



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Amanda Barbosa Lins

Produção de bioemulsificante por *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 através da bioeconomia circular utilizando substratos renováveis

Recife
2019

Amanda Barbosa Lins

Produção de bioemulsificante por *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 através da bioeconomia circular utilizando substratos agroindustriais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Recife

2019

Lins, A. B.

Produção de bioemulsificante por *Rhodotorula mucilaginosa* através da bioeconomia circular utilizando substratos agroindustriais, 2019, 67.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2019.

1. Emulsificante. 2. Levedura. 3. Resíduos agroindustriais.
- Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.
Mestrado em Desenvolvimento de Processos ambientais

PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE POR *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 ATRAVÉS DA
BIOECONOMIA CIRCULAR UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

AMANDA BARBOSA LINS

Banca Examinadora:

Prof. Dra Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
Orientadora

Prof Dr Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof Dra Hέλvia Walewska Casullo de Araújo
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Suplentes:

Prof. Dra Juliana Moura Luna
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
(Suplente Interno)

Prof Dra Celuta Sales Alvino
Universidade Católica de Pernambuco – UFRJ
(Suplente Externo)

Defendida em 22/02/2019

Coordenadora: Profa Dra Galba Maria de Campos Takaki

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus pela força, saúde, sabedoria e discernimento concedido.

A minha incentivadora orientadora Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki pela sabedoria, humanidade, paciência, exigências com a organização e execução dos experimentos e oportunidades a mim concedidas.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubem de Ferreira, pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), pela oportunidade e uso da infraestrutura para a realização dos experimentos.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco, pelo companheirismo e apoio, em especial, Marcos Luna, Dayana Montero, Roseleide Fontenele, Thayse Alves, Davi Cavalcanti, Daylin Rubio e Adriana Souza.

Aos técnicos Sr. Severino Humberto de Almeida, André Felipe e a Sra. Sônia Maria de Souza, pelo apoio.

Aos professores de Mestrado da Universidade Católica de Pernambuco, em especial ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves pelos ensinamentos e apoio.

A minha família pelo amor, carinho e apoio a mim concedidos em todos os momentos.

A minha amiga Ana Paula Melo Bione por toda amizade, paciência e força oferecidos durante a vida.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa e pelo fomento à pesquisa, para realização deste trabalho.

A todos direta e indiretamente, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOSiii
SUMÁRIOiv
LISTA DE FIGURASvi
LISTA DE TABELASviii
RESUMOix
ABSTRACTxi
CAPÍTULO I	
1.1 Introdução14
1.2 Objetivos16
1.2.1 Objetivo Geral16
1.2.2 Objetivos Específicos.....	..16
1.3 Revisão da Literatura17
1.3.1 Bioeconomia circular.....	..17
1.3.2 Resíduos agroindustriais.....	..18
1.3.3 Micro-organismos produtores de bioemulsificantes.....	..19
1.3.4 Emulsificantes.....	..22
1.3.5 Bioemulsificantes.....	..25
1.3.6 Fatores que afetam a produção de bioemulsificante.....	..31
1.3.6.1 Fatores ambientais.....	..31
1.3.6.2 Fatores nutricionais.....	..32
1.3.7 Aplicações dos bioemulsificantes.....	..33
1.3.7.1 Biorremediação.....	..34

1.3.7.2 Bioemulsificantes na indústria de óleo.....	34
1.3.7.3 Recuperação Microbiana de Petróleo Aprimorado (MEOR).....	35
1.4 Referências Bibliográfica.....	36
CAPÍTULO II – Artigo científico.....	45
CAPÍTULO III	
Conclusões Gerais.....	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Molécula de surfactante com porções apolares (hidrofóbicas) e polares (hidrofílicas).	22
Figura 2. Distribuição do emulsificante entre as interfaces água/óleo e óleo/água, formando emulsão.	23
Figura 3. Atividade do emulsificante iônico O/A (A) e atividade do emulsificante não iônico A/O (B).	23
Figura 4. Propriedade de emulsificação dos bioemulsificantes.	26
Figura 5. Propriedade de desemulsificação dos bioemulsificantes.	27
Figura 6. Propriedade de capacidade molhante dos bioemulsificantes.	27
Figura 7. Propriedade de capacidade espumante dos bioemulsificantes.	28
Figura 8. Propriedade de adsorção dos bioemulsificantes.	28

CAPÍTULO II

Figura 1. Curva de Calibração para determinação de carboidratos.	52
Figura 2. Diagrama de Pareto para determinas a influência dos resíduos agroindustriais (óleo de soja pós-fritura e milhocina) na produção de bioemulsificante.	55
Figura 3. Gráfico de superfície resposta para análise da influência das variáveis independentes (substratos agroindustriai) na variável resposta (IE_{24}).	55
Figura 4. Curva de crescimento da <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UCP 1551 através da densidade óptica avaliando o pH e o índice de emulsificação.....	56
Figura 5. Influência da temperatura na produção do bioemulsificante.....	57
Figura 6. Observações microscópicas das gotas formadas a partir do bioemulsificante após 24 h: (A) líquido metabólico do ensaio 4 com emulsão formado com óleo de motor in natura, (B) líquido metabólico do ensaio 1 com emulsão formada a partir do óleo de motor queimado e (C) surfactante sintético (SDS) com emulsão formada a partir do óleo de motor queimado.....	58
Figura 7. A estabilidade do bioemulsificante produzido por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UCP 1551 de acordo com o índice de emulsificação (IE_{24}): pH (A); NaCl (B); e temperatura (C).	60

Figura 8. Concentração micelar crítica do bioemulsificante produzido por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> em comparação com o surfactante sintético (SDS).....	61
Figura 9. Microscopia óptica da fibra do poliéster com água (A), seca (B) e com bioemulsificante (C).....	62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Lista de bioemulsificantes produzidos por levedura.	21
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Planejamento fatorial completo 2^2	50
Tabela 2. Planejamento fatorial de 2^2 para avaliar a influência do óleo de soja pós-fritura e da milhocina na produção de um bioemulsificante por <i>R. mucilaginosa</i> UCP 1551, avaliados durante 24 h pelo índice de emulsificação IE24 (%).....	54
Tabela 3. Caracterização macro e microscópica de emulsões formadas em óleo de motor queimado do bioemulsificante em 24 h.	59

RESUMO

O Brasil encontra-se em terceiro lugar na produção mundial de alimentos, onde as indústrias são responsáveis por gerar toneladas de resíduos sólidos, acarretando sérios problemas ambientais. Nesse sentido, o uso de estratégias como a bioeconomia circular possibilita a bioconversão desses resíduos em produtos com elevado valor agregado, como os bioemulsificantes, esses compostos possuem propriedades como: detergência, atividade emulsificante, lubrificação, capacidade molhante, capacidade de solubilização e dispersão de compostos hidrofóbicos em fases aquosas, além de possuírem baixa ou nenhuma toxicidade, serem biodegradáveis, resistentes a força iônica, pH e temperatura e possuírem especificidade. Estudos foram realizados com *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551, investigando o potencial de produção de bioemulsificante, empregando como substratos renováveis óleo de soja pós-fritura e milhocina. O cultivo foi realizado em frascos de Erlenmeyers de 250mL contendo 100 mL de base de sais, com 10% de inóculo com concentração de 10^8 cel/mL e os substratos de acordo com o planejamento fatorial completo 2^2 , tendo como variável independente o óleo de soja pós-fritura e a milhocina, e como variável resposta, o índice de emulsificação (IE_{24}), incubado a 28°C, sob agitação de 150 rpm por 96 h. As características do bioemulsificante foram avaliadas em relação ao índice de emulsificação, tamanho das gotas da emulsão, viscosidade, estabilidade frente a variações de pH, concentração de NaCl e temperatura, determinação da CMC e determinação da capacidade como agente molhante. Os resultados mostraram que o bioemulsificante apresentou um índice de emulsificação de 95,65% para óleo queimado de motor na condição 1 do planejamento (2,5% de milhocina e 1% de óleo de soja pós-fritura), com uma emulsão estável frente a pH, salinidade e temperatura. A condição 1 apresentou maior redução de viscosidade do óleo de motor queimado de 170 cP para 115,7 cP após 24h de repouso da amostra, se matando após 96 h. A bioemulsificante apresentou uma CMC de 2,5%, com uma composição bioquímica de 78,66% de lipídeos, de 14,65% de proteínas e 6,69% carboidratos. O novo bioemulsificante produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* demonstrou ser um agente molhante, sugerindo aplicações futuras na área do petróleo, em especial, na recuperação melhorada de petróleo (MEOR).

Palavras-Chave: Levedura do semi-árido, Emulsificante, Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Brazil ranks third in world food production, where industries are responsible for generating tons of solid waste, leading to serious environmental problems. In this sense, the use of strategies such as circular bioeconomics allows the bioconversion of these residues in products with high added value, such as bioemulsifiers. These compounds have properties such as: detergency, emulsifying activity, lubrication, wettability, solubility and dispersion of compounds hydrophobic in aqueous phases, as well as having low or no toxicity, are biodegradable, resistant to ionic strength, pH and temperature and have specificity. Studies were carried out with *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551, investigating the bioemulsifier production potential, using as renewable substrates post-fry soybean oil and corncina. The culture was carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 mL of salt base, with 10% of inoculum with concentration of 10^8 cells/mL and the substrates according to the complete factorial design 2^2 , with soybean oil and emulsification index (IE_{24}), incubated at 28 ° C, under agitation of 150 rpm for 96 h. The characteristics of the bioemulsifier were evaluated in relation to emulsification index, emulsion droplet size, viscosity, stability to pH variations, NaCl concentration and temperature, determination of CMC and determination of the capacity as wetting agent. The results showed that the bioemulsifier had an emulsification index of 95.65% for burned engine oil in condition 1 of the planning (2,5% of corncina and 1% of soybean oil after frying), with a stable emulsion against pH, salinity and temperature. Condition 1 had the highest viscosity reduction of the engine oil burned from 170 cP to 115.7 cP after 24 hours of sample rest, killing after 96 hours. The bioemulsifier had a CMC of 2.5%, with a biochemical composition of lipids 78.66%, proteins 14.65% and carbohydrates 6.69%. The new bioemulsifier produced by *Rhodotorula mucilaginosa* has been shown to be a wetting agent, suggesting future applications in the oil field, in particular in improved oil recovery (MEOR).

Key Words: Semi-arid yeast, Emulsifier, Agroindustrial wastes.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos são responsáveis por gerar toneladas de resíduos compostos de cascas, sementes, caroços e polpa dependendo do tipo de fruta a ser processada, acarretando sérios problemas ambientais devido à produção de lixo orgânico. O Brasil encontra-se em terceiro lugar do rank mundial em produção na área de alimentos. O reaproveitamento de resíduos gerados pela agroindústria que hoje é um dos maiores polos de investimentos, mesmo em países com alto desenvolvimento tecnológico como França e Estados Unidos, tem sido alvo de vários estudos o que contribui para o acúmulo de informações sobre o seu grande potencial e seus valores nutricionais (FILHO; FRANCO, 2015).

Particularmente, a bioeconomia circular dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além da produção de compostos de elevado valor agregado como biossurfactante, bioemulsificantes e diferentes metabólitos (PINTO et al., 2005; SATPUTE et al., 2017).

Bioemulsificantes são compostos anfipáticos com porções hidrofílicas (porção polar) e hidrofóbicas (porção apolar) que particionam preferencialmente entre interfaces líquidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, tais como interfaces óleo/água ou água/óleo. Esses compostos possuem propriedades como: detergência, atividade emulsificante, lubrificação, capacidade molhante, capacidade de solubilização e dispersão de compostos hidrofóbicos em fases aquosas, além de possuírem baixa ou nenhuma toxicidade, serem biodegradáveis, resistentes a força iônica, pH e temperatura e possuírem especificidade (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013; SILVA et al., 2014; MAO et al., 2015; SANTOS et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Uma variedade de microorganismos são produtores de biomulsificadores; alguns têm maior capacidade de produção, como bactérias e leveduras e, em menor grau, fungos filamentosos. Em relação às leveduras, existe o gênero *Rhodotorula* que tem a capacidade de produzir sophorolipídeos, degradar alcanos de cadeia longa e reduzir a viscosidade dos hidrocarbonetos (CHANDRA e DAS, 2011; KAWAHARA et al., 2013). Nos últimos anos, bioemulsificantes têm sido citados como principais biomoléculas no setor terapêutico e biomédico, bem como na agricultura, produtos farmacológicos, dermatologia, indústrias de

alimentos e cosméticos e biorremediação (ANDRADE et al., 2015; SAHA e RAO, 2017; SATPUTE et al., 2017; MAIA et al., 2018).

Apesar das vantagens, os bioemulsificantes ainda não são competitivos com os seus análogos sintéticos devido ao seu alto custo de produção. Por exemplo, em 2012, o mercado global de surfactantes químicos movimentou cerca de 12 milhões de toneladas do produto em comparação com 3,5 milhões de toneladas de biosurfactantes (CAMPOS et al., 2015). Nesse sentido, o desenvolvimento de processos mais econômicos para a produção de bioemulsificantes tornou-se o ponto chave para redução dos custos e aumento da competitividade. Os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substrato de baixo custo para este fim, estima-se que o mercado de bioemulsificantes crescerá de 2011 a 2018 a uma taxa de 3,5% (SATPUTE et al., 2017).

A escolha de substratos de baixo custo é importante para a economia global de um bioprocessos, uma vez que eles representam cerca de 50% do custo final do produto (RUFINO et al., 2014). Resíduos tais como resíduo de refinaria de óleo de soja (RUFINO et al., 2014) e milhocina (TAIWO et al., 2018) já demonstraram excelentes resultados quando empregados para a produção de bioemulsificantes por micro-organismos.

Devido à procura por substâncias sustentáveis, a produção de biosurfactante vem sendo muito estudada e discutida, sendo proposto como projeto de dissertação a necessidade de maior conhecimento sobre o potencial biotecnológico de fungos, como *Rhodotorula mucilaginosa* na produção de biosurfactantes, além da busca por novas biomoléculas com atividade antimicrobiana, bem como a minimização dos custos empregando como substratos rejeitos agroindustriais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a produção de bioemulsificante por *Rhodotorula mucilaginosa*, utilizando resíduos agroindustriais (milhocina e óleo de soja pós-fritura) como substratos alternativos, visando à redução dos custos e minimização dos descartes dos resíduos agroindustriais.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Produzir bioemulsificante a partir da amostra de *Rhodotorula mucilaginosa*
- Investigar a produção de bioemulsificante utilizando substratos agroindustriais em condições selecionados, através de um planejamento fatorial completo 2²;
- Avaliar o índice de emulsificação e a estabilidade obtidos nos processos realizados;
- Isolar e purificar o bioemulsificante produzido por *R. mucilaginosa*;
- Caracterizar o bioemulsificante através de métodos físicos e químicos;
- Avaliar estatisticamente os resultados obtidos.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Bioeconomia circular

As indústrias de alimentos são responsáveis por gerar toneladas de resíduos compostos de cascas, sementes, caroços e polpa dependendo do tipo de fruta a ser processada, acarretando sérios problemas ambientais devido à produção de lixo orgânico. O Brasil encontra-se em terceiro lugar do rank mundial em produção na área de alimentos. O reaproveitamento de resíduos gerados pela agroindústria que hoje é um dos maiores polos de investimentos, mesmo em países com alto desenvolvimento tecnológico como França e Estados Unidos, tem sido alvo de vários estudos o que contribui para o acúmulo de informações sobre o seu grande potencial e seus valores nutricionais (FILHO; FRANCO, 2015).

