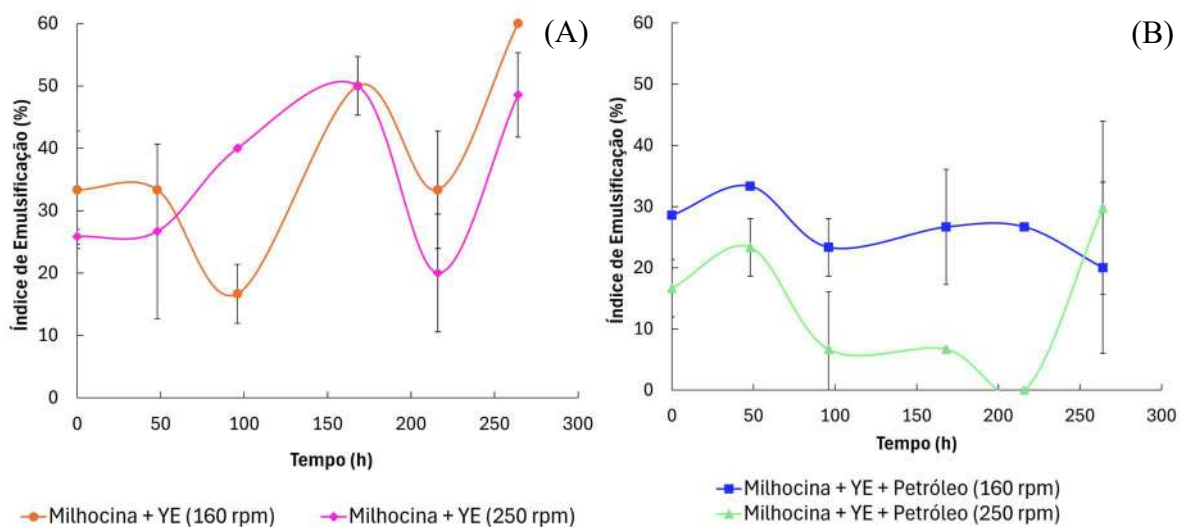
Como já discutido anteriormente, a formação de espuma não é um fator desejado em bioprocessos, uma vez que diminui a eficiência do transporte de oxigênio no meio líquido e retira as células e o biossurfactante do meio reacional. Portanto, o baixo crescimento celular é devido à aderência de grande parte das células à espuma. (Figura 4.9 (A)).



**Figura 4.10 – Imagens dos frascos após 96h de crescimento de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 0,1% p/v YE, a 250 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.**

Embora o aumento da velocidade de agitação tenha produzido um efeito positivo sobre o crescimento celular do meio contendo petróleo, na produção do biossurfactante o aumento da agitação não apresentou melhorias. A Figura 4.11 apresenta os dados de índice de emulsificação sob as diferentes condições de agitação do meio controle e do meio contendo petróleo.

Mesmo sendo o experimento que apresentou o menor crescimento celular, o meio controle conduzido a 250 rpm apresentou melhores valores de atividade emulsionante (pico de  $IE = 50\%$  e  $\Delta IE = 20,83\%$ ) quando comparado ao meio contendo petróleo conduzido na mesma velocidade (pico de  $IE = 29,79\%$  e  $\Delta IE = 16,46\%$ ) (Figura 4.11), o qual apresentou o maior crescimento celular (Figura 4.9 (B)). Neste caso, sugere-se que a via metabólica de crescimento foi desviada para a produção de biossurfactante. Outra possibilidade é subestimação do índice de emulsificação, visto que o surfactante aderido à parede celular da levedura não é quantificado.



**Figura 4.11 – Índice de emulsificação de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo 1% p/v de milhocina + 0,1% p/v YE, a 160 ou 250 rpm. (A) Cultivo sem petróleo e (B) cultivo com petróleo.**

Apesar do meio controle conduzido a 250 rpm ter apresentado resultados significativos, os melhores resultados de emulsificação foi observado no meio conduzido a 160 rpm (pico de IE = 60% e  $\Delta$ IE = 33,33%) (Figura 4.11), demonstrando que o aumento da agitação não apresentou melhorias na produção do biossurfactante nas condições estudadas, sendo necessário refazer os experimentos.

#### 4.5 pH DOS MEIOS DE CULTIVO

Os valores de pH obtidos durante a fermentação demonstraram uma tendência a neutralidade conforme ocorria o consumo dos nutrientes adicionados ao meio, que inicialmente apresentava valores entre 5-6. Os meios contendo melaço, combinado ou não com a milhocina apresentaram um pH final de aproximadamente 6, enquanto os meios contendo apenas milhocina alcançaram valores próximos à neutralidade.

