

CENTRO UNIVERSITÁRIO FEI
MARIA SÍLVIA MARELLI

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS
ASSOCIADOS A CAULES E FOLHAS DE MANDIOCA VISANDO APLICAÇÃO
INDUSTRIAL**

São Bernardo do Campo

2022

MARIA SÍLVIA MARELLI

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS
ASSOCIADOS A CAULES E FOLHAS DE MANDIOCA VISANDO APLICAÇÃO
INDUSTRIAL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Centro Universitário FEI, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Orientado pela Prof.^a Dra. Andreia de Araújo Morandim-Giannetti.

São Bernardo do Campo

2022

Marelli, Maria Sílvia.

Avaliação da produção de biossurfactantes por fungos associados a caules e folhas de mandioca visando aplicação industrial / Maria Sílvia Marelli. São Bernardo do Campo, 2022. 88 p. : il.

Dissertação - Centro Universitário FEI.

Orientador: Prof. Dr. Andreia de Araújo Morandim Giannetti.

1. Mandioca. 2. Fungos endofíticos. 3. Biossurfactantes. 4. Tensão superficial. 5. Índice de emulsificação. I. de Araújo Morandim Giannetti, Andreia, orient. II. Título.

Aluno(a): Maria Sílvia Marelli

Matrícula: 420302-2

Título do Trabalho: Avaliação da produção de biossurfactantes por fungos associados a caules e folhas de mandioca visando aplicação industrial

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador(a): Profª Drª Andreia de Araújo Morandim Giannetti

Data da realização da defesa: 11/11/2022

ORIGINAL ASSINADA

Avaliação da Banca Examinadora:

Após reunião da banca a aluna foi considerada aprovada por unanimidade.

A Banca Julgadora acima-assinada atribuiu ao aluno o seguinte resultado:

APROVADO

REPROVADO

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Andreia de Araújo Morandim Giannetti

Profª Drª Aurora Pérez Gramtges

Profª Drª Patrícia Alessandra Bersanetti

Aprovação do Coordenador do Programa de Pós-graduação

Prof. Dr. Ricardo Belchior Torres

Dedico esse trabalho a Deus, por me guiar e a nos iluminar, a minha filha Gabriela, incentivo decisivo e constante em minha vida, ao meu marido Nélio, pelo apoio, graça e paciência, presente em todos os momentos. Gratidão por ter como meus irmãos, Patrícia e Marco Antônio, minhas testemunhas de vida, meus sobrinhos Paola, Lucas, Manuela e Antonella, nossas alegrias. Aos meus pais Waldemar e Alice, sempre a cuidar de nós e sem os quais, nada acima seria possível.

AGRADECIMENTOS

À minha Professora, Dr^a. Andreia de Araújo Morandim-Giannetti, sempre tão pronta comigo, pela orientação, paciência, comprometimento e amor pelo que faz, sempre atenta e preocupada conosco e que me propôs esse trabalho inovador.

Aos meus professores do curso de mestrado em Engenharia Química do Centro Universitário da FEI, Dr. Ricardo Belchior Torres, Dr. Luis Fernando Novazzi, Dr. Rodrigo Condotta, Dr. Rodrigo Cella, Dr. João Guilherme Poço, Dr. Ronaldo Gonçalves, Dr. Gerhard Ett. Às Professoras Dr^a Patrícia Alessandra Bersanetti – UNIFESP e Dr^a Aurora Pérez Gramtges - PUC-RJ, pela disponibilidade em participar da banca.

Aos amigos João Vitor Mateika, pelo apoio e tanta ajuda importante, Felipe Colares, apoio constante, boas conversas e o suporte com os ensaios em laboratório. Ao Rodrigo Neves, pelas análises com ângulo de contato e tensão superficial. À Letícia Cunha, pelo suporte no laboratório, com equipamento e reagentes. À Fernanda Teodoro, me ajudando com a avaliação das curvas de viscosidade. Ao Dr. Nivaldo Boralle – Unesp Araraquara, por todo o suporte com as análises dos produtos por RMN.