Atualmente os resíduos urbanos constituem uma das grandes preocupações em matéria de ambiente, quer em termos da quantidade em que são produzidos, quer em termos da sua diversidade. As indústrias de alimentos são responsáveis por gerar toneladas de resíduos compostos de cascas, sementes, caroços e polpa dependendo do tipo de fruta a ser processada, acarretando sérios problemas ambientais devido à produção de lixo orgânico (FILHO; FRANCO, 2015; MARQUES, 2018).

Estima-se que haja perdas consideráveis de produtos agrícolas nas diversas etapas da cadeia produtiva, desde a produção até o momento de seu consumo, que acarreta elevada geração de resíduos no processamento agroindustrial de produtos animais e vegetais, existindo uma estimativa de que o aproveitamento das matérias-primas vegetais não ultrapasse cerca dos 85% e que os resíduos gerados cheguem a 30%. O reaproveitamento dos resíduos além de contribuir com a preservação ambiental abrange questões econômicas e financeiras (FILHO; FRANCO, 2015).

Resíduos agroindustriais são tratados como subprodutos obtidos a partir do processamento industrial de alimentos (LAUFENBERG et al., 2003) Como a quantidade de resíduos gerados pode chegar a muitas toneladas, agregar valor a este subproduto é de interesse econômico e ambiental, havendo a necessidade da investigação científica e tecnológica que possibilite sua utilização eficiente, econômica e segura (SOUZA et al., 2011).

Sendo assim, surge a necessidade de se realizar propostas que se afastem do tradicional modelo econômico linear de “fazer-uso-descarte”, em favor de um modelo circular e de regeneração que use recursos de maneira inteligente e eficiente. Isso poderia transformar os resíduos em novos produtos com recursos, considerando sua sustentabilidade e circularidade no design de produtos e processos. Uma etapa importante no sistema de bioeconomia

circular é a provisão de um fornecimento renovável, consistente e regular de matérias-primas (SATPUTE et al., 2017).

O potencial de valorização de resíduos através de soluções alternativas mais atraentes, como a extração e recuperação de compostos de alto valor acrescentado e a produção de produtos químicos ganharam muito interesse tanto na opinião científica quanto na opinião pública. Sob esta abordagem, os conceitos de biorrefinaria podem ser um elemento chave para a transição para a economia circular pelo desenvolvimento de processos integrados e multifuncionais para a exploração da biomassa/resíduos para a fabricação de intermediários comercializáveis e produtos finais. Um pré-requisito para o projeto de tais bioprocessos considera a viabilidade econômica em paralelo com sustentabilidade demonstrada pela menor pegada de carbono (THI et al., 2015; MAINA et al., 2017).

Particularmente, a bioeconomia circular dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além da produção de compostos de elevado valor agregado como biossurfactante, bioemulsificantes e diferentes metabólitos (PINTO et al., 2005; SATPUTE et al., 2017).

1.3.2 Resíduos agroindustriais

A escolha de substratos de baixo custo é importante para a economia global de um bioprocessos, uma vez que eles representam cerca de 50% do custo final do produto (RUFINO et al., 2014). Resíduos tais como gordura animal do processamento de carne bovina (SANTOS et al., 2016), resíduo de refinaria de óleo de amendoim (LUNA et al., 2013), óleo de canola residual obtido de restaurante (SILVA et al., 2013), resíduo de refinaria de óleo de soja (RUFINO et al., 2014), glicerol (SILVA et al., 2010), dentre outros, já demonstraram excelentes resultados quando empregados para a produção de bioemulsificantes por micro-organismos.

O óleo de fritura é produzido em grandes quantidades para uso na indústria de alimentos e em escala doméstica. Eles podem atuar como matérias-primas eficazes e baratas para a produção de bioemulsificantes (PEKIN, 2005). Da mesma forma, vários óleos vegetais, tais como óleos de girassol e soja (RAHMAN et al., 2002), têm sido utilizados para a produção de agentes de superfície microbiana. Os resíduos de óleo das refinarias de óleos vegetais e a indústria alimentícia também têm sido utilizados como substratos apropriados para a produção

de bioemulsificantes. Além disso, os resíduos industriais de óleo, como o sebo, o caldo de sabão, os óleos marinhos, a banha e os ácidos graxos livres têm potencial para induzir o crescimento microbiano e levar à produção de metabólitos. Os óleos usados gerados a partir de usos domésticos, refinarias de óleos vegetais ou indústrias de sabão também foram considerados adequados para a produção de bioemulsificantes através da fermentação microbiana (BENINCASA, 2002; BEDNARSKI et al., 2004; NITSCHKE; PASTORE, 2003; SAHARAN et al., 2011).

Os resíduos de óleos e gorduras comestíveis são considerados ótimas fonte de carbono para a produção de biosurfactante, tornando o seu descarte um desperdício de fonte energética contribuindo ainda para a poluição ambiental. Os óleos vegetais são uma fonte de carbono lipídica e são na sua maioria compostos de ácidos graxos saturados ou insaturados com cadeias carbônicas de 16 a 18 átomos (MAKKAR et al., 2011).

Campos, Stamford, Sarubbo (2014) obtiveram rendimento de 21,86 g/L de bioemulsificante por espécies de *Candida* sp. Utilizando 6% de óleo de canola residual com o índice de emulsificação (IE24) de 73%. O bioemulsificante produzido por Rubio-Ribeaux et al. (2016) foi capaz de formar IE24 de 67% utilizando óleo de soja residual como fonte de carbono para *Candida* sp. Souza et al. (2016) atingiu índices de emulsificação de 93,33% e 96,66% utilizando 2% e 8% de óleo de soja pós-fritura, respectivamente com *Candida lipolytica*.

A milhocina é um resíduo agroindustrial gerado a partir da maceração por via úmida do milho para a fabricação da farinha de milho que é comercializada para diferentes setores agroindustriais. Segundo Cardinal e Hedrick (1947) e Akhtar et al. (1997) a milhocina é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para micro-organismos, sendo sua composição geral consistente em 21% a 45% de proteínas, 20% a 26% de ácido láctico, aproximadamente 8% de cinzas (contendo Ca⁺², Mg⁺², K⁺, etc.), 3% de carboidratos e baixo teor de gordura (0,9% - 1,2%) (CARDINAL, HEDRICK, 1947; AKHTAR et al., 1997; SILVA et al., 2014).

O biosurfactante produzido por *Candida sphaerica* UCP0995 utilizando milhocina (9%) e resíduo de refinaria de óleo de soja (9%) conseguiu produzir um rendimento de 9 g/L (LUNA et al., 2011). Sobrinho et al. (2008) também utilizaram a milhocina como substrato de baixo custo para a produção de biosurfactante por *Candida sphaerica*, os resultados obtidos demonstraram que o melhor rendimento (4,5 g/L) em biosurfactante isolado foi obtido em meio de cultivo contendo 2,5% de milhocina e 5% de resíduo de refinaria.

1.3.3 Micro-organismo produtores de bioemulsificante

Nas últimas décadas, diversos micro-organismos têm sido relatados como potenciais

produtores de vários compostos bioativos. Os bioemulsificantes se destacam entre e podem ser obtidos por várias fontes e sintetizados a partir de bactérias, fungos e leveduras. Os bioemulsificantes são moléculas tensoativas anfipáticas que estabilizam as soluções pela formação de microemulsões (ZHAO; SELVA, 2011; RUFINO et al., 2011; SANTOS et al., 2016).

A maioria dos bioemulsificante é liberada no meio de cultura durante a fase estacionária ou na fase final de crescimento exponencial do micro-organismo produtor, sendo um metabólito secundário (RON; ROSENBERG, 2001) Entretanto, com relação à cinética, existem outros diferentes sistemas relatados na literatura, sendo estes: a produção associada ao crescimento, são encontradas relações paralelas entre o crescimento, o uso do substrato e a produção de bioemulsificante (DESAI; BANAT, 1997; SANTOS et al., 2016).

Na literatura, a maior parte dos trabalhos relatam a produção de biossurfactante/bioemulsificante por bactérias, principalmente dos gêneros *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* e *Arthobacter sp.* (VATSA et al., 2010; CHEBBI et al., 2017). Porém, a aplicação da maioria dos bioemulsificantes/biossurfactantes de origem bacteriana possui limitações, pois não é adequada para utilização na indústria alimentícia e farmacêutica, devido a sua possível natureza patogênica (SHEPHERD et al., 1995; FONTES et al., 2008; ELSHIKH et al., 2017).

Também existem, em menor proporção, relatos na literatura da produção de bioemulsificante/biossurfactante (Tabela 1) por algumas leveduras, principalmente dos gêneros *Candida*, *Torulopsis* e *Rhodotorula* (VAN-HAMME et al., 2006; GARAY et al., 2017), e fungos filamentosos como *Aspergillus sp.* e *Phialemonium sp.* (MARTINS et al., 2008; CASTIGLIONI et al., 2009). Porém, os fungos filamentosos, devido ao crescimento mais lento, levam mais tempo para produzir o biossurfactante. Desta forma, as leveduras destacam-se por apresentarem características promissoras para a produção industrial de bioemulsificantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

As leveduras do gênero *Rhodotorulas* têm-se destacado, para utilização nas indústrias em processos fermentativos, principalmente pela sua alta taxa de crescimento em matéria-prima barata. A produção de bioemulsificantes pelas leveduras do gênero *Rhodotorula* são evidenciadas por Alizadeh-Sani et a. (2018). Estudos realizados por Oloke e Glick (2005), utilizando leveduras *Rhodotorula glutinis* demonstrou que o microrganismo produziu bioemulsificante e apresentou níveis de emulsificação significativos em querosene e óleo cru (80%) e também pesquisas relacionadas a remoção de óleo bruto de poluentes, apresentou taxa acima de 76%. Coutinho (2016) produziu um biossurfactante do tipo ramninolípido utilizando óleo de oliva com índice de emulsificação em querosene de 100 %.

Tabela 1. Lista de bioemulsificantes produzidos por leveduras.

Microorganismos	Bioemulsificantes	Referência
<i>Candida tropicalis</i>	Ácido graxo Manano	Miura, 2017
<i>Candida sp.</i>	Bioemulsificante	Rubio -Ribeaux et al., 2016
<i>Candida lipolytica</i>	Bioemulsificante	Souza et al., 2016
<i>Torulopsis petrophilum</i>	Soforolipídios	Cooper e Paddock, 1983
<i>Torulopsis apícola</i>	Soforolipídios	Rau et al., 2001
<i>Pseudozyma rugulosa</i>	Manosileritritol lipídios	Morita et al., 2006
<i>Pseudozyma aphidis</i>	Manosileritritol lipídios	Rau et al., 2005
<i>Kurtzmanomyces sp.</i>	Manosileritritol lipídios	Konishi et al., 2007
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	Complexo de carboidratos proteína-lipídios	Amaral et al., 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Manoproteína	Cameron et al., 1988
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Manoproteína	Lukondeh et al., 2003
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Bioemulsificante polimérico	Oloke e Glick, 2005
<i>Candida lipolytica Y-917</i>	Soforolipídio	Shekhar et al., 2015
<i>Candida utilis</i>	NDA	Shekhar et al., 2015
<i>Candida ingens</i>	Ácido graxo	Amezcu-Vega et al., 2007
<i>Candida lipolytica UCP0988</i>	Complexo de carboidrato proteína-lipídio	Rufino et al., 2007
<i>Candida tropicalis</i>	Liposan	Sarubbo et al., 1999
<i>Candida bombicola</i>	Soforolipídio	Cavalero e Cooper, 2003
<i>Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682</i>	Complexo de carboidratos proteína-lipídeos	Zinjarde e Pant, 2002
<i>Yarrowia lipolytica NCIM 3589</i>	Bioemulsificante	Zinjarde e Pant, 2002
<i>Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682</i>	Yansan	Coelho et al., 2010

Fonte: Adaptado de Alizadeh-Sani et al., 2018.

1.3.4 Emulsificantes

Os emulsificantes são compostos anfipáticos com porções hidrofílicas (porção polar) e hidrofóbicas (porção apolar) que particionam preferencialmente entre interfaces líquidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, tais como interfaces óleo/água ou água/óleo. A porção apolar, insolúvel em água, é frequentemente uma cadeia de hidrocarboneto, enquanto a porção polar, solúvel em água, pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica, conforme ilustrado na Figura 1 (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013; SILVA et al., 2014; MAO et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Figura 1. Molécula de surfactante com porções apolares (hidrofóbicas) e polares (hidrofílicas).

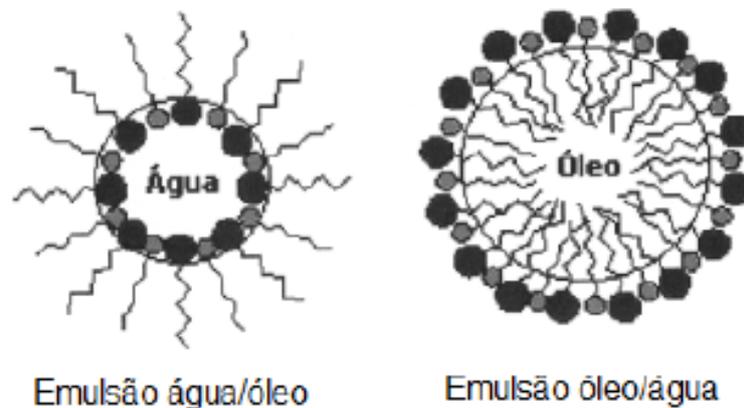


Fonte: SANTOS et al., 2016.

Os emulsificantes possuem um grupo terminal polar que age mutuamente com as moléculas de água e um grupo hidrofóbico que interage com a fase lipídica. A porção hidrofóbica da molécula é geralmente uma cadeia alquila longa, enquanto a hidrofílica consiste em um grupo dissociável ou grupos hidroxilados. Em função dessas características, os emulsificantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo, portanto, que elas se misturem, formando a emulsão. Os emulsificantes não necessitam de reduzir a tensão superficial, o surfactante pode ter atividade de redução da tensão superficial e emulsificação, mas para o emulsionante basta apenas ligar-se a substratos insolúveis em água para formar uma emulsão (SATPUTE et al., 2010; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

A classificação dos emulsificantes é de acordo com a distribuição de suas fases. A Figura 2 demonstra graficamente as fases da emulsão.