Nos meios contendo sulfato de amônio ou glicose o pH foi diferente dos demais meios e oscilou entre 3,12 e 6,01 mantendo a produção de biossurfactante. Tais resultados demonstram que *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 é eficiente na produção de biossurfactante em uma ampla faixa de pH, isso, por sua vez, resulta na ausência de custos relacionados ao controle de pH durante o processo.

A tabela 4.1 mostra os valores de pH inicial e final dos experimentos realizados.

**Tabela 4.1 – Concentração inicial, pH inicial (0h) e pH final (264h) dos diferentes meios de cultivo**

<b>Experimentos</b>	<b>rpm</b>	<b>Concentração inicial (g/L)</b>	<b>pH inicial</b>	<b>pH final</b>
1% p/v glicose + 1% p/v sulfato de amônio	160	1	5,89	4,93
1% p/v glicose + 1% v/v petróleo + 1% p/v sulfato de amônio	160	1	5,73	5,2
1,7% p/v melaço + 1% p/v sulfato de amônio	160	1	5,47	5,13
1,7% p/v melaço + 1% v/v petróleo + 1% p/v sulfato de amônio	160	1	5,45	5,38
1% p/v glicose + 1% p/v milhocina	160	1	5,49	6,01
1% p/v glicose + 1% v/v petróleo + 1% p/v milhocina	160	1	5,53	6,16
1,7% p/v melaço + 1% p/v milhocina + 1% v/v petróleo	160	1	5,42	6,11
1% p/v milhocina	160	1	5,75	6,72
1% p/v milhocina + 1% v/v petróleo	160	1	5,79	6,7
1,7% p/v melaço + 1% p/v milhocina	160	1	5,12	6,75
2% p/v milhocina	160	1	5,17	6,96
2% p/v milhocina + 1% v/v petróleo	160	1	5,14	6,87
2% p/v milhocina filtrada	160	1	5,26	6,91
2% p/v milhocina filtrada + 1% v/v petróleo	160	1	5,16	6,85
1% p/v milhocina	160	5	5,71	6,64
1% p/v milhocina + 1% v/v petróleo	160	5	5,65	6,37
1% p/v milhocina + 0,1% p/v YE	160	2,5	5,62	7,11
1% p/v milhocina + 1% v/v petróleo + 0,1% p/v YE	160	2,5	5,65	6,76
1% p/v milhocina + 0,1% p/v YE	250	2	5,73	7,03
1% p/v milhocina + 1% v/v petróleo + 0,1% p/v YE	250	2	5,77	7,04

## 5 CONCLUSÕES

Com base no exposto, pode-se concluir que *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 é capaz de produzir biossurfactante quando cultivada em diferentes meios contendo petróleo, incluindo meios contendo este substrato hidrofóbico como única fonte de carbono, mostrando o potencial daquela cepa na biodegradação do óleo. No entanto, algumas limitações devem ser reconhecidas, como a inutilização de métodos mais eficientes na determinação da produção de biossurfactante, como o método da tensão superficial ou o método “Oil spreading”.

Dentre os resíduos testados, a milhocina foi o que apresentou os resultados mais satisfatórios. Estima-se que a utilização de fontes de origens renováveis diminua o custo total da produção de biossurfactante em 10 a 30%, além de ser uma possível solução para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais.

Nas condições estudadas, a concentração de inóculo, pH e suplementação com extrato de levedura não apresentaram influência significativa nos valores de índice de emulsificação, ao passo que o aumento da velocidade não apresentou melhoria, sendo necessário refazer o experimento.

Em relação à produção de biossurfactante nos meios contendo o petróleo, ocorre uma subestimação dos valores de índice de emulsificação, visto que o surfactante aderido à parede celular da levedura não é quantificado.

Em continuidade, experimentos futuros serão direcionados à investigação da degradação do óleo cru por *Y. lipolytica*, a fim de confirmar que essa levedura pode ser utilizada para processos de biorremediação e simultaneamente produzir produtos de valor agregado, e à utilização de métodos mais robustos para o acompanhamento da produção de biossurfactantes.

Este trabalho avança na aplicação de *Y. lipolytica* em processos biotecnológicos sustentáveis, posicionando a milhocina como uma fonte de nutrientes econômica e eficiente para a produção de biossurfactantes e biorremediação de hidrocarbonetos.