À amiga Dayane Fernandes, pela ajuda com a revisão do trabalho. Ao amigo Bruno Oishi e sua esposa Carolina, com as abordagens em biotecnologia. À secretaria da FEI, Adriana, Karina, Dreycer, Luana, ao pessoal de suporte do laboratório de Química da FEI. À minha amiga Elvira, que sempre, não importa a distância, tem uma palavra de sabedoria para confortar.

Aos amigos e parceiros da Stepan que me incentivaram Jim Faunce, Jason Keiper, Sangeeta Ganguly-Mink, Nithila Prabhakar, Eduardo Couto, Bianca Cava, Jamil Junior, Carlos Gomes, Leonardo Souza, Thiago Borges, Gabriela Crisol, Randolpho Bastos, Alessandra Santos. Aos meus colegas de curso Gabriel Rufino, Bruna Almeida, João Vitor Garcia, Jessica Pagliuca, Leticia Abs. A todos que de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste projeto, o meu muito obrigada.

"Nada é permanente, exceto a mudança."

Heráclito de Éfeso (540 a.C.- 470 a.C.)

RESUMO

A busca por compostos naturais que possam substituir com eficiência compostos sintéticos em processos químicos tem sido alvo de várias pesquisas. Neste sentido, trabalhos vêm sendo desenvolvidos na busca por biossurfactantes que possam substituir os atuais surfactantes sintéticos ou alguns grupos destes. No entanto, também são verificadas limitações, bem como desafios em relação a aplicação de biossurfactantes em substituição a surfactantes sintéticos. Desta forma, no presente trabalho, foi realizada a avaliação da produção de compostos com potencial para atuar como biossurfactantes por fungos obtidos a partir de caules e folhas de mandioca (12 fungos no total). A análise preliminar a partir de cada fungo, individualmente, mostrou uma maior produção destes compostos pelos fungos FO1 (*Cladosporium xanthochromaticum*) e CA10 (*Vouchered mycorrhizae*). Posteriormente, foi realizado o crescimento de todos os fungos em meio de cultura líquido específico, visando intensificar a produção de biossurfactantes, sendo verificado que o fungo que secretou uma maior concentração de compostos com propriedades semelhantes às de biossurfactantes, foi o fungo CA10. Verificada a maior eficiência de produção por este fungo, o mesmo foi submetido ao crescimento em meio de cultura líquido específico variando-se o tempo, temperatura e pH, visando o aumento da produção de biossurfactantes. A análise dos resultados referentes a redução da tensão superficial mostrou que a condição ideal de crescimento do fungo foi a utilização de uma temperatura de 30°C, pH 8 e, tempo de 15 dias. Após a determinação da melhor condição de crescimento do fungo para produção de compostos com potencial para atuar como biossurfactantes, foi realizado um novo crescimento nesta condição, bem como, uma pré-purificação do produto desejado. Em uma das frações obtida foi observado a presença de compostos glicosilados, bem como propriedade biossurfactante. Essa fração levou a uma redução da tensão superficial de 62,42 %, quando comparado ao padrão.

Palavras-chave: Mandioca. Fungos endofíticos. Biossurfactantes. Tensão superficial. Índice de emulsificação. Aplicação Industrial.

ABSTRACT

The search for natural compounds that can efficiently replace synthetic compounds in chemical processes has been the subject of several researches. In this sense, works have been developed in the search for biosurfactants that can replace the current synthetic surfactants or some groups of these. However, there are also limitations, as well as challenges due to the application of biosurfactants to replace synthetic surfactants. Thus, in the present work, the evaluation of the production of compounds with the potential to act as biosurfactants by fungi obtained from cassava stems and leaves (12 fungi in total) was carried out. The preliminary analysis from each fungus, individually, showed a higher production of these compounds by the fungi FO1 (*Cladosporium xanthochromaticum*) and CA10 (*Vouchered mycorrhizae*). Subsequently, the growth of all fungi in a specific liquid culture medium was carried out in order to intensify the production of biosurfactants, it was verified that the fungus that secreted a greater concentration of compounds with properties similar to those of biosurfactants was the CA10 fungus. After verifying the highest production efficiency by this fungus, it was submitted to growth in a specific liquid culture medium, varying the time, temperature and pH, aiming at increasing the production of biosurfactants. The analysis of the results referring to the reduction of surface tension showed that the ideal condition for the growth of the fungus was a temperature of 30°C, pH 8, and time of 15 days. After determining the best fungus growth condition to produce compounds with the potential to act as biosurfactants, a new growth was carried out in this condition, as well as a pre-purification of the desired product. In one of the fractions obtained the presence of glycosylated compounds was observed, as well as biosurfactant property. This fraction led to a surface tension reduction of 62.42% when compared to the standard.