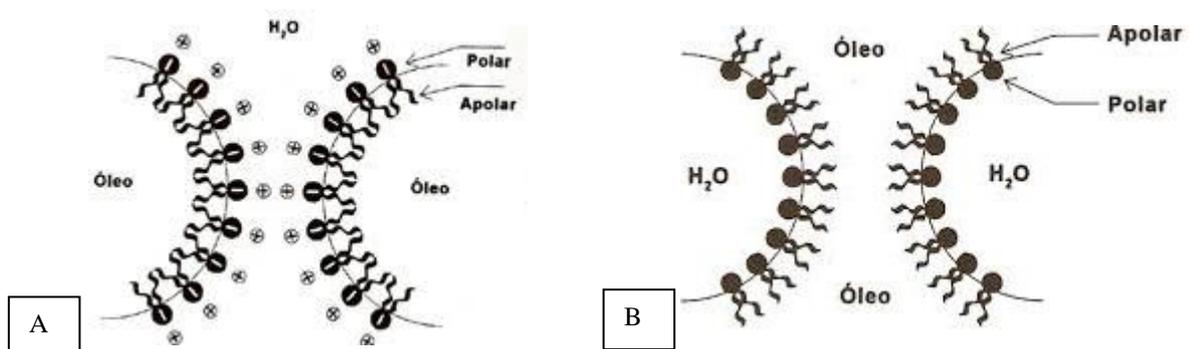
Figura 2. Distribuição do emulsificante entre as interfaces água/óleo e óleo/água, formando emulsão.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2004.

São diferenciados também pela carga. Sendo os emulsificantes iônicos, são responsáveis por estabilizarem emulsões do tipo óleo/água. Na interface, os grupos alquila interagem com as gotículas de óleo, enquanto os grupos finais carregados se projetam para a fase aquosa. O envolvimento de íons contrários forma uma camada dupla, que previne a agregação das gotículas do óleo (Figura 3-A). Os emulsificantes não iônicos são orientados na superfície das gotículas do óleo com a proporção polar projetada para a fase aquosa (Figura 3-B) (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Figura 3. Atividade do emulsificante iônico O/A (A) e atividade do emulsificante não-iônico A/O (B).



Fonte: FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013

Segundo Tadros (2016) as emulsões também podem ser classificadas quanto a sua estrutura:

- (i) Macroemulsões O/A e A/O: geralmente têm uma faixa de tamanho de 0,1-5 μm com uma média de 1-2 μm . Estes sistemas são geralmente opacos ou leitosos devido ao

grande tamanho das gotas e à diferença significativa no índice de refração entre as fases de óleo e água.

- (ii) Nanoemulsões: geralmente têm uma faixa de tamanho de 20 a 100 μm . Como as macroemulsões, elas são apenas cineticamente estáveis. Eles podem ser transparentes, translúcidos ou opacos, dependendo do tamanho da gota, do índice de refração diferente entre as duas fases e da fração volumétrica da fase dispersa.
- (iii) Emulsões duplas e múltiplas: são emulsões-de-emulsões, sistemas A/O/A e O/A/O. Eles geralmente são preparados usando um processo de dois estágios. Por exemplo, uma emulsão múltipla A/O/A é preparada formando uma emulsão A/O, que é então emulsionada em água para formar a emulsão múltipla final.
- (iv) Emulsões mistas: são sistemas que consistem em duas gotículas dispersas diferentes que não se misturam em meio contínuo.
- (v) Emulsões ou microemulsões micelares: estas geralmente têm o tamanho variando de 5 a 50 nm. Eles são termodinamicamente estáveis e estritamente falando eles não devem ser descritos como emulsões. Uma melhor descrição é "micelas inchadas" ou "sistemas micelares".

A relevância econômica dos surfactantes/emulsionantes é demonstrada pelos dados do seu mercado global, que se encontram em expansão e deve chegar a aproximadamente U\$ 39,86 bilhões em 2021, apresentando uma taxa de crescimento anual de 5,4% entre 2016 e 2021 (MARKETS AND MARKETS, 2017). Estes dados reafirmam a importância dessas moléculas, que são essenciais em diferentes setores industriais.

A maioria dos surfactantes/emulsionantes produzidos atualmente é quimicamente derivado de petróleo. No entanto, estes agentes tensoativos sintéticos são geralmente tóxicos e dificilmente degradados por micro-organismos. Eles são, portanto, uma fonte potencial de contaminação e danos para o meio ambiente. Estes perigos associados têm, nos últimos anos, atraído a comunidade científica a buscar alternativas de obtenção de surfactantes mais compatíveis com o meio ambiente, como é o caso da produção microbiana de surfactante/emulsionante (biosurfactante/bioemulsificante) (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

1.3.5 Bioemulsificantes

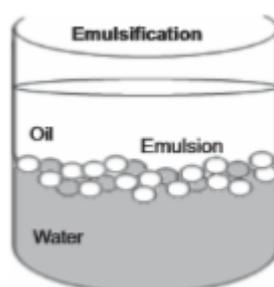
Bioemulsificantes e Biossurfactantes são compostos de superfície ativa que constituem a emulsão secretada por microrganismos para facilitar a captação de um substrato insolúvel, e são moléculas anfipáticas contendo proteínas, polissacarídeos ou lipídeos capazes de estabilizar emulsões de óleo em água. Estes compostos têm vantagens sobre os compostos tensoativos quimicamente sintetizados como: i) menor ou nenhuma toxicidade, evitando a acumulação nos ecossistemas naturais; ii) biodegradabilidade; iii) ampla gama de novas características estruturais; iv) propriedades físicas como baixas tensões interfaciais e concentrações críticas de micelas; vi) Pode ser modificado pela engenharia genética da produção de microrganismos utilizando técnicas biológicas ou bioquímicas; vii) pode ser adaptado para atender a requisitos específicos; e viii) apresentam alta atividades a uma ampla faixa de pH, em temperaturas extremas e altas variações de salinidade (MULLIGAN e GIBBS, 1990; FINNERTY, 1994; DESAI e BANAT, 1997; ROSENBERG e RON, 1997; KARANTH et al., 1999; SHETE et al., 2006; SEKHON-RANDHAWA, 2014; DE et al., 2015).

Os bioemulsificantes são moléculas de alto peso molecular capazes de formar e estabilizar emulsões, mas isso não implica na redução da superfície superficial, como os biossurfactantes, são representados pelos exopolissacarídeos, podendo ser misturas complexas de heteropolissacarídeos e lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas (SEKHON-RANDHAWA, 2014; UZOIGWE et al. 2015). Os biossurfactantes, diferentemente dos bioemulsificantes são representados por compostos de baixo peso molecular, representados por lipopeptídeos, glicolípídeos e entre outros (SMYTH et al., 2010; FRANZETTI et al., 2012).

O interesse sobre bioemulsificante têm aumentado progressivamente devido à sua natureza ecológica, diversidade, possibilidade de produção em larga escala, seletividade, desempenho sob circunstâncias críticas e suas futuras aplicações na fortificação ambiental (DE et al., 2015). Um trabalho recente mostrou que dezessete empresas estão atualmente produzindo biossurfactante/bioemulsificantes em escala industrial em todo o mundo (RANDHAWA e RAHMAN, 2014) e seu volume de mercado global foi estimado em cerca de 476.500 t atingindo US\$ 2,210,5 milhões até 2018 (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2013). Nos últimos anos, os bioemulsificantes têm atraído cada vez mais a atenção da comunidade científica e industrial, suas principais vantagens e propriedades são:

- a) Capacidade de emulsificação: Dispersão de um líquido em outro (como gotículas microscópicas) levando à mistura de dois líquidos imiscíveis (Figura 4). Representa uma solubilização micelar; no entanto, as partículas solubilizadas resultantes são muito maiores (SATPUTE et al., 2010).

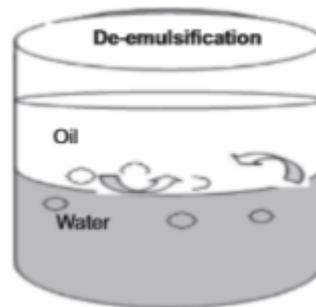
Figura 4. Propriedade de emulsificação dos bioemulsificantes.



Fonte: SATPUTE et al., 2010.

- b) Capacidade de desemulsificação: Este processo quebra as emulsões através da ruptura da superfície estável entre a fase de massa e a fase interna (Figura 5), que é importante nos processos de produção de óleo, onde agentes emulsionantes naturais dificultam os processos de produção (BOSCH e AXCELL, 2005). A de-emulsão é obtida perturbando as condições termodinâmicas na interface. O equipamento utilizado na indústria petrolífera sofre, por conseguinte, principalmente da corrosão, antes do processamento a jusante do óleo, a ação de desemulsificação é importante. Diferentes setores como mineração, alimentos, reprocessamento de combustível nuclear, cosméticos e produtos farmacêuticos dependem dessa propriedade (KOSARIC et al., 1987). As capacidades de desemulsificação da população bacteriana mista foram usualmente testadas utilizando um sistema de emulsão de querosene-água e petróleo-água, em que 96% de desemulsificação foi conseguida. Os produtos de cultura mista exibem alta atividade desemulsificante em comparação com a cultura pura mais eficaz (NADARAJAH, et al., 2002; SATPUTE et al., 2010).

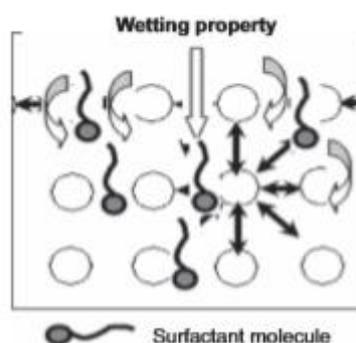
Figura 5. Propriedade de desemulsificação dos bioemulsificantes.



Fonte: SATPUTE et al., 2010.

- c) Capacidade molhante: É o poder de propagação e penetração de uma substância que diminui o SFT, quando adicionado a um líquido. Reduz forças atrativas de moléculas semelhantes e aumenta a atração em direção a superfícies diferentes. Os surfactantes atuam como agentes umectantes ao penetrarem nos poros e fissuras ao invés de conectá-los com o SFT (Figura 6). Um forte agente umectante é considerado pelo aumento na capacidade de espalhar de um líquido sobre uma área de superfície e o abaixamento do anjo de contato de superfícies líquidas para sólidos. Isto é extremamente importante quando se reconstituem pós secos, pérolas secas ou reagentes em dispositivos de fase sólida. As propriedades de umectação, emulsificação e solubilização micelar de surfactantes não-iônicos, como Rokanol L10, Triton X-100 e BS JBR 425, foram investigadas (PASTEWSKI, et al. 2006; SATPUTE et al., 2010).

Figura 6. Propriedade de capacidade molhante dos bioemulsificantes.

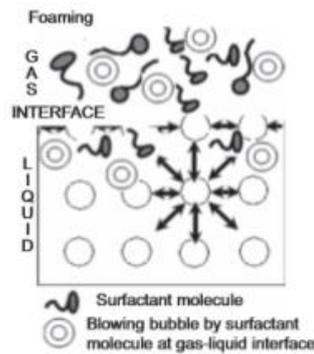


Fonte: SATPUTE et al., 2010.

- d) Capacidade espumante: os surfactantes/emulsificantes se concentram em uma interface gás-líquido que leva à formação de bolhas através do líquido e na interface, resultando na formação de espuma (Figura 7). Técnicas de borbulhamento ajudam a

estudar as propriedades espumantes da surfactina, do dodecil sulfato de sódio (SDS) e da albumina sérica bovina (BSA). A surfactina exhibe excelentes propriedades espumantes quando comparada com a SDS (DUBEY, et al., 2005; SATPUTE et al., 2010).

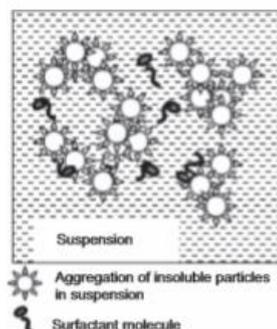
Figura 7. Propriedade de capacidade espumante dos bioemulsificantes.



Fonte: SATPUTE et al., 2010.

- e) Adsorção: Esta propriedade funcional ajuda as moléculas de surfactante a adsorverem-se em substratos hidrofóbicos (Figura 8). Wei, et al. (2005) recuperaram o ramnolípido BS JBR215 da Jeneil BS Company, EUA, usando essa técnica. Mais de 95% do biosurfactante podem ser recuperados com sucesso pela técnica de adsorção. A propriedade de adsorção de um surfactante é um fator importante para melhorar a recuperação de óleo. A adsorção facilita interações fortes de moléculas de superfície ativa com a rocha do que com o óleo e, portanto, pode aumentar a recuperação de óleo das rochas (CURBELO et al., 2007; SATPUTE et al., 2010).

Figura 8. Propriedade de adsorção dos bioemulsificantes.



Fonte: SATPUTE et al., 2010.

- f) Dispersão: Um dispersante é um material que reduz a atração coesiva entre partículas semelhantes. Esta propriedade do emulsificante mantém as partículas insolúveis em suspensão impedindo as partículas insolúveis de se agregarem umas às outras. Essa propriedade também leva à desorção de moléculas hidrofóbicas das superfícies rochosas, aumentando a mobilidade e a recuperação, e tem aplicação na química do campo petrolífero (SATPUTE et al., 2010).
- g) Detergência: A atividade de lavagem e limpeza está associada à detergência. Biosurfactantes e bioemulsificantes agem de maneira semelhante à dos detergentes.
- h) Flocculação: É um processo, onde as gotículas da emulsão se unem para formar um aglomerado que pode ser quebrado por ação mecânica, restaurando a emulsão à sua forma original. Medições de microeletroforese e testes de microscopia óptica são usados para avaliar a flocculação. Um trabalho interessante sobre a flocculação de partículas finas de fluorita pela bactéria *Corynebacterium xerosis* foi relatado por Haas et al. (1999). As células de *C. xerosis* aderem às superfícies de fluorita e promovem a agregação das partículas para obter bandos de alta qualidade (SATPUTE et al., 2010).
- i) Separação de fases: Uma vez que o surfactante é adicionado a líquidos imiscíveis, leva à formação de emulsão. No entanto, após algum período, a gotícula de emulsão de moléculas semelhantes começa a se reunir e se unir, levando à separação das duas fases. Este processo é chamado de separação de fases (SATPUTE et al., 2010).
- j) Redução de viscosidade: Devido à alta viscosidade do óleo cru, ele resiste ao fluxo e se torna muito difícil para o transporte. Óleo cru pesado (alta densidade) contribui com teores significativos de nitrogênio, oxigênio, compostos de enxofre e contaminantes de metais pesados. Essa viscosidade de óleos pesados é reduzida usando surfactantes/emulsificantes para aumentar a mobilidade e facilitar o transporte (SATPUTE et al., 2010).
- k) Solubilização: Os surfactantes aumentam a solubilização do material insolúvel. Em alta concentração de surfactante, estruturas micelares são formadas. Moléculas insolúveis são encapsuladas em uma estrutura micelar e levadas à solução em um nível mais alto. Esta propriedade é importante para formar substâncias insolúveis em água em soluções aquosas, ou substâncias solúveis em água em solventes orgânicos. Biosurfactantes/bioemulsificantes são mais eficazes que os surfactantes sintéticos para solubilizar a mistura de compostos complexos em uma solução aquosa. Perfumo et al. (2010) relataram os papéis de biosurfactantes e bioemulsificantes no acesso a

substratos hidrofóbicos enquanto Wong et al. (2004) também relataram observação semelhante sobre os efeitos de surfactantes sintéticos e biosurfactante/bioemulsificantes (SATPUTE et al., 2010).