## 6 REFERÊNCIAS

- ADEDEJI, J. A.; TETTEH, E. K.; OPOKU AMANKWA, M.; ASANTE-SACKEY, D.; OFORI-FRIMPONG, S.; ARMAH, E. K.; RATHILAL, S.; MOHAMMADI, A. H.; CHETTY, M. Microbial Bioremediation and Biodegradation of Petroleum Products—A Mini Review. *Applied Sciences*. 12, 12212, 2022.
- ALMEIDA, G. A. M.; NETA, M. R. A. V.; SILVA, G. F.; PRADO, P. F.; ALMEIDA, M. A.; DUARTE, I. C. S. Produção de biossurfactante por *lysini bacillus sp.* e *bacillus sp.* a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. *Revista Matéria*. v.25, n.4, 2020.
- ALVES, E. P. Avaliação da produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por *pleurotus sajor-caju* a partir de óleo de soja. Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos), Universidade da Região de Joinville, Santa Catarina, Brasil, 2015.
- AMARAL, P. F. F.; DA SILVA, J. M.; LEHOCKY, B. M., BARROS-TIMMONS A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*. v. 41, pp. 1894–1898, 2006.
- AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C. F.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and bioproducts processing*. v.87, p.179–186, 2009.
- BANAT, I. M.; SATPUTE, S. K.; CAMEOTRA, S. C.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*. v. 5, 2014.
- BANKAR, A. V.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied microbiology and biotechnology*. v. 84, p. 847-65, 2009.
- BARROS, V. P. O.; SILVA, J. R. M.; MELO, V. M. M.; TERCEIRO, P. S.; OLIVEIRA, I. N.; FREITAS, J. D.; MOURA, O. F. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; RODRIGUES, E. E. S.; MARASCHIN, M.; THOMPSON, F. L.; LANDELL, M. F. Biosurfactants production by marine yeasts isolated from zoanthids and characterization of an emulsifier produced by *Yarrowia lipolytica* LMS 24B. *Chemosphere*. v. 355, 141807, 2024.
- BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 19, pp. 219-237, 1997.
- BJERK, T. R.; SEVERINO, P.; MARQUES, C.; SILVA, A. M.; PASHIROVA, T.; SOUTO, E. B. Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery, Biotechnology and Ecotoxicology. *Bioengineering*. 8, 115, 2021.
- BORAH, D.; YADAV, R. N. S. Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. *Egyptian Journal of Petroleum*. v. 26, 181-188, 2017.

CASAS, J.; GARCIA-OCHOA, F. G. Sophorolipid Production by *Candida bombicola*: Medium Composition and Culture Methods. *Journal of bioscience and bioengineering*. v. 88, n. 5, pp. 488-494, 1999.

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

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. v. 2, 2010.

COOPER D.G., PADDOCK D. A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. 47(1):173–176. 1984.

COSTA, G. S. Remediação de resíduos petrolíferos contendo hidrocarbonetos de relevância ambiental por processos de oxidação avançada. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química), Setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2016.

CUNHA, C. D.; ROSÁRIO, M.; ROSADO, A. S.; LEITE, S. G. F. *Serratia sp.* SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochemistry*. v. 39, 2277-2282, 2004.

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

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

FERREIRA, T. F. Emprego de *Yarrowia lipolytica* na degradação de óleo cru. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

FERREIRA, T. F.; MARTINS, F. F.; CAYRES, C. A.; AMARAL, P. F. F.; AZEVEDO, D. A.; COELHO, M. A. Z. Biosurfactant Production from the Biodegradation of n-Paraffins, Isoprenoids and Aromatic Hydrocarbons from Crude Petroleum by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Fermentation*. 9, 21, 2023.

FONTES, G. C. Produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

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

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; NELE, M.; COELHO, M. A. Z. Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. v. 2010, 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. V. 29, 483-493, 2012.

GRANGEMARD, I.; WALLACH, J.; PEYPOUX, F. Evidence of surfactin hydrolysis by a bacterial endoprotease. Biotechnology Letters. v. 21, p. 241-244, 1999.

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 médium. Frontiers in Microbiology. v. 6, 59, 2015.

HAGLER A.N., MENDONÇA-HAGLER L.C. Yeast from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil, Applied and Environmental Microbiology. 41, 173-178, 1981.

HOMMEL, R.K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RIKE, O. e KLEBER, H.P. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. Journal of Biotechnology, v. 33(15), 147-155, 1994.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Bioresource Technology. v. 99, 195-199, 2008.

KRONBERG, F.; GIACOMETTI, R.; RUIZ-HERRERA, J.; PASSERON, S. Characterization of the regulatory subunit of *Yarrowia lipolytica* cAMP-dependent 78 protein kinase. Evidences of a monomeric protein, Archives of Biochemistry and Biophysics, v.509, 66–75, 2011.

LIEPINS, J.; BALINA, K.; SOLOHA, R.; BERZINA, I.; LUKASA, L. K.; DACE, E. Glycolipid Biosurfactant Production from Waste Cooking Oils by Yeast: Review of Substrates, Producers and Products. Fermentation. 7, 136, 2021.