Keywords: Cassava. Endophytic fungi. Biosurfactants. Superficial tension. Emulsification index. Industrial application.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplo de estrutura genérica de molécula surfactante	17
Figura 2 - Redução tensão superficial versus a formação de micelas.....	18
Figura 3 - Ilustração de um surfactante iônico e formação de micela.....	19
Figura 4 – Representação de um surfactante por categoria.....	22
Figura 5 – Estruturas químicas: (A) SDS e (B) LAS	22
Figura 6 - Estrutura química de produtos Quaternários de amônio	23
Figura 7 – Estrutura química Alquil Amidopropil Betaína.....	23
Figura 8 – Estrutura química de uma molécula de surfactante não iônico	24
Figura 9 – Mercado global de biossurfactantes (projeção 2015-2026).....	29
Figura 10 – Exemplos de compostos de biossurfactantes.....	34
Figura 11 - Classificação dos biossurfactantes.....	35
Figura 12 - Aplicações dos Biossurfactantes em amplitude.....	36
Figura 13 - Aplicações industriais primárias dos Biossurfactantes	39
Figura 14 – Aplicação dos biossurfactantes e surfactantes – aspecto ambiental.....	40
Figura 15 - Fluxograma de obtenção do biossurfactante pré-purificado.....	44
Figura 16 - Tensiômetro utilizado para avaliação de tensão superficial	49
Figura 17 - Análise de ângulo de Contato	50
Figura 18 - Foto ilustrativa do Espectrômetro de RMN.....	51
Figura 19 - Foto ilustrativa do equipamento utilizado	52
Figura 20 – Fungos obtidos a partir de caules e folhas de mandioca.....	53
Figura 21 – Comparação dos índices de emulsificação dos extratos	54
Figura 22 – Comparação dos dados de índice de emulsificação dos extratos	56
Figura 23 – Comparação dos dados de tensão superficial dos extratos	58
Figura 24 – Comparação da redução da tensão superficial em relação a água.....	58
Figura 25 – Comparação dos índices de emulsificação obtidos nos tratamentos	60
Figura 26 – Comparação da tensão superficial de cada extrato.....	61
Figura 27 – Redução na tensão superficial em função da condição de crescimento	62
Figura 28 – Gráfico de Pareto para redução da tensão superficial.....	63
Figura 29 – Superfícies de contorno obtidas durante a análise estatística.....	65
Figura 30 – Otimização das condições de crescimento.....	65
Figura 31 – Cromatograma do extrato bruto obtido	67
Figura 32 - Cromatograma da fração clorofórmio (extração somente com CHCl ₃)...	67