- l) Inibição de Corrosão: Os inibidores de corrosão são materiais que protegem contra o desgaste das superfícies dos aparelhos. Silicato de sódio é um inibidor de corrosão que é comumente usado em detergentes e constrói sabão para produtos de lavanderia, máquina de lavar louça para evitar sob corrosão de depósito sólido. Li e Mu (2005) investigaram um surfactante não-iônico Tween-40 e relataram um nível satisfatório de inibição da corrosão do aço laminado a frio em ácido sulfúrico 0,5–7,0 M, detectado pelos métodos de perda de peso e polarização potenciodinâmica (SATPUTE et al., 2010).
- m) Temperatura, pH e tolerância à força iônica: Os surfactantes/emulsificantes são estáveis em várias temperaturas e pH. A liquenisina obtida de *B. licheniformis* JF-2 é estável até 50 °C, pH de 4,5 a 9,0 e em NaCl (50 g/L) e concentrações de Ca (25 g/L) (MCINERNEY, et al., 1990). Similarmente, o lipopéptido de *B. subtilis* LB5a é altamente estável a 121 °C/20 min e mesmo após 6 meses foi considerado estável a -18 °C. A atividade superficial deste lipopeptídeo permanece inalterada na faixa de pH de 5-11 e NaCl (20%). Outro biosurfactante produzido por *Arthrobacter protophormiae* foi observado como sendo termoestável (30-100°C) e pH (2 a 12) estável. Como os procedimentos industriais incluem extremos de temperatura, pH e peso, é importante separar novos itens microbianos que estejam prontos para funcionar nessas condições (NITSCHKE e PASTORE, 2006; DAS; MUKHERJEE, 2007; SATPUTE et al., 2010 ROY, 2017).
- n) Biodegradabilidade: Os compostos derivados microbianos podem ser facilmente degradados quando comparados aos surfactantes sintéticos e apropriados para aplicações naturais como a biorremediação/biossorção (DESAI; BANAT, 1997; EDWARDS; HAYASHI, 1965; ROY, 2017). A crescente preocupação ecológica nos obriga a procurar itens eletivos, por exemplo, biosurfactantes (GAUTAM; TYAGI, 2006; ROY, 2017). Surfactantes químicos sintéticos impõem questões ecológicas e, assim, biosurfactante biodegradáveis de microorganismos marinhos foram utilizados para a biossorção de hidrocarbonetos policíclicos ineficientes e solventes, fenantreno contaminado em superfícies aquáticas (GHARAEI-FATHABAD, 2011; ROY, 2017).
- o) Baixa toxicidade: Embora não haja muitas obras escritas acessíveis em relação à qualidade venenosa dos biosurfactantes, elas são em geral consideradas itens baixos

ou não prejudiciais e adequadas para os empregos farmacêuticos, corretivos e de sustento. Poremba et al. mostrou que a maior toxicidade do surfactante derivado de produtos químicos que apresentou uma CL50 contra o *Photobacterium phosphoreum* e foi 10 vezes menor do que a dos ramnolipídeos. O perfil de baixa toxicidade do biossurfactante, soforolipídeos da *Candida bombicola*, os tornou úteis em empreendimentos nutricionais (HATHA et al., 2007; ROY, 2017).

- p) Utilização de substratos alternativos na produção por via fermentativa: Os biossurfactantes podem ser produzidos a partir de substratos renováveis e resíduos agroindustriais (soro de leite, água de maceração de milho, manipueira). A utilização dessas matérias-primas como alternativa a meio de cultura sintético encoraja ações de gerenciamento ambiental (MULLIGAN et al., 2014; FELIPE; DIAS, 2017).

1.3.6 Fatores que afetam a produção de bioemulsificante

A produção de bioemulsificante não depende apenas da linhagem produtora, mas também das condições de cultivo. Assim, muitos parâmetros afetam não apenas a quantidade de bioemulsificante, mas também o tipo de produto produzido (SALIHU et al., 2009; DE et al., 2015).

1.3.6.1 Fatores Ambientais

Para ter uma grande quantidade de bioemulsificantes, é sempre essencial otimizar o bioprocessamento, pois o produto pode ser influenciado por mudanças no pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação.

pH: O efeito do pH em relação à produção de bioemulsificante por *Candida antarctica* foi estudado utilizando-se tampão fosfato em diferentes pHs (4-8). Todos os tampões utilizados resultaram em uma diminuição do rendimento da produção do biossurfactante, quando comparados com a água destilada (KITAMOTO et al., 2001; FONTES et al., 2008). Zinjarde e Pant (2002) estudaram a influência do pH inicial na produção do biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*. Observaram que a maior produção foi obtida em pH inicial igual a 8,0, que corresponde ao pH natural da água do mar (FONTES et al., 2008).

Temperatura: Vários processos microbianos para a produção de bioemulsificante dependem da temperatura e são afetados por uma pequena mudança. A maioria das produções de

bioemulsificantes relatadas até agora foram realizadas no intervalo de temperatura de 25 a 30°C (DESAI; BANAT, 1997; DE et al., 2015).

Aeração e agitação: são dois fatores importantes que influenciam na produção de bioemulsificante, pois facilitam a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa. Adamczak e Bednarsk (2000) avaliaram a influência da aeração na síntese de biosurfactante por *Candida antarctica*. A maior produção de bioemulsificante (45,5 g/L) foi alcançada quando a levedura foi cultivada em meio com uma taxa de aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por min) e a concentração de oxigênio dissolvido controlada em 50% do valor da saturação. Entretanto, quando se alterou a aeração para 2 vvm, houve uma produção intensa de espuma e a produção de bioemulsificante decaiu 84%. A formação de espuma não é um fator desejado na produção, uma vez que retira do meio reacional parte do bioemulsificante, biomassa e lipídeos (SCHIMIDELL, 2001; FONTES et al., 2008).

1.3.6.2 Fatores Nutricionais

O tipo, qualidade e quantidade de bioemulsificante produzido são afetados e influenciados por diversos fatores nutricionais.

a) Fonte de Carbono:

A influência da fonte de carbono na produção de bioemulsificante por diferentes cepas de microorganismos tem sido bastante estudada. A literatura aponta uma ampla diversidade entre as fontes de carbono. Pareilleux (1979) isolou compostos emulsificantes a partir da levedura *Candida lipolytica* em meio contendo n-alcanos como fonte de carbono, mas quando foi cultivada em meio contendo glicose a levedura não produziu nenhum bioemulsificante. Em um estudo similar, Zinjarde e Pant (2002) mostraram que a biossíntese de emulsificante por *Y. lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fonte de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool) não é viabilizada. Entretanto, em meio contendo óleo cru e alcanos (C10 - C18) detectou-se a produção de bioemulsificante (FONTES et al., 2008).

Os bioemulsificantes são incapazes de competir de forma barata com compostos quimicamente sintetizados, devido aos seus elevados custos de produção e sistema de recuperação. Estes custos podem ser significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes. Sarubbo et al. (2001) identificou pela primeira vez um bioemulsificante produzido por *Y. lipolytica* IA 1055 usando glicose como fonte de carbono e concluiu que a indução da produção de biosurfactante não é dependente da presença de hidrocarbonetos (SAHARAN et al., 2011).

Cavalero e Cooper (2003) mostraram que o rendimento de sofrorolípídeo de *Candida bombicola* ATCC 22214 aumenta com o comprimento da cadeia de n-alcano (de C12 a C15). Isso indicou que diferentes micróbios respondem de maneira diferente às fontes de carbono. O melão de soja, um subproduto da produção de óleo de soja, mais ácido oleico foram testados como fontes de carbono para a produção de sofrorolípídios pela levedura *Candida bombicola*. Os SLs purificados foram obtidos a 21 g/L e foram 97% em forma de lactona (FONTES et al., 2008).

b) Fonte de nitrogênio

O nitrogênio é necessário para o crescimento microbiano, pois as sínteses de proteínas e enzimas dependem dele. Portanto, o nitrogênio é importante no meio de produção de biossurfactante. Vários compostos de nitrogênio, como extrato de levedura, nitrato de amônio, sulfato de amônio, peptona de ureia, nitrato de sódio, extratos de carne e malte têm sido utilizados para a produção de bioemulsificantes. Verificou-se que o extrato de levedura é a fonte de nitrogênio mais utilizada na produção de bioemulsificante (DE et al., 2015).

Durante a produção de bioemulsificante pela levedura *Rhodotorula glutinis* IIP30, o uso de nitrato de potássio dá melhores rendimentos em comparação com outras fontes de nitrogênio, como o sulfato de amônio ou ureia. Lukondeh et al. (2003) investigaram a produção de bioemulsificante por *K. marxianus* FII 510700 utilizando extrato de levedura (2 g/L) e sulfato de amônio (5 g/L) como fontes de nitrogênio (FONTES et al., 2008).

c) Concentração de íons metálicos

As concentrações de íons metálicos desempenham um papel muito importante na produção de alguns bioemulsificantes, pois formam cofatores importantes de muitas enzimas. A superprodução de biossurfactante de surfactina ocorre na presença de Fe^{2+} em meio de sal mineral. As propriedades da surfactina são modificadas na presença de cátions inorgânicos, como superprodução (SAHARAN et al., 2011).

1.3.7 Aplicações dos bioemulsificantes

Os bioemulsificantes estão ganhando muito ritmo com relação ao seu uso em escala comercial. Não só encontraram aplicação em indústrias como a lavanderia, a biorremediação, a recuperação de petróleo, mas também são usadas para fins terapêuticos. Novas tendências em suas aplicações mostraram seu uso para combater o efeito de gases de efeito estufa. Dada a seguir são algumas das aplicações de bioemulsificante (MIR et al., 2017).

1.3.7.1 Biorremediação

O termo biorremediação refere-se ao fenômeno em que as atividades metabólicas dos microorganismos são utilizadas para remover poluentes. A biorremediação, além de ocorrer naturalmente, pode ser ativada pela adição de certos compostos bioativos produzidos por vários microorganismos. Os biorremédios são os microorganismos que podem ser usados para a biorremediação. A biorremediação pode ser classificada principalmente em duas: in situ ou ex situ. Durante a biorremediação in situ, o material contaminado é tratado no próprio local, enquanto no procedimento ex situ a remoção do material contaminado é feita em outro local e não no próprio local de coleta (MIR et al., 2017).

A biorremediação in situ reduz, assim, a exposição ao risco para o pessoal de limpeza e a exposição potencialmente mais ampla como resultado de acidentes de transporte. Além disso, este processo tem um impacto mínimo no ambiente, uma vez que quase nenhum produto residual é acumulado devido à completa degradação dos contaminantes por micróbios capazes de produzir compostos bioativos, e bioemulsificantes. Essas características tornam as técnicas de biorremediação potencialmente ideais para a desintoxicação de poluentes químicos. Micróbios que produzem os bioemulsificantes e outros compostos bioativos que são capazes de degradar os contaminantes, são encontrados em maior número quando o contaminante está presente. No entanto, quando o contaminante é degradado, a população de microorganismos diminui. Após o tratamento, os resíduos deixados para trás são geralmente subprodutos inofensivos como dióxido de carbono, água e biomassa celular (KUMAR et al., 2011).

1.3.7.2 Bioemulsificantes na indústria de óleo

Os bioemulsificantes são usados para aumentar a recuperação de óleo devido ao uso potencial na indústria do petróleo com pureza e especificação mínimas, para que o caldo celular inteiro possa ser usado. Em comparação com os surfactantes químicos, eles são muito seletivos e necessários em pequenas quantidades e são eficazes sob ampla faixa de condições de óleo e reservatório. Eles estão envolvidos em um número infinito de diferentes processos industriais e fenômeno físico-químico aumentando a mobilidade, aumentando a solubilidade, lubrificação, remoção de solo ou limpeza (PEI et al. 2009; LAI et al. 2009).

Bacillus licheniformis JF 2 foi isolado a partir de água de injeção em campo de petróleo, que foi um dos mais eficientes bioemulsificantes anaeróbios, halotolerantes e termotolerantes (DESAI e BANAT, 1997). Makkar e Cameotra (1997) observaram uma boa recuperação do óleo de areia usando as cepas de *Bacillus subtilis* a 45 °C. Eles utilizam o melão barato fonte

de aditivo nutriente. O bioemulsificante produzido por duas estirpes de *Bacillus subtilis* (MTCC1427 e MTCC2423) representou 56% e 62% de óleo recuperado a partir de uma coluna de areia saturada com óleo. *Bacillus subtilis* é hermotolerante e estável em uma ampla gama de pH (4,5-10,5), o que torna essas cepas adequadas para a recuperação microbiana de óleo aprimorada in situ (SUDHANSHU et al., 2014).

1.3.7.3 Recuperação Microbiana de Petróleo Aprimorado (MEOR)

A adição de bioemulsificantes reduz a superfície, bem como as tensões interfaciais do óleo, o que ajuda a facilitar o fluxo de óleo e, assim, facilita as operações de recuperação (KOSARIC, 1992). Este método também é conhecido como Recuperação Microbiana de Petróleo Aprimorado (MEOR) (MIR et al., 2017).

Os bioemulsificantes utilizados poderiam reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a superfície da rocha ou da água, o que resultaria na emulsificação e, por sua vez, melhoraria o deslocamento da incrustação dos poros e alteraria a molhabilidade, tornando o processo de recuperação mais eficiente. De acordo com uma avaliação estatística realizada nos EUA em 1995, 81% de todos os projetos MEOR mostraram um aumento positivo na produção de petróleo, sem resultados adversos ou qualquer diminuição da produção de petróleo. Esse processo é economicamente viável, pois o processo precisa apenas de pequenas modificações nas instalações já existentes. A instalação do processo é menos dispendiosa e fácil de aplicar (MIR et al., 2017).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, O.W.ł. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 4, p. 313-316, 2000.
- AKHTAR, M. et al., Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. **Tappi journal**, v. 80, n. 6, p. 161-164, 1997.
- ALIZADEH-SANI, M. et al. Bioemulsifiers Derived from Microorganisms: Applications in the Drug and Food Industry. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 8, n. 2, p. 191, 2018.
- ALMEIDA, D. G. et al. Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1-14, 2016.
- AMARAL, P.F. et al. Biosurfactants from yeasts: Characteristics, production and application. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 672, p. 236-249, 2010.
- AMEZCUA-VEJA, C. et al. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresour. Technol.**, v. 98, n. 1, p. 237-240, 2007.
- ANDRADE, R.F.S. et al. Enhanced Production of an Glycolipid Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP/WFCC1556 for Application in Dispersion and Removal of Petroderivatives. **Int. J. Curr. Microbiol.**, v. 4, p. 563–576, 2015.
- BEDNARSKI, W. et al. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource technology**, v. 95, n. 1, p. 15-18, 2004.
- BENINCASA, M. et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 4, p. 283-288, 2002.
- BODOUR, A. A.; MAIER R. M. Biosurfactants: types, screening methods and applications. **Encyclopedia of Environmental Microbiology**, v. 2, p. 750-770, 2001.
- BOSCH, R.; AXCELL, E. Produced-water chemical treatments enable environmental compliance. **World Oil**, v. 226, n. 10, p. 75–80, 2005.
- CAMERON, D.R.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Production of a Bioemulsifier with Potential Application in the Food Industry. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3234-3252, 2014.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, TLM; SARUBBO, L. A. Utilização de biossurfactante como substituto aos emulsificantes sintéticos em maioneses. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 4948-4955, 2015.