LOBO, L. C. Biodegradação parcial de asfaltenos por *Yarrowia lipolytica* como estratégia de agregação de valor a resíduos de petróleo. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2012.

MARINHO, P. S. S.; SILVA, R. R.; LUNA, J. M. Biossurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. Research, Society and Development. v. 11, n. 12, 2022.

MEDEIROS, C. V.; NASCIMENTO, R. V.; RIBEIRO, R. R. Avaliação do consumo de petróleo utilizando *Yarrowia lipolytica*. Projeto Final de Curso. Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

MNIF, S.; CHAMKHA, M.; LABAT, M.; SAYADI, S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bactéria. Journal of Applied Microbiology. v. 111, 525–536, 2011.

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

OLIVEIRA, P. H. S. Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2014.

OLIVEIRA, E. M.; SALES, V. H. G.; DIAS, E. D. C.; 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. v. 10, n.17, 2021.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Letters in Applied Microbiology. v. 25, 91–94, 1997.

PEREIRA, D. D. F.; DUVOISIN JR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. O estudo da produção de biossurfactantes por fungos amazônicos. The Journal of Engineering and Exact Sciences. v. 3, 0688-0695, 2017.

RATHORE, A.S.; MISHRA S.; NIKITA S.; PRIYANKA P. Bioprocess Control: Current Progress and Future Perspectives. Life.11(6):557, 2021.

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

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. Electronic Journal of Biotechnology. v. 17, 34-38, 2014.

SABIR, S. Approach of Cost-Effective Adsorbents for Oil Removal from Oily Water. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 45(17), 1916–1945, 2015.

SANTOS, A. C.; BEZERRA, M. S.; PEREIRA, H. S.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Production and Recovery of Rhamnolipids Using Sugar Cane Molasses as Carbon Source. Journal of Chemistry and Chemical Engineering. v. 4, 2010.

SANTOS D. K. F.; RESENDE A. H. M.; ALMEIDA D. G.; SILVA R. C. F. S., RUFINO R. D.; LUNA J. M.; BANAT I. M.; SARUBBO L. A. *Candida lipolytica* UCP0988 Biosurfactant: Potential as a Bioremediation Agent and in Formulating a Commercial Related Product. Frontiers Microbiology. v. 8, 2017.

SANTOS, F. F.; FREITAS, K. M. L.; NETO, J. J. G. C.; FONTES-SANT'ANA, G.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; AMARAL, P. F. F. Tiger Nut (*Cyperus esculentus*) Milk Byproduct and Corn Steep Liquor for Biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. Chemical Engineering Transactions. v. 65, 331-336, 2018.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. International Journal of Molecular Science. 17, 401, 2016.

SANTOS, C. V. M.; VIEIRA, I. M. M.; SANTOS, B. L. P.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P. Biossurfactante – conceitos gerais e perspectivas. Ambiente & Sociedade: concepções, fundamentos, diálogos e práticas para conservação da natureza. 319-342, 2021.

SANTOS D. K. F.; RESENDE A. H. M.; ALMEIDA D. G.; SILVA R. C. F. S.; RUFINO R. D.; LUNA J. M.; BANAT I. M.; SARUBBO L. A. *Candida lipolytica* UCP0988 Biosurfactant: Potential as a Bioremediation Agent and in Formulating a Commercial Related Product. *Frontiers in Microbiology*. v. 8, 2017.

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

SERAFIM, E. J. Estudo da produção de biossurfactante e lipase por *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizando substratos de baixo custo. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil, 2017.

SOONG, Y. V., COLEMAN, S. M., LIU, N., QIN, J., LAWTON, C., ALPER, H. S., XIE, D. Using oils and fats to replace sugars as feedstocks for biomanufacturing: Challenges and opportunities for the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Advances*. v. 65, 2023.

TAKAHASHI, M.; MORITA, T.; WADA, K.; HIROSE, N.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Production of sophorolipid glycolipid biosurfactants from sugarcane molasses using *Starmerella bombicola* NBRC 10243. *Journal of Oleo Science*. 60, 267-273, 2011.

THAKUR, V.; BAGHMARE, P.; VERMA, A.; VERMA, J. S.; GEED, S. R. Recent progress in microbial biosurfactants production strategies: Applications, technological bottlenecks, and future outlook. *Bioresource Technology*. v. 408, 2024.

VALPUESTA, R. R. F. Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de matéria-prima renovável e de baixo custo. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

VAN DER WALT, J. P.; VON ARX, J. A. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*. 46, 517–521, 1980.

WICKERHAM, L. J.; KURTZMAN, C. P.; HERMAN, A. I. Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science*. v. 167, 1970.

YARROW, D. Four new combinations in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 38, 357-360, 1972.

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