Figura 33 - Cromatograma do resíduo (extração somente com CHCl_3)	67
Figura 34 – Cromatograma da fração acetato (extração com acetato e CHCl_3).....	68
Figura 35 - Cromatograma da fração clorofórmio (extração com acetato e CHCl_3)..	68
Figura 36 - Cromatograma do resíduo (extração com acetato e CHCl_3)	68
Figura 37 – Comparação da tensão superficial das frações obtidas	69
Figura 38 – Gráficos da tensão superficial dos resíduos de fracionamento	70
Figura 39 – Redução da tensão superficial em comparação com a água	70
Figura 40 – Tensão superficial do BC em diferentes concentrações.....	71
Figura 41 – Índice de emulsificação (biossurfactante em diferentes concentrações)	72
Figura 42 - Avaliação do ângulo de contato sobre superfície de inox.....	73
Figura 43 – H^1 -RMN da fração clorofórmio (extração com CHCl_3)	74
Figura 44 - H^1 -RMN da fração acetato (extração com acetato e CHCl_3)	76
Figura 45 - H^1 -RMN da fração clorofórmio (extração com acetato e CHCl_3)	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Etimologia da palavra surfactante.....	17
Tabela 2 - Exemplos de surfactantes industriais	21
Tabela 3 – Exemplos de técnicas de extração, princípio da técnica e vantagens	33
Tabela 4 – Exemplos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores	35
Tabela 5 – Empresas produtoras de biossurfactantes e aplicação.....	41
Tabela 6 – Planejamento experimental utilizado na otimização do crescimento	46
Tabela 7 – Gradiente utilizado nas análises via HPLC	52
Tabela 8 – Identificação dos fungos avaliados	54
Tabela 9 - Índices de emulsificação para cada extrato (crescimento em BDA).....	55
Tabela 10 – Índices de emulsificação de cada extrato (meio líquido).....	56
Tabela 11 – Dados de tensão superficial obtidos (meio líquido).....	57
Tabela 12 – Condições de crescimento utilizadas.....	59
Tabela 13 – Dados de emulsificação mudando a condição de crescimento.....	60
Tabela 14 – Dados de tensão superficial.....	61
Tabela 15 – Estimativa dos efeitos para o crescimento de CA10.....	64
Tabela 16 – Dados de tensão superficial obtidos durante a pré-purificação.....	69
Tabela 17 – Dados de Emulsificação	72
Tabela 18 - Dados de ângulo de contato obtidos a 21°C (INOX)	73

LISTA DE ABREVIações

BDA	Batata Dextrose Ágar
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia Gasosa
MS	Espectro de massa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
CMC	Concentração Micelar Crítica
LAS	Alquilbenzeno Linear Sulfonato de Sódio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
BC	Biossurfactante comercial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 SURFACTANTES	17
3.1.1 Obtenção e classificação dos surfactantes	20
3.1.2 Impacto ambiental do uso de surfactantes	24
3.2 BIOSSURFACTANTES	25
3.2.1 Biotecnologia	25
3.2.2 Biossurfactantes	26
3.2.4 Principais fontes de biossurfactantes	30
3.2.6 Principais biossurfactantes	34
3.2.7 Aplicação dos biossurfactantes	36
3.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS	37
3.4 APLICAÇÃO DOS SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAIS	42
4.2 EQUIPAMENTOS	42
4.3 MÉTODOS	43
4.3.1 Fluxograma geral do trabalho	43
4.3.2 Obtenção dos fungos	44
4.3.3 Avaliação da produção de biossurfactantes	45
4.3.4 Influência do meio de cultivo na produção de biossurfactantes	45
4.3.5 Influência do tempo, pH e temperatura	46
4.3.6 Pré-purificação dos biossurfactantes	47
4.3.7 Análises de caracterizações	48
4.3.7.1 Índice de emulsificação	48
4.3.7.2 Tensão superficial	49
4.3.7.3 Ângulo de contato	50
4.3.7.4 Ressonância magnética nuclear	51
4.3.7.5 Análises via HPLC	52

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.....	53
5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR CA10	59
5.3 PRÉ PURIFICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE.....	66
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
Apêndice A – Certificado de Análise Ramnolípideo R90	88

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes sintéticos são utilizados em quase todos os segmentos da indústria. O amplo uso destas estruturas é produto da ampla versatilidade dos mesmos, pois são produtos que transitam de forma harmônica desde detergentes usados para limpeza domiciliar ou industrial, passando por formulações de cuidados pessoais, uniformizando formulações em aplicações agrícolas, até aplicações em campos de petróleo para extração, entre outros, (BHALERAO et al., 2019; ROSEN; DAHANAYAKE, 2000, p.105, 131; DALVIN, 2011, p.305).

No entanto, os impactos ambientais relacionados ao uso dos mesmos vêm despertando a atenção devido à toxicidade e baixa biodegradabilidade, que acabam levando a severos problemas ambientais (JOHNSON et al., 2021, VIEIRA et al., 2021; ADU et al., 2020).

Assim, pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca por substitutos sustentáveis, sendo os biossurfactantes, uma alternativa promissora aos surfactantes sintéticos. Esta característica se deve ao fato destes compostos serem, principalmente, biodegradáveis, por apresentarem menor toxicidade e, pelo fato de serem produtos mais estáveis em condições extremas de temperatura, salinidade e pH, quando comparados com seus equivalentes sintéticos (ADU et al., 2020; FERNANDES et al., 2020; JAHAN et al., 2020; MENESES et al., 2017).