CARDINAL, E. V.; HEDRICK, L. R. Microbiological assay of cornsteep liquor for amino acid content. **Journal of Biological Chemistry**, v. 17, p. 4904-4914, 2012.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Solid-state biosurfactant production by *Aspergillus fumigatus* using agricultural residues as substrate. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 292-295, 2009.

CAVALERO, D.A.; COOPER, D.G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **J. Biotechnol.**, v. 103, n. 1, p. 31-41, 2003.

CHANDRAN, Preethy; DAS, Nilanjana. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **International journal of science and nature**, v. 2, n. 1, p. 63-71, 2011.

CHEBBI, A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas sp.* strain from used motor oil-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 122, p. 128-140, 2017.

COELHO, M.; AMARAL, P.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: An industrial workhorse. **Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.**, v. 2, p. 930-940, 2010.

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, n. 6, p. 1426-1429, 1983.

CURBELO, F.D.S. et al. Adsorption of nonionic surfactants in sandstones. **Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 293, n. 1–3, p. 1–4, 2007.

DE, S. et al. A review on natural surfactants. **RSC advances**, v. 5, n. 81, p. 65757-65767, 2015.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource technology**, v. 98, n. 7, p. 1339-1345, 2007.

DESAI, Jitendra D.; BANAT, Ibrahim M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DUBEY, K.V.; JUWARKAR, A.A.; SINGH, S.K. Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 860–867, 2005.

EDWARDS JR, HAYASHI JA. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. **Arch Biochem Biophys**, v. 111, p. 415–421, 1965.

ELSHIKH, M. et al. Rhamnolipids from non-pathogenic Burkholderia thailandensis E264: physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New biotechnology**, v. 36, p. 26-36, 2017.

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

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Nº 25 – 2013. Disponível em: <http://www.revistafi.com/materias/324.pdf> . Acesso em: 04/12/2018.

FINNERTY, W. R. Biosurfactants in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 291-295, 1994.

FRANZETTI, A. et al. Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovorax paradoxus* 7bCT5. **Bioresource technology**, v. 108, p. 245-251, 2012.

GARAY, L. A. et al. Discovery of synthesis and secretion of polyol esters of fatty acids by four basidiomycetous yeast species in the order Sporidiobolales. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 923-936, 2017.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155-166, 2006.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. **Am. J. Drug. Discov. Dev.**, v. 1, n. 1, p. 58-69, 2011.

HAAS, S.R. Flocculation of fine fluorite particles with *Corynebacterium xerosis*. **Revista de Microbiol.**, v. 30, p. 225–230, 1999.

HATHA, A. A. M.; EDWARD, G.; PATTANATHU RAHMAN, K. S. M. Microbial biosurfactants–review. **Mar. Atmos. Res.**, v. 3, n. 2, p. 1-17, 2007.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, p. 116-126, 1999.

KAWAHARA, H. et al. Stabilization of astaxanthin by a novel biosurfactant produced by *Rhodotorula mucilaginosa* KUGPP-1. **Biocontrol Sci**, v. 18, p. 21–28, 2013.

KITAMOTO, D. et al. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. **Biotechnology letters**, v. 23, n. 20, p. 1709-1714, 2001.

KONISHI, M. et al. Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by the newly isolated yeast strains belonging to the genus *Pseudozyma*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 75, n. 3, p. 521, 2007.

KOSARIC, N.; GRAY, N.C.C.; CAIRNS, W.L. Biotechnology and the surfactant industry: biosurfactants and biotechnology. **Surfactant Science Series**, v. 25, p. 1–20, 1987.

KUMAR, C. G.; MAMIDYALA, S. K. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 462-466, 2011.

LAI, C. C. et al. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1-3, p. 609-614, 2009.

LI, X.; UM, G. Tween - 40 as corrosion inhibitor for cold rolled steel in sulphuric acid: Weight loss study, electrochemical characterization and AFM. **Appl. Surface Sci.**, v. 252, p. 1254–1265, 2005.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J.; ROGERS, P.L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* fii 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **J Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, n. 12, p. 715-720, 2003.

LUNA, J. M. et al. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

LUNA, J. M. et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Current microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1527-1534, 2011.

MAIA, P. et al. An Efficient Bioemulsifier-Producing *Bacillus subtilis* UCP 0146 Isolated from Mangrove Sediments. **Colloids and Interfaces**, v. 2, n. 4, p. 58, 2018.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on use of unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

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

MANIVASAGAN, P. et al. Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, *Streptomyces sp.* MAB36. **Bioprocess Biosyst.**, v. 37, p. 783–797, 2014.

MAO, X. et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **J. Hazard. Mater.**, v. 285, p. 419-435, 2015.

MARKETS AND MARKETS. Surfactants Market by Type (Anionic, Non-Ionic, Cationic and Amphoteric), Substrate (Synthetic and Bio-based), Application (Detergents, Personal Care, Textile, Elastomers & Plastics, Crop Protection, Food & Beverage) – Global Forecast to 2021. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/surfactants.asp>. **Acesso em: 07 dez 2018.**

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V.. Lipases and biosurfactant production by solid state fermentation for utilization in bioremediation of vegetable oils and hydrocarbons. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.

MCINERNEY, M.J.; JAVAHERI, M.; NAGLE, D.P.Jr. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. **J Ind. Microbiol.**, v. 5, p. 95–101, 1990.

MIR, S. et al. Microbial Surface Tensio-active Compounds: Production and Industrial Application Perspectives: A Review. **Int J Biotech & Bioeng**, v. 3, n. 8, p. 282-301, 2017.

MIURA, Y. Mechanism of liquid hydrocarbon uptake by microorganisms and growth kinetics. **Adv Biochem Eng.**, v. 9, p. 31-56, 2017.

MORITA, T. Discovery of *Pseudozyma rugulosa* nbrc 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rdna sequence. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 73, n. 2, p. 305, 2006.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 47, p. 23–29, 1990.

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. Biosurfactants. Research Trends and Applications. **Boca Raton: CRC Press**, Taylor&Francis Group, 2014.

NADARAJAH, N.; SINGH, A.; OWEN, P. Ward Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 18, p. 435–440, 2002.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Biotechnology for Fuels and Chemicals**, p. 295-301, 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresour Technol.**, v. 97, p. 336–341, 2006.

OLIVEIRA, A. G. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

- OLOKE, J. K.; GLICK, B. R. Production of bioemulsifier by an unusual isolate of salmon/red melanin containing *Rhodotorula glutinis*. **Afr. J. Biotechnol.**, [s.l.], v. 4, p. 164-171, 2005.
- PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant; effects on respiratory activity and growth. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 8, n. 1-2, p. 91-101, 1979.
- PASTEWSKI, S.; HALLMANN, E.; MEDRZYCKA, K. Physicochemical aspects of the application of surfactants and biosurfactants in soil remediation. **Environ. Eng. Sci.**, v. 23, n. 4, p. 579–588, 2006.
- PEI, X.H. et al. Effect of biosurfactant on the sorption of phenanthrene onto original and H₂O₂-treated soils. **J Environ Sci**, v. 21, p. 1378-1385, 2009.
- PEKIN, G.; VARDAR-SUKAN, F.; KOSARIC, N. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 4, p. 357-362, 2005.
- PERFUMO, A. et al. Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1501-1512, 2010.
- RAHMAN, K. S. M. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology progress**, v. 18, n. 6, p. 1277-1281, 2002.
- RANDHAWA, S.K.K.; RAHMAN, P.K.S.M. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 454, 2014.
- RAU, U. et al. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 66, n. 5, p. 551, 2005.
- RAU, U. et al. Sophorolipids: A source for novel compounds. **Ind. Crop. Prod.**, v.13, n. 2, p. 85-92, 2001.
- RIVERA, O.M.P. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1010-1020, 2007.
- RON, E.Z., ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. **Current opinion in biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 313-316, 1997.
- ROSA, O. N. D. et al. Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 6, p. 859-869, 2018.

ROY, A. Biosurfactant Producing Microbe Isolation and Effect of Different pH on its Growth. **Res. Ver. Biosci.**, v. 12, n. 3, p. 135, 2017.

RUBIO-RIBEAUX, D. et al. Biotechnological production of biosurfactant in economic medium by *Candida sp.* and evaluation of biodegradation potential of petro derivatives. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 321-325, 2016.

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, p. 34-38, 2014.

RUFINO, R., SARUBBO, L., CAMPOS-TAKAKI, G. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World J. Microb. Biot.**, v. 23, n. 5, p. 729-734, 2007.

SAHA, P.; RAO, K.V. Biosurfactants—A Current Perspective on Production and Applications. **Nat. Environ. Pollut. Technol.**, v. 16, p. 181–188, 2017.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, n. 1, p. 1-14, 2011.

SALIHU, A.; ABDULKADIR, I.; ALMUSTAPHA, M. N. An investigation for potential development on biosurfactants. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 4, n. 5, p. 111-117, 2009.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **Internacional journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SARUBBO, L., PORTO, A., CAMPOS-TAKAKI, G. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Can. J. Microbiol.**, v. 45, n. 5, p. 423-426, 1999.

SARUBBO, L.A.; MARCAL, M.C.; NEVES, M.L.C. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 95, p. 59-67, 2001.

SATPUTE, S. K. et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 4, p. 436-450, 2010.

SATPUTE, S.K.; PŁAZA, G.A.; BANPURKAR, A.G. Management Systems in Production Engineering biosurfactants production from renewable natural resources: Example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. **Manag. Syst. Product. Eng.**, v. 25, p. 46–54, 2017.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. Em *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*; Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzami, W., eds.; Edgard Blucher Ltda: São Paulo, 2001, cap 14.

SEKHON-RANDHAWA, K. K. Biosurfactants produced by genetically manipulated microorganisms: challenges and opportunities. **Biosurfactants**, ed. N. Kosaric and FV Sukan, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 49-67, 2014.

SHEKHAR, S., SUNDARAMANICKAM, A., BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review. **Crit. Ver. Environ. Sci. Technol.**, v. 45, n. 14, p. 1522-1554, 2015.

SHEPHERD, R. et al. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 207-217, 1995.

SHETE, A.M. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review. **J Sci. Ind. Res.**, v. 65, p. 91–115, 2006.

SILVA, E.J. et al. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloids Surface and B Biointerfaces**, v. 117, p. 36–41, 2014.

SILVA, R. C. F. S. Enhancement of biosurfactant production from *Pseudomonas cepacia* CCT6659 through optimisation of nutritional parameters using response surface methodology, **Tenside Surfactans Deterg**, v. 50, p. 137-142, 2013.

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

SMYTH, T. J. P. et al. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, p. 3705-3723, 2010.

SOBRINHO, H. B. S. et al. Utilization of two agroindustrial by products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917, 2008.

SOUZA, A. F. et al. Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1608, 2016.

SOUZA, K. S. T. et al. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in biorremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 346, p. 152-158, 2018.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 108, p. 303-318, 2004.

TAIWO, A. E., OJUMU, T. V., MADZIMBAMUTO, T. Statistical Optimization of Acetoin Production Using Corn Steep Liquor as a Low-Cost Nitrogen Source by *Bacillus Subtilis* CICC 10025. **IntechOpen**, 2018.

Transparency Market Research. (2013). Specialty Surfactants Market and BioSurfactants Market: Global Scenario, Raw Material and Consumption Trends, Industry Analysis, Size, Share and Forecast 2010–2018. <http://www.transparencymarketresearch.com/specialty-andbiosurfactants-market.html> **Acesso em 06 dezembro, 2018.**

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1–6, 2015.

VAN-HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 6, p. 604-620, 2006.

VATSA, P. et al. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *International journal of molecular sciences*, v. 11, n. 12, p. 5095-5108, 2010.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Res. J. Microbiol.**, v. 10, p. 181-192, 2015.

WEI, Q.F.; MATHER, R.R.; FOTHERINGHAM, A.F. Oil removal from used sorbents using a biosurfactant. **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 331–334, 2005.

WONG, J.W. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. **J Environ. Qual.**, v. 33, p. 2015–2025, 2004.

ZAMBRY, N.S. et al. Production and partial characterization of biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. R1. **Bioprocess Biosyst**, v. 40, p. 1007–1016, 2017.

ZHAO, Y. et al. Characterization and application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. **J Basic Microbiol**, v. 56, p. 184–195, 2016.

ZINJARDE, S.S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **J. Basic. Microbiol.**, v. 42, n.1, p. 67-73, 2002.

CAPÍTULO II

Produção de bioemulsificante por *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 através da bioeconomia circular utilizando substratos agroindustriais

Trabalho submetido para ser publicado na revista: **Journal of Biotechnology**

RESUMO

Neste trabalho, foram realizados estudos com *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551, investigando o potencial de produção de bioemulsificante, utilizando como substrato óleo de soja após fritura e milhocina. A cultura foi realizada em Erlenmeyers contendo 100 mL de base salina e substratos segundo o esquema fatorial completo 2², contendo 10% de inoculo numa concentração de 10⁸ células/ml, a 28°C, sob agitação de 150 rpm por 96 h. As características bioemulsificantes avaliadas foram IE24, tamanho das gotas, viscosidade, estabilidade frente ao pH, NaCl e temperatura, CMC, carga iônica e molhabilidade. Os resultados mostraram que o bioemulsificante de caráter aniônico apresentou 95,65% IE24 para óleo de motor na melhor condição (2,5% de milhocina e 1% de óleo de soja pós-fritura), apresentando emulsão estável em relação ao IE24 nas concentrações de NaCl% -12 %. Em relação ao pH e temperatura, um IE24 observado foi de 100%. A melhor condição do IE24 reduziu a viscosidade do óleo do motor de 170 cP para 115,7 cP por 96 horas. A CMC foi de 2,5%. E a caracterização bioquímica mostrou que o bioemulsificante possui: proteínas 6,69%, carboidratos 14,65% e lipídios 78,66%, *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou a capacidade de produzir bioemulsificadores utilizando a conversão metabólica do resíduo agroindustrial e grande potencial em aplicações biotecnológicas.

Palavras-Chave: Levedura, Resíduos, Valorização.

ABSTRACT

In this work, studies were carried out with *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551, investigating the potential of bioemulsifier production, using as soybean oil substrate after frying and cornmeal. The culture was carried out in Erlenmeyers containing 100 mL of saline and substrates according to the complete factorial scheme 22 containing 10% of inoculum at a concentration of 10^8 cell/ ml at 28°C under agitation of 150 rpm for 96 h. The bioemulsifying characteristics evaluated were IE24, droplet size, viscosity, stability against pH, NaCl and temperature, CMC, ionic charge and wettability. The results showed that the anionic bioemulsifier presented 95.65% IE24 for motor oil in the best condition (2.5% cornmeal and 1% post-fry soybean oil), presenting a stable emulsion in relation to IE24 in the 0-12% NaCl concentrations. Regarding pH and temperature, an observed IE24 was 100%. The best IE24 condition reduced the engine oil viscosity from 170 cP to 115.7 cP for 96 hours. The CMC was 2.5%. The biochemical characterization showed that the bioemulsifier had: proteins 6.69%, carbohydrates 14.65% and lipids 78.66%, *Rhodotorula mucilaginosa* presented the capacity to produce bioemulsifiers using the metabolic conversion of agroindustrial residue and great potential in biotechnological applications.

Keywords: yeast, waste, appreciation

1. INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos são responsáveis por gerar toneladas de resíduos agroindustriais, acarretando sérios problemas ambientais devido à produção de lixo orgânico. O Brasil encontra-se em terceiro lugar do rank mundial em produção na área de alimentos. O reaproveitamento de resíduos gerados pela agroindústria que hoje é um dos maiores polos de investimentos tem sido alvo de vários estudos o que contribui para o acúmulo de informações sobre o seu grande potencial e seus valores nutricionais (FILHO; FRANCO, 2015).

Particularmente, a bioeconomia circular dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além da produção de compostos de elevado valor agregado como biossurfactante, bioemulsificantes e diferentes metabólitos (PINTO et al., 2005; SATPUTE et al., 2017).

Bioemulsificantes são compostos anfipáticos com porções hidrofílicas (porção polar) e hidrofóbicas (porção apolar) que particionam preferencialmente entre interfaces líquidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, tais como interfaces óleo/água ou água/óleo. Esses compostos possuem propriedades como: detergência, atividade emulsificante, lubrificação, capacidade molhante, além de possuírem baixa ou nenhuma toxicidade, serem biodegradáveis, resistentes a força iônica, pH e temperatura e possuírem especificidade (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013; SILVA et al., 2014; MAO et al., 2015; SANTOS et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Uma variedade de microorganismos são produtores de biomulsificadores; alguns têm maior capacidade de produção, como bactérias e leveduras e, em menor grau, fungos filamentosos. Em relação às leveduras, existe o gênero *Rhodotorula* que tem a capacidade de produzir sophorolipídeos, degradar alcanos de cadeia longa e reduzir a viscosidade dos hidrocarbonetos (CHANDRA e DAS, 2011; KAWAHARA et al., 2013).

Apesar das vantagens, os bioemulsificantes ainda não são competitivos com os seus análogos sintéticos devido ao seu alto custo de produção. A escolha de substratos de baixo custo é importante para a economia global de um bioprocessamento, uma vez que eles representam cerca de 50% do custo final do produto (RUFINO et al., 2014). Resíduos tais como resíduo de refinaria de óleo de soja (RUFINO et al., 2014) e milhocina (TAIWO et al., 2018) já demonstraram excelentes resultados quando empregados para a produção de bioemulsificantes por micro-organismos.

O objetivo principal deste trabalho foi utilizar *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 para produzir um bioemulsificante aplicando uma metodologia ecologicamente correta que utiliza óleo de soja pós-fritura e milhocina como substrato, a fim de melhorar nossa compreensão da estabilidade das propriedades da emulsão e da aplicabilidade desta biomolécula.

2. METODOLOGIA

2.1 Micro-organismo

Rhodotorula mucilaginosa UCP 1551 isolada de solos preservados da Caatinga de Pernambuco, pertencente a Coleção de Cultura da Universidade Católica de Pernambuco (UCP) e registrada no World Federation for Culture Collection (WFCC). A cultura foi mantida em Ágar Malte de Levedura (3,0 g/L extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte, 5 g/L peptona, 10 g/L glicose e 20 g/L ágar) a temperatura de 5°C e transferida para o caldo de malte de levedura (3,0 g/L extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte, 5 g/L peptona e 10 g/L glicose).

2.2 Substratos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais utilizados foram a milhocina, cedida pela empresa Corn Products, e óleo de soja pós-fritura, obtido do comércio informal.

2.3 Produção do bioemulsificante

O inóculo foi preparado transferindo células de *R. mucilaginosa* do meio sólido para o caldo de malte de levedura, que foi mantido a 28 °C durante 24 h a 150 rpm. Então 10% do inóculo contendo 10⁸ (UFC)/mL foram transferidos para frascos de Erlenmeyers com capacidade de 250 mL com o meio de produção do bioemulsificante, que continha meio base (0,02% KH₂PO₄, 0,02% MgSO₄.7H₂O e 1% de glicose) com concentrações diferenciadas de resíduos agroindustriais (óleo de soja pós-fritura e milhocina) estabelecidas pelo planejamento fatorial completo (Tabela 1) (RUFINO et al., 2013). Durante a fermentação submersa, os frascos foram mantidos sob agitação orbital a 150 rpm por 96 horas a 28 °C. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 min a 10 °C e filtradas para separação do sobrenadante livre de células.

2.4 Planejamento experimental

Foi utilizado um planejamento fatorial completo de 2², 4 pontos centrais e 4 pontos axiais (Tabela 1). Para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações dos resíduos agroindustriais foi utilizado o software STATISTIC versão 6.0 da Statsoft®.

Tabela 1. Planejamento fatorial completo 2².

Fatores	-1	0	1
Milhocina (%)	2,5	5,0	7,5
*Óleo de soja pós fritura (%)	1,0	3,0	5,0

2.5 Determinação do pH

Foi utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310) para a determinação do pH das alíquotas coletadas dos meios de produção livre de células.

2.6 Determinação do índice de emulsificação

O índice de emulsificação do sobrenadante livre de células foi analisado de acordo com Cooper e Goldenberg (1987). Os substratos hidrofóbicos utilizados foram óleos vegetais (soja, milho e soja pós-fritura) e derivados de petróleo (diesel, óleo de motor e óleo de motor queimado), foram adicionados 1,0 mL do líquido metabólico livre de células a 1,0 mL de óleo e a mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos. Após 24 horas de repouso das emulsões formadas foi calculada a altura da emulsão pela altura total da mistura multiplicada por 100, sendo o resultado expresso em porcentagem (IE₂₄).

2.7 Curva de crescimento da *Rhodotorula mucilaginosa*

Foram observados os bioemulsificantes produzidos por *Rhodotorula mucilaginosa* nos períodos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas temperaturas de 21°C, 28°C e 35°C, analisando-se a densidade óptica, o índice de emulsificação e o pH.

2.8 Análise da microscopia óptica das emulsões

A análise das emulsões foi realizada após a adição de 1 mL de substratos hidrofóbicos e 1 mL de sobrenadante livre de células coletados em tubos de ensaio de 24 h, e em seguida

foram agitados em vórtex em alta velocidade por 2 min. As emulsões foram observadas através de um microscópio óptico com uma ampliação de 40x, e uma câmera digital foi usada para capturar as imagens.

2.9 Determinação da viscosidade

O efeito do bioemulsificante na viscosidade da melhor emulsificação foi investigado em tubos de ensaio contendo 6 mL dos respectivos óleos e 2 mL de solução de bioemulsificante. Em seguida, os tubos foram agitados por 1 min e a viscosidade foi medida a 25 °C em um viscosímetro automático (Brookfield Middleboro, Middleborough, MA, EUA; TC 500). O surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado como controle. Os resultados da viscosidade foram expressos em centipoise (Cp) e em porcentagem (%).

2.10 Estabilidade do bioemulsificante

A estabilidade do bioemulsificante foi avaliada no sobrenadante livre de células submetido a diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10 e 12), concentrações de NaCl (0%, 2%, 4%, 6%, 8 %, 10% e 12%) e temperaturas (0, 5, 28, 37, 50 e 100 ° C) por 10 min (BARROS et al., 2008).

2.11 Extração e rendimento do bioemulsificante

O bioemulsionante de *R. mucilaginosa* foi extraído do sobrenadante isento de células utilizando o método de precipitação com etanol de acordo com Techaoei et al. (2007). Após a extração, o bioemulsificante bruto foi lavado duas vezes com água destilada e o rendimento expresso em g/L.

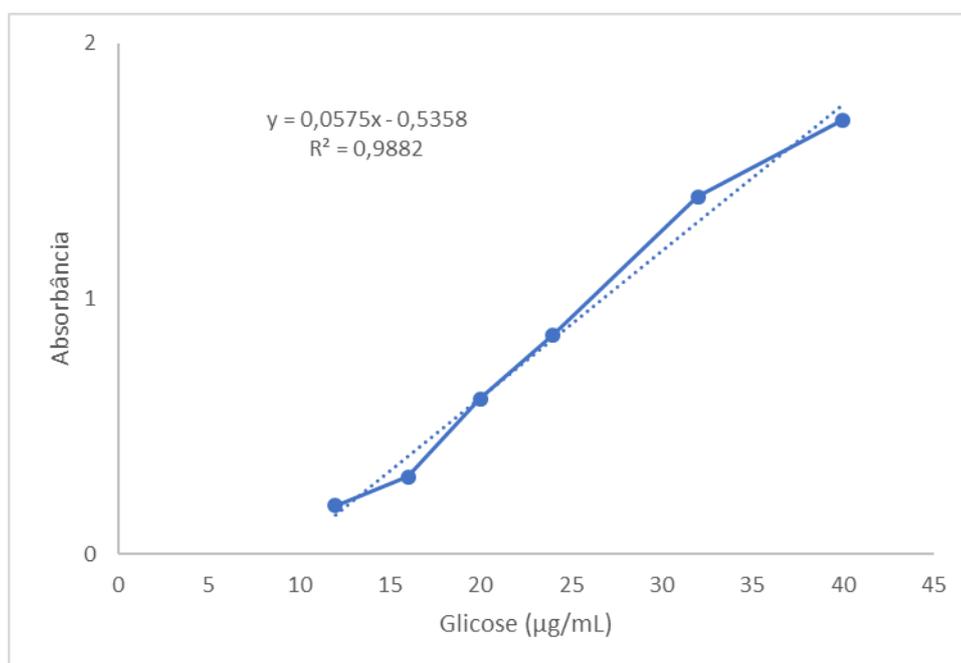
2.12 Determinação da carga iônica

A carga iônica do bioemulsificante foi investigada usando 100 mg da biomolécula solubilizada em 5 mL de água destilada. O caráter iônico foi determinado com um potenciômetro Zeta ZM3-D-G, Sistema Zeta Meter 3.0+, e as imagens diretas foram registradas em um vídeo Zeta Meter, San Francisco, CA, EUA.

2.13 Caracterização preliminar do bioemulsificante

A concentração de proteína no bioemulsificante isolado foi estimada usando o kit de teste de proteína total da Labtest Diagnóstica S.A., Brasil. O teor total de carboidratos foi estimado pelo método do ácido fenol-sulfúrico (Figura 1) (DUBOIS et al., 1956). O conteúdo lipídico foi determinado de acordo com Manocha et al. (1980): 0,5 g do material isolado foi extraído com clorofórmio: metanol em diferentes proporções (1: 1 e 1: 2, v/v). Os extratos orgânicos foram então evaporados sob vácuo e o teor de lipídios determinado por estimativa gravimétrica.

Figura 1. Curva de Calibração para determinação de carboidratos.



2.16 Determinação da Concentração Micelar Crítica – CMC

O bioemulsificante isolado foi solubilizado em água em diferentes concentrações (0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL) e depois seus índices de emulsificação foram medidos. A CMC foi alcançada depois de observar um valor constante do índice de emulsificação.

2.17 Aplicação da propriedade de molhabilidade do bioemulsificante

A molhabilidade foi testada em tecido de poliéster (2x2) cm, utilizando-se o teste de umedecimento em disco de lona por gravimetria e microscopicamente, onde o controle foi a água (PRADHAN; BHATTACHARYYA, 2017).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Produção de um bioemulsificante por *R. mucilaginosa* UCP 1551 em um meio contendo rejeitos agroindustriais

A produção de bioemulsificante é detectada pela medição da emulsificação (MAKKAR e CAMEOTRA, 1998). O índice de emulsificação de diferentes substratos hidrofóbicos do bioemulsificante produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* nas condições do planejamento fatorial completo é apresentado na Tabela 2. *Rhodotorula mucilaginosa* demonstrou habilidade de produzir bioemulsificante nos ensaios 1 (2,5% de milhocina e 1% de óleo de soja pós-fritura), 2 (7,5% de milhocina e 1,0% de óleo de soja pós-fritura) e 4 (7,5% de milhocina e 5,0% de óleo de soja pós-fritura).

Nestas condições, foram obtidos os valores mais elevados do índice de emulsificação, de 95,65% e 95,45% com o óleo de motor queimado no ensaio 1 e 4, respectivamente e de 95,45% com óleo de motor in natura nas condições 2 e 4 após 96 horas de cultivo (Tabela 2). De acordo Ahmad et al. (2016) uma emulsão é considerada estável se IE_{24} for igual ou maior que 50%. A propriedade de biossurfactantes para formar emulsões estáveis com misturas de hidrocarbonetos e água tem demonstrado aumentar a degradação de hidrocarbonetos e sugere sua potencial aplicação no gerenciamento de derramamentos de óleo e na recuperação aprimorada de petróleo (NETO et al., 2008).

Observou-se que os percentuais de índice de emulsificação para o óleo de milho (Tabela 2), óleo diesel (não formou emulsão), óleo de soja (não formou emulsão), óleo de soja pós-fritura (não formou emulsão) não foram semelhantes ao óleo de motor queimado e óleo de motor, sugerindo que a atividade de emulsificação depende da afinidade do bioemulsificante com os substratos hidrocarbonados, que segundo Luna et al. (2013) essa afinidade envolve a interação direta com o próprio hidrocarboneto. Resultado inferior do índice de emulsificação foi obtido por Rubio-Ribeaux et al. (2016) com a *Candida sp.*, utilizando óleo de motor in natura (67%) e óleo de motor queimado (50%) e com a *Candida tropicalis* 59% de emulsificação obtido por Verma et al. (2015).

Tabela 2. Planejamento fatorial de 2² para avaliar a influência do óleo de soja pós-fritura e da milhocina na produção de um bioemulsificante por *R. mucilaginosa* UCP 1551, avaliados durante 24 h pelo índice de emulsificação IE₂₄ (%).

ENSAIOS	Milhocina (%)	Óleo de soja pós-fritura (%)	Óleo de milho	Óleo de motor in natura	Óleo de motor queimado
1	2,5	1,0	58,14	54,17	95,65
2	7,5	1,0	54,76	95,45	54,17
3	2,5	5,0	50,00	66,67	66,67
4	7,5	5,0	53,66	95,45	95,45
5	5,0	3,0	53,49	62,07	62,07
6	5,0	3,0	52,50	66,67	66,67
7	5,0	3,0	51,28	65,52	65,52
8	5,0	3,0	53,12	61,42	61,42

3.2 Influência dos resíduos agroindustriais na produção de bioemulsificadores por *Rhodotorula mucilaginosa* UCP1551

O efeito das variáveis independentes óleo de soja pós-fritura e milhocina no índice de emulsificação (IE₂₄), utilizando óleo de motor queimado como substrato hidrofóbico, é representado no Diagrama de Pareto (Figura 2) com um nível de confiança de 95%. De acordo com esse diagrama, o aumento da interação entre milhocina e óleo de soja pós-fritura exerceu efeito estatisticamente positivo no aumento do IE₂₄, enquanto que os substratos isoladamente não influenciaram significativamente o índice de emulsificação. O ponto no qual os efeitos estimados são estatisticamente significativos ($p = 0,05$) está indicado pela linha vertical vermelha tracejada.