Destaca-se também a importância do desenvolvimento de estudos neste segmento devido ao aumento do consumo de surfactantes mundialmente. Dados de mercado mostram que os biossurfactantes vêm se tornando produtos químicos especiais para diferentes aplicações industriais, esperando-se um faturamento de US\$ 3.408,7 milhões até 2028 (GREYVIEWS, 2022). Desta forma, indústrias de âmbito global vêm investindo neste mercado, focado principalmente em glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, entre outros (AHUJA; BAYAS, 2022).

No entanto, algumas limitações e desafios relacionados à aplicação e à produção destes materiais em substituição aos surfactantes sintéticos são observadas, tais como o atendimento às propriedades físico-químicas e o rendimento da produção, o alto custo da matéria prima e do processo de produção, bem como, o desafio econômico referente a comercialização (ONWOSI et al., 2021).

Somam-se a estas limitações, a busca pela expansão e diversificação de produtos a serem ofertados no mercado, seja por meio de diferentes fontes de microrganismos, como a proposta deste trabalho, ou pela implementação de melhorias no processo produtivo, assim como o ganho de escala, estimulando a pesquisa contínua por novas fontes biossurfactantes (JOHNSON et al., 2021; ONWOSI et al., 2021).

Assim, em face ao enorme potencial de diferentes possibilidades de aplicações industriais dos biossurfactantes e levando-se em consideração que os bioprodutos mais utilizados neste campo são oriundos de *Pseudomonas* e *Bacillus* (NAUGHTON et al., 2019), verifica-se a importância do desenvolvimento do presente estudo que tem como objetivo, a avaliação da produção de compostos que apresentem potencial para aplicação como biossurfactantes, por meio de fungos associados a caules e folhas de mandioca, visando a introdução de novos microrganismos com potencial para produção destes compostos.

2 OBJETIVOS

Levando-se em consideração a aplicação de microrganismos na obtenção de diversos bioprodutos como por exemplo, os biossurfactantes, o presente trabalho apresenta os objetivos geral e específicos descritos nos itens 2.1 e 2.2.

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar a produção de compostos biossurfactantes por fungos endofíticos presentes em caules e folhas de mandioca, avaliando-se as condições de fermentação, objetivando a otimização da produção de biossurfactantes por meio do fungo que apresentar maior produtividade, verificada por caracterização de propriedades físico-químicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Levando-se em consideração o objetivo geral do trabalho, destacam-se como objetivos específicos:

- Avaliar a produção de compostos que possam atuar como biossurfactantes a partir de fungos associados a caules e folhas de mandioca;
- Avaliar o processo fermentativo do fungo que apresentar maior produção de biossurfactantes, variando-se o tempo, temperatura e pH, visando o aumento de produtividade destes compostos;
- Realizar a pré-purificação dos produtos obtidos via extração líquido-líquido;
- Caracterizar todos os produtos obtidos via determinação da tensão superficial, índice de emulsificação e, ângulo de contato.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção são apresentados os principais conceitos, necessários para o desenvolvimento do presente estudo que visou a verificação do potencial de produção de biossurfactantes por fungos associados a caules e folhas de mandioca.

3.1 SURFACTANTES

Os surfactantes (Figura 1), conhecidos como substâncias anfífilas ou “tensoativas”, são compostos por uma parte polar e outra apolar. Os mesmos apresentam duas raízes gregas que apresentam como etimologia da palavra uma combinação entre o inglês, o grego e o latim (Tabela 1) (SARUBBO et al., 2022; JESUS et al., 2021; DAVE; JOSHI, 2017; DALVIN, 2011, p.11). Estes compostos têm como origem o nome “surface-active agent” e são muito empregados em diversos setores da indústria devido às suas características estruturais (ASLAM et al., 2021; DAVE; JOSHI, 2017).