Assim como no Diagrama de Pareto (Figura 2) pode-se verificar na Figura 3 que para produzir um bioemulsificante com elevado índice de emulsificação, o importante é a interação entre os substratos agroindustriais óleo de soja pós-fritura e milhocina, ou seja, concentrações proporcionais, pois o gráfico de superfície de resposta (Figura 3) indica que tanto concentrações maiores destes substratos quanto concentrações menores desses substratos em conjunto forma uma melhor variável resposta (IE₂₄).

Figura 2. Diagrama de Pareto para determinar a influência dos resíduos agroindustriais (óleo de soja pós-fritura e milhocina) na produção do bioemulsificante.

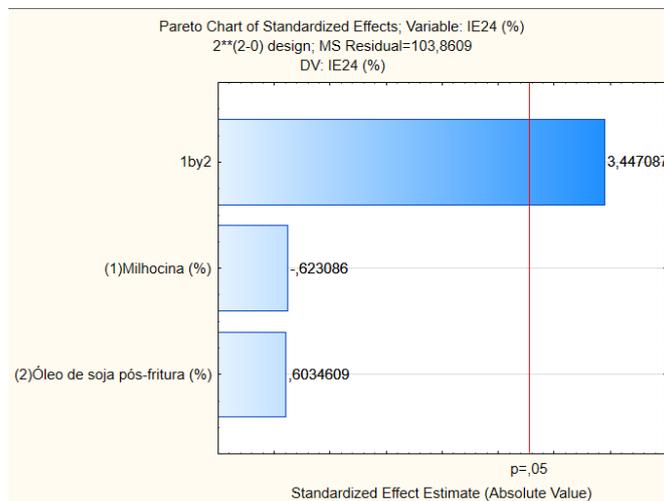
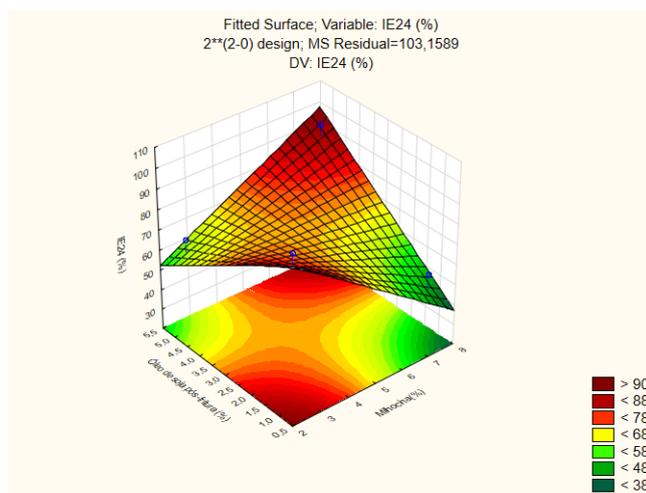


Figura 3. Gráfico de superfície resposta para análise da influência das variáveis independentes (substratos agroindustriais) na variável resposta (IE₂₄).



Assim como este estudo, Souza et al., (2016) utilizaram do óleo de soja pós-fritura e a milhocina, para a produção de biossurfactante por uma levedura (*Candida lipolytica*), porém por meio de planejamento fatorial demonstraram que a interação da milhocina com o óleo de soja pós-fritura apresentam um resultado negativo e os resíduos avaliados individualmente que obtiveram resultados positivos.

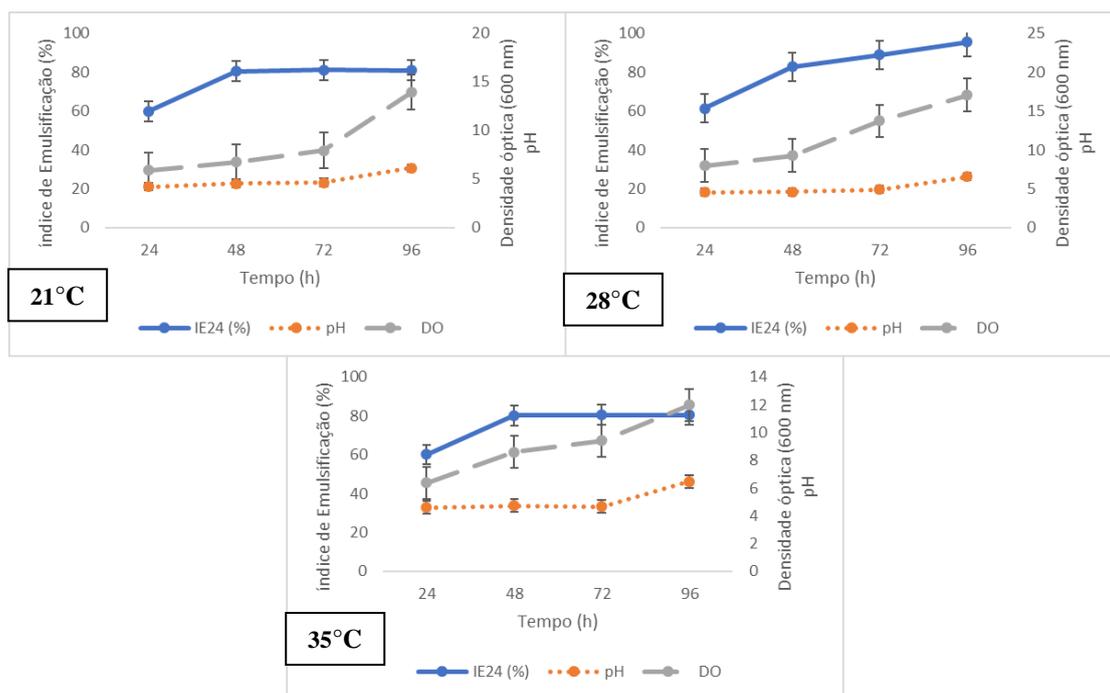
Almeida et al., (2006) utilizaram óleo de soja residual e a milhocina, para a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis*, mas diferente deste estudo demonstraram que apenas a milhocina obteve resultado positivo no índice de emulsificação.

Vale destacar que, em muitos estudos a interação da milhocina com óleo de soja pós-fritura vêm demonstrado ser uma fonte promissora para o crescimento de micro-organismos, sendo incluída em meios de produção de bioemulsificante/biossurfactante (SOBRINHO et al., 2008, LUNA et al., 2011, SANTOS et al., 2013). Esses dados obtidos são bastante promissores, considerando que a produção biotecnológica de bioemulsificantes depende do desenvolvimento de processos mais baratos, o que economicamente viabiliza o processo, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto (MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; RODRIGUES et al. 2006; SOUZA et al., 2016).

3.3 Curva de crescimento da *Rhodotorula mucilaginosa*

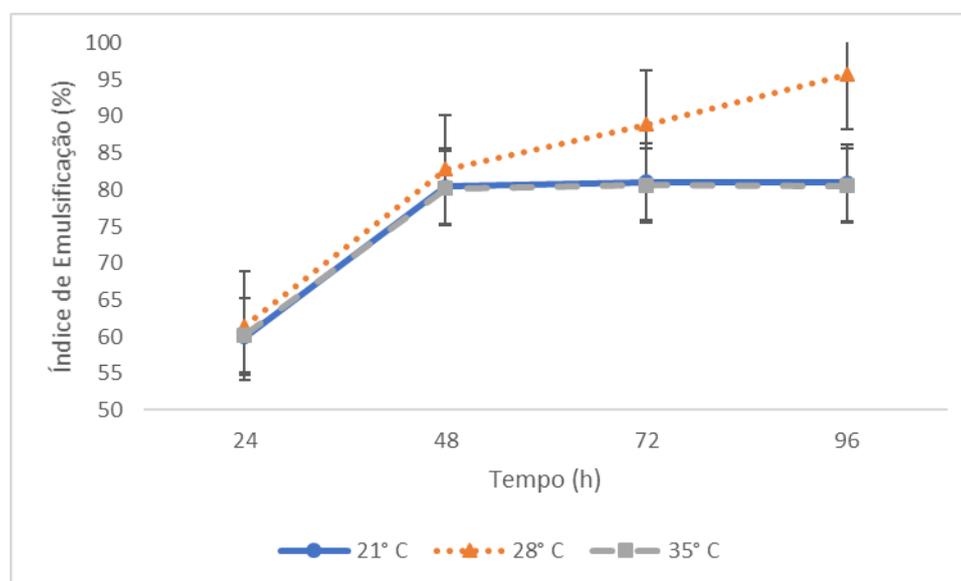
De acordo com a Figura 4 pode-se observar que a *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou melhor crescimento na temperatura de 28°C no período de 96 h com uma DO de 17,07, verifica-se que quanto maior a densidade óptica maior a atividade emulsificante, assim como Santos et al. (2018) constatou com a *Candida Guilliermondii*. Sendo assim, o maior índice de emulsificação foi a 28°C, no período de 96 h. Analisando-se o pH, houve aumento de acordo com o aumento da densidade óptica, evidenciando que a *Rhodotorula mucilaginosa* eleva o pH do meio ao produzir o bioproduto.

Figura 4. Curva de crescimento da *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 através da densidade óptica avaliando o pH e o índice de emulsificação.



A influência da temperatura na produção do bioemulsificante é facilmente identificada na figura 5, tornando-se evidente que 28°C é a temperatura ótima de produção do bioemulsificante, apresentando um índice de emulsificação de 95,65%.

Figura 5. Influência da temperatura na produção do bioemulsificante.



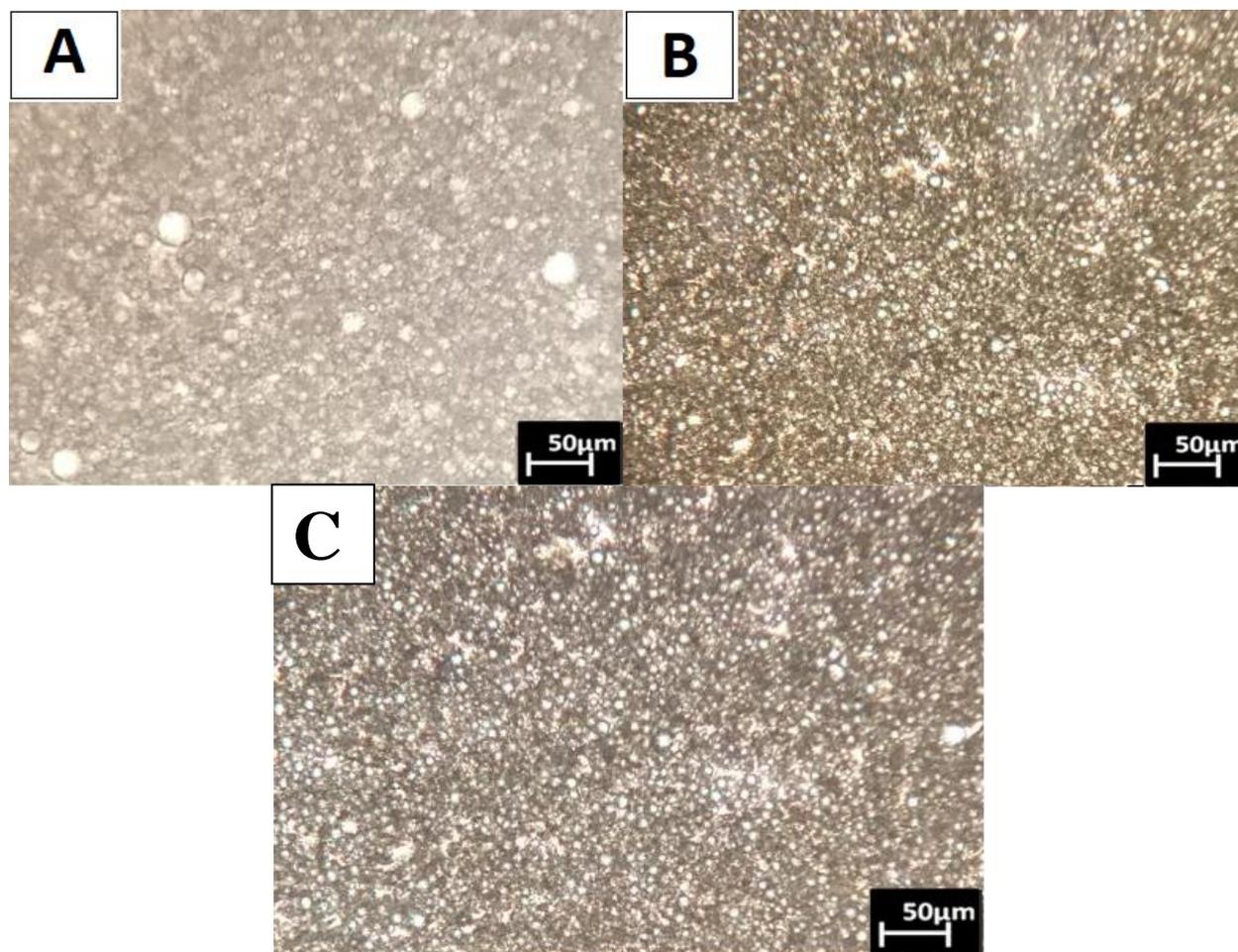
3.4 Caracterização de Gotas de Emulsão Usando Óleo de Motor Queimado

As emulsões formadas usando como substrato hidrofóbico o óleo de motor queimado e óleo de motor in natura pelo bioemulsificante obtido das melhores condições (ensaio 1 e 4, respectivamente) do planejamento fatorial (2,5% de milhocina e 1% de óleo de soja pós-fritura; 7,5% de milhocina e 5% de óleo de soja pós-fritura, respectivamente) estão ilustradas na figura 3.

Para a emulsão formada após 24 h com o líquido metabólico fermentado (Figura 6-A) verifica-se que as gotas apresentam aspecto nitidamente globular, com gotas de tamanhos variáveis e com floculação com tendência a coalescer para volumes maiores. Segundo Elias et al., (2006) este comportamento indica que ocorreu falta de estabilidade na emulsão logo após a sua formação.

Para a emulsão formada em 24 h pelo líquido metabólico com fermentação, a maioria das gotículas foram menores (Figura 6-B), além de terem sido observados insignificantes espaços vazios em relação à condição anterior e ainda apresentou uma maior homogeneidade entre as fases e, portanto, maior tendência à estabilidade, o mesmo observa-se na emulsão com o surfactante sintético (SDS).

Figura 6. Observações microscópicas das gotas formadas a partir do bioemulsificante após 24 h: (A) líquido metabólico do ensaio 4 com emulsão formado com óleo de motor in natura, (B) líquido metabólico do ensaio 1 com emulsão formada a partir do óleo de motor queimado e (C) surfactante sintético (SDS) com emulsão formada a partir do óleo de motor queimado.



De acordo com Jilavenkatesa et al., (2001), a análise da emulsão necessita de dois parâmetros importantes: o tamanho de gota da fase dispersa e sua concentração. Estes fatores influenciam a viscosidade, estabilidade e coalescência. As gotículas formadas da emulsão variam em tamanho, gerando uma distribuição de tamanhos de gotas. Na tabela 3 pode-se verificar a interação desses resultados neste estudo.