Figura 1 – Exemplo de estrutura genérica de molécula surfactante



Fonte: Autora

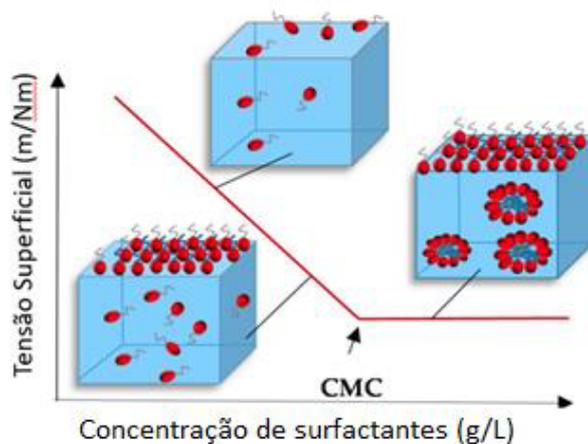
Tabela 1 – Etimologia da palavra surfactante

Inglês	Grego	Latim
Oil	Lipo-	Oleo-
Water	Hydro-	Aqua-
Solvent	Lyo-	Silvo-
Both	Amphi-	
Affinity	Philic	
Lacking of affinity	Phobic	

Fonte: Autora “adaptado de” Dave; Joshi, 2017.

Os surfactantes apresentam duas propriedades funcionais, a redução da tensão superficial e interfacial e, formação de micelas (Figura 2). A primeira ocorre em decorrência da atividade em superfície, da adsorção nas interfaces e agregação no solvente o qual ele está dissolvido (VARJANI; UPASANI, 2017; ROSEN; KUNJAPPU, 2012, p.1, 2; DALTIM, 2011, p.11). Este fenômeno leva a mudanças nas propriedades interfaciais e nas propriedades da fase solvente, em concentrações muito baixas, eles adsorvem preferencialmente na interface ar/solução para evitar a interação energeticamente desfavorável entre sua parte apolar com o dipolo de água, de tal forma que os grupos de cabeças polares são solvatados pelo dipolo-induzido dipolo (para tensoativos não iônicos) ou por interação íon-dipolo (para tensoativos iônicos) e pertencendo a sua parte apolar a fase ar.

Figura 2 - Redução tensão superficial versus a formação de micelas

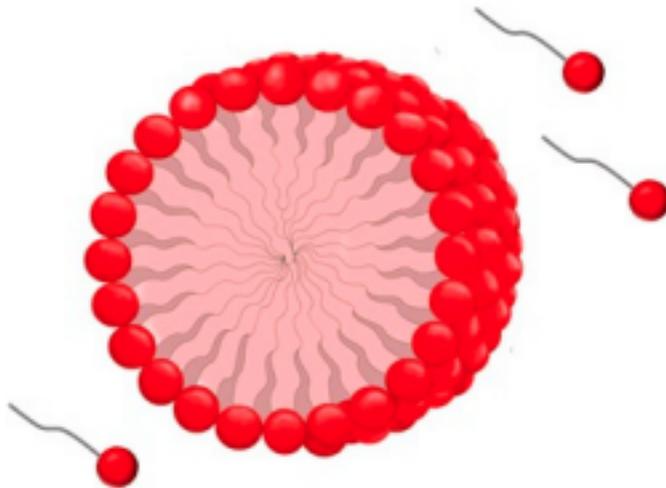


Fonte: Autora “adaptado de” Santos et al., 2016

Nesta situação, podemos supor que os surfactantes povoam a interface ar/solução como um todo (CHAKRABORTY et al., 2010; ROSEN; KUNJAPPU, 2012, p. 40), em outras palavras a tensão superficial deve cair à medida em que há o aumento da concentração de tensoativo ocupando a superfície entre o líquido e o ar (o qual também está ocupando a superfície líquido-sólido ao mesmo tempo, já que não há superfície líquido-líquido disponível). Enquanto houver espaço na superfície líquido-ar, o aumento da concentração de tensoativo proporciona maior preenchimento desta superfície, continuando a diminuir a tensão superficial da solução (DALTIM, 2012, p.24).