Comparando a distribuição do tamanho das gotas e o índice de emulsificação (IE24) do bioemulsificante nos ensaios demonstrados na tabela 3, as gotículas variaram em tamanho e este fato influenciou na estabilidade da emulsão, como pode-se verificar o ensaio 1 apresentou gotas de tamanhos menores que as do ensaio 4, influenciando na viscosidade. Dickinson et al., (2009) estudaram experimentalmente a coalescência de gotas de tamanho milimétrico em

interface óleo/água e observou que as gotas maiores estouraram mais rápido que as menores. Os autores afirmaram que a variedade de tamanhos das gotas depende do comportamento de coalescência com a deformabilidade da superfície da gota.

Segundo Langervin, 2004, uma emulsão estável é aquela que mantém suas gotas dispersas na fase contínua por um tempo considerável, sem que haja separação de fases, levando em consideração também que concentrações maiores de bioemulsificante garantem o aumento da estabilidade, reduzindo a coalescência das gotas.

Tabela 3. Caracterização macro e microscópica de emulsões formadas em óleo de motor queimado do bioemulsificante em 24 h.

Ensaio	Substrato hidrofóbico	Características das emulsões	Diâmetro das gotas (μm)	Viscosidade (cp)
1	Óleo de motor queimado	Homogênea com abundância de gotas menores	1,5–13,5	115,7
4	Óleo de motor in natura	Heterogênea com abundância de gotas grandes	2,4-14	130,4
SDS	Óleo de motor queimado	Homogênea com gotas pequenas	2,5-12	114,1

3.5 Efeito do Bioemulsificante de *Rhodotorula mucilaginosa* na Viscosidade do Óleo Queimado de Motor

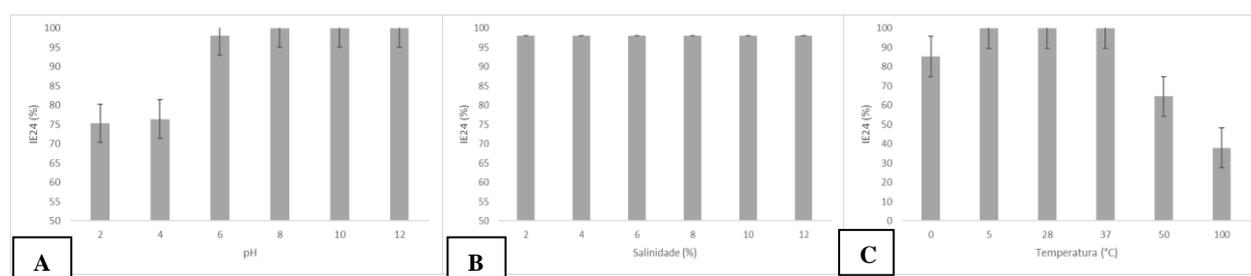
O líquido metabólico livre de células contendo o bioemulsificante foi capaz de formar um sistema estável com o óleo queimado de motor e reduzir a viscosidade deste óleo de 170 cP para 115,7 cP após 24h de repouso da amostra. Esta condição foi acompanhada durante 96h para identificar a capacidade do bioemulsificante em manter estável a viscosidade da emulsão formada. Os resultados demonstraram pequenas variações durante 96h, ficando evidente que o bioemulsificante da *Rhodotorula mucilaginosa* manteve a estabilidade da viscosidade em até 96h.

3.6 Estabilidade do bioemulsificante através de pH, temperatura e salinidade

Vários fatores como a salinidade, pH e temperatura afetam a atividade de bioemulsificantes (ILORI et al., 2005; ROCHA et al., 2006). Neste trabalho foi estudada a estabilidade do bioemulsificante produzido pela *Rhodotorula mucilaginosa* no ensaio 1 utilizando óleo de motor queimado como substrato hidrofóbico e no quesito salinidade o bioemulsificante demonstrou manter sua estabilidade emulsificante em todas as concentrações salinas de NaCl testadas, obtendo um índice de 98% (Figura 7-B). Obtendo melhores resultados que Souza et al. (2016) que conseguiu manter sua estabilidade emulsificante apenas até 2% de NaCl.

Avaliando a estabilidade do bioemulsificante através das variações de temperatura, observou-se que a emulsão suporta a estabilidade emulsificante até 37°C, perdendo a propriedade quando exposto a maiores temperaturas (Figura 7-C). Por outro lado, após o líquido metabólico ter sido submetido a variações de pH (Figura 7-A), observou-se que o bioemulsificante manteve sua propriedade nas faixas de pH neutro e básico com excelentes percentuais de emulsões (98% e 100%) em pH 6, 8, 10 e 12 durante sete dias. Estes resultados foram similares aos obtidos por Santos et al., (2013) que obtiveram 90% de emulsificação em pH básico.

Figura 7. A estabilidade do bioemulsificante produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 de acordo com o índice de emulsificação (IE₂₄): pH (A); NaCl (B); e temperatura (C).

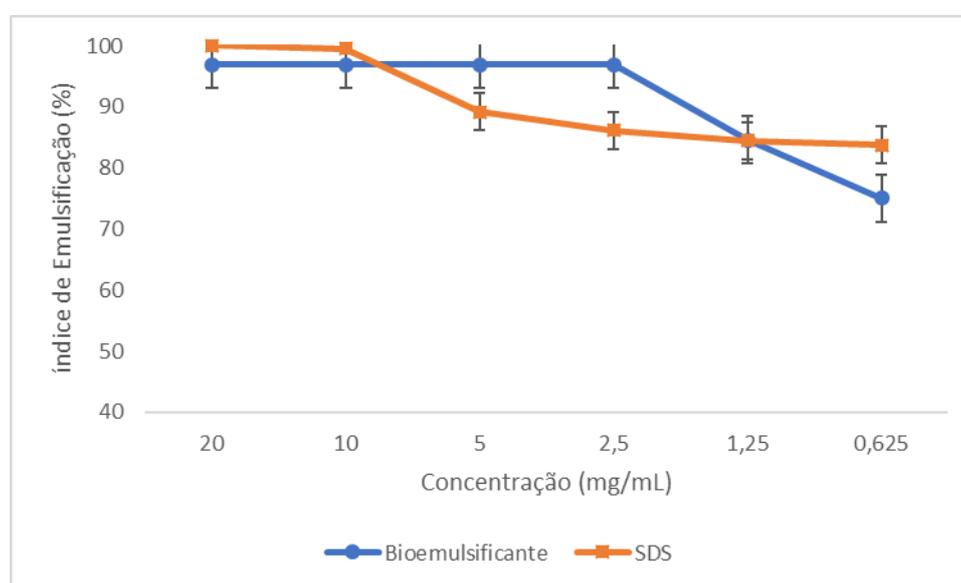


3.7 Concentração Micelar Crítica do Bioemulsificante

A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração do surfactante que favorece a formação de micelas, uma agregação entre 50 e 100 moléculas de surfactante forma micelas. Micelas são formadas quando a parte lipofílica do surfactante não é capaz de formar pontes de hidrogênio com a solução aquosa, causando um aumento da energia livre do sistema (BUENO et al., 2010).

Através da Figura 8 foi determinada a CMC para a levedura *R. mucilaginosa*, através deste é possível observar que o CMC foi de 2,5 mg/mL. Quanto mais baixa a CMC melhor é o bioemulsificante, o biossurfactante de Rufino et al. (2009) produzido por *Candida glabrata* também apresentou uma CMC de 2,5 mg/mL e é considerado um ótimo biossurfactante. A figura 8 mostra que enquanto a CMC do bioemulsificante produzido é de 2,5 mg/mL o surfactante sintético SDS apresentou uma CMC de 10 mg/mL.

Figura 8. Concentração micelar crítica do bioemulsificante produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* em comparação com o surfactante sintético (SDS).



3.8 Rendimento, caracterização preliminar e carga iônica do bioemulsificante

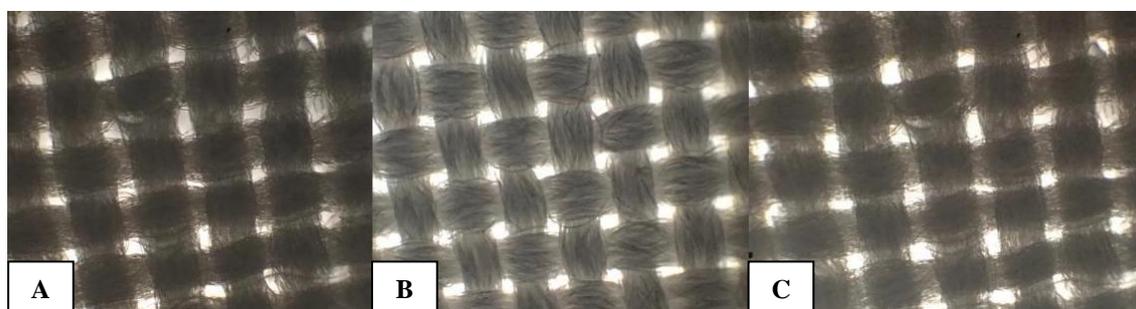
Os testes realizados para determinação da composição bioquímica da biomolécula revelaram a presença de 78,66% de lipídeos, de 14,65% de proteínas e 6,69% carboidratos e com rendimento de 0,74 g/L. Estes estudos sugerem que o biossurfactante sintetizado por *Rhodotorula mucilaginosa* seja provavelmente classificado como um lipopetídeo

O potencial zeta determina a função da carga superficial da partícula que serve para prever e controlar a estabilidade de emulsões e suspensões coloidais (SARAFIN et al., 2014; CORTÉS-CAMARGO et al., 2016). O bioemulsificante estudado apresentou caráter aniônico.

3.9 Aplicação da capacidade molhante do bioemulsificante

Analisando por gravimetria foi possível verificar que o poliéster foi capaz de absorver 0,16740 g de água e 0,16185 g do bioemulsificante, evidenciando a capacidade molhante do bioemulsificante. De acordo com a figura 9 pode-se verificar microscopicamente esta constatação, onde a fibra de poliéster seco (Figura 9B) apresenta uma coloração cinza clara e a fibra com bioemulsificante (Figura 9C) uma coloração cinza escura similar a fibra com água absorvida (Figura 9A).

Figura 9. Microscopia óptica da fibra do poliéster com água (A), seca (B) e com bioemulsificante (C).



4. Conclusões

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 conseguiu degradar os resíduos agroindustriais, óleo de soja pós-fritura e milhocina e bioconvertê-los em bioemulsificante. O bioemulsificante produzido apresentou excelentes propriedades de emulsificação, estabilidade, redução da viscosidade e capacidade molhante podendo ser utilizado futuramente para tratamentos ambientais como biorremediação e devido a sua propriedade umectante para recuperação microbiana de petróleo aprimorado.

5. Referências

AHMAD, Z. et al. Comparative efficacy of ANN and ANFIS models in estimating biosurfactant production produced by *Klebseilla sp.* FKOD36. **Stochastic environmental research and risk assessment**, v. 30, n. 1, p. 353-363, 2016.

ALMEIDA, A. A. et al. Characterization of *Chromobacterium violaceum* isolated from Paca River, Pernambuco, Brazil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, n. 1, 2006.

- ALMEIDA, D. G. et al. Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-14, 2016.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Studies of emulsifying properties and stability of the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cassava wastewater. **Food Science and Technology** (Campinas), v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008
- BRADSHAW, L.J. Laboratory Microbiology. Fourth Edition. USA; p. 13-55, 1992.
- COOPER, D. G., GOLDENBERG, B. G. Surface active agentes from two *Bacillus* species. **Applied and environmental Microbiology**, v.53, p.224-229, 1987.
- CHANDRAN, Preethy; DAS, Nilanjana. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **International journal of science and nature**, v. 2, n. 1, p. 63-71, 2011.
- DAS, M.; DAS, S. K.; MUKHERJEE, R. K. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. **Bioresource Technology**, v. 63, n. 3, p. 231-235, 1998.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1473-1482, 2009.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, v. 28, n. 3, p. 350 — 356, 1956.
- ELIAS, F. O. et al. Propriedades emulsificantes de complexos de proteínas de soro de leite com polissacarídeos. **Braz. J. Food Technol.**, III JIPCA, jan, p. 75, 2006.
- ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp.* isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, n. 7, p. 985-992, 2005.
- JILLAVENKATESA, A.; DAPKUNAS, S. J.; LUM, L. H. Particle size characterization. **NIST Special publication**, 2001.
- KAWAHARA, H. et al. Stabilization of astaxanthin by a novel biosurfactant produced by *Rhodotorula mucilaginosa* KUGPP-1. **Biocontrol Sci**, v. 18, p. 21–28, 2013.
- KUYUKINA, M. S. et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v.46, p. 109-120, 2001.
- LUNA, J. M. et al. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.
- LUNA, J. M. et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Current microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1527-1534, 2011.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 48-52, 1998.

NETO, D. C. et al. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 441, 2008.

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

ROCHA, M. V. P et al. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1295-1299, 2006.

RODRIGUES, L. et al. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609-618, 2006.

ROSA, O. N. D. et al. Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 6, p. 859-869, 2018.

RUBIO-RIBEAUX, D. et al. Biotechnological production of biosurfactant in economic medium by *Candida sp.* and evaluation of biodegradation potential of petro derivatives. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 321-325, 2016.

RUFINO, R. D. et al. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 109, p. 117-122, 2013.

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, p. 34-38, 2014.

SANTOS, D. K. F. et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43-50, 2013.

SOBRINHO, H. B. S. et al. Utilization of two agroindustrial by products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917, 2008.

SOUZA, A. F. et al. Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1608, 2016.

SOUZA, K. S. T. et al. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in biorremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 346, p. 152-158, 2018.

TECHAOEI, S. et al. Preliminary Screening of Biosurfactant-Producing Microorganisms Isolated from Hot Spring and Garages in Northern Thailand. **Curr. Appl. Sci. Technol.**, v. 7, p. 38-43, 2007.

TIQUIA, S. M. TAM, N. F. Y., HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity os spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution** v.93, p.249-256, 1996.

TAIWO, A. E., OJUMU, T. V., MADZIMBAMUTO, T. Statistical Optimization of Acetoin Production Using Corn Steep Liquor as a Low-Cost Nitrogen Source by *Bacillus Subtilis* CICC 10025. **IntechOpen**, 2018.

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1–6, 2015.

VERMA, A. et al. Multifactorial approach to biosurfactant production by adaptive strain *Candida tropicalis* MTCC 230 in the presence of hydrocarbons. **Journal of Surfactants and Detergents**. v. 18, n. 1, p. 145-153, 2015.

ZHAO, Y. et al. Characterization and application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. **J Basic Microbiol**, v. 56, p. 184–195, 2016.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

- *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 foi capaz de metabolizar a milhocina e óleo de soja residual como fontes nutricionais para a produção de bioemulsificante com excelente estabilidade salina e em pH básico;
- O bioemulsificante produzido possui importante propriedade na redução da viscosidade de óleo queimado de motor;
- O uso de um planejamento experimental demonstrou ser uma ferramenta importante e aplicável para avaliar o comportamento das variáveis independentes sobre o índice de emulsificação do bioemulsificante produzido pela *Rhodotorula mucilaginosa*, apresentando influência dos parâmetros independentes do processo;
- O bioemulsificante produzido através da bioconversão dos resíduos agroindustriais tornam o bioprocesso econômico e sustentável, pois duas finalidades foram cumpridas: a valorização dos resíduos agroindustriais e produção de bioemulsificante.