Com relação a formação de micelas, a mesma ocorre quando a interface ar/líquido está completamente saturada com os tensoativos monoméricos. Esta condição leva à formação de uma fase separada compreendendo as estruturas anfifílicas auto agregadas. Os grupos caudais são dispostos dentro de uma concha hidrofílica fornecida pelos grupos polares, e a espécie formada é chamada de micela (Figura 3). Para cada surfactante há uma concentração micelar crítica (concentração mínima que deve fazer com que todas as superfícies estejam ocupadas e, então, leve a redução da tensão superficial da interface). Sendo assim, a quantidade de surfactante que excede a esta ocupação é a concentração mínima necessária para a formação das micelas (SARUBBO et al., 2022; ROSEN; KUNJAPPU, 2012, p. 123; DALTIM, 2011, p.158).

Figura 3 - Ilustração de um surfactante iônico e formação de micela



Fonte: Autora "adaptado de" Santos et al., 2016

Em surfactantes, a parte polar da estrutura se mostra solúvel em água e é caracterizada pela presença de átomos como O, S, P ou N, presentes em grupos funcionais de estruturas tais como álcool, tiol, éter, éster, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida etc. Proporcionalmente, quanto mais cargas houver, mais solúvel em água é o surfactante (DALTIM, 2011, p.12). Esses grupos apresentam concentração de carga, caracterizado por um polo positivo ou negativo (SALAGER, 2002, p.3). A parte apolar do surfactante possui baixa solubilidade em água e é identificada na estrutura da molécula de surfactante pela cadeia carbônica, podendo

ser do tipo alquil, ramificada ou cíclica (SARUBBO et al., 2022; DALTIM, 2011, p.12; SALAGER, 2002, p.3).

Um surfactante é, portanto, uma substância de alta eficiência que, deve atuar por meio de baixas concentrações, adsorvendo-se nas interfaces ou superfícies (sentido químico e não geométrico) de sistemas, que são as regiões de fronteiras entre duas fases imiscíveis (SARUBBO et al., 2022; SHIRI et al., 2019; HIEMENZ et al., 1997; ROSEN, KUNJAPPU, 2012, p.237).

3.1.1 Obtenção e classificação dos surfactantes

Devido à grande aplicabilidade, a indústria de surfactantes vem crescendo de forma rápida, principalmente após a Segunda Guerra Mundial, quando os primeiros ingredientes foram obtidos por meio da sulfonação de álcoois de cadeias curtas como propílico ou butílico entre os anos 1920 e 1930, nos EUA. Antes deste marco, as aplicações como produtos de limpeza costumavam utilizar sabões obtidos através de gorduras vegetais (ácidos graxos de sebo ou coco) ou animais (BHALERAO et al, 2019; MYERS, 2005, p.7).

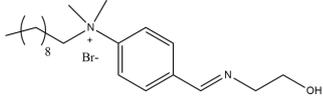
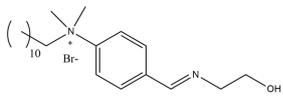
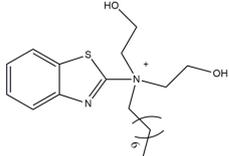
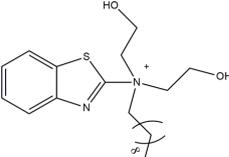
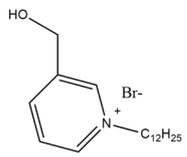
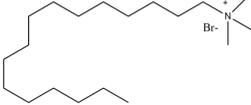
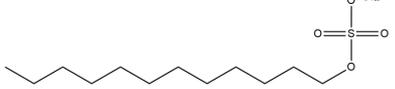
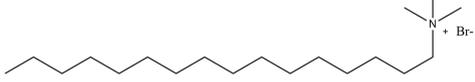
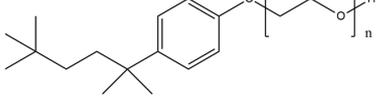
Atualmente, os surfactantes são obtidos a partir de fontes de produtos petroquímicos ou a partir de gorduras vegetais e animais, plantas e microrganismos (MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; AKIBARI et al., 2018, BUSHNELL; HAAS, 1940). Destes, quando obtidos a partir de fontes naturais renováveis como gorduras, lignina, açúcares, dentre outros, são considerados “verdes” (ROSEN; KUNJAPPU, 2012, p.32). No entanto, estudos mostram que boa parte do mercado de produção de surfactantes depende de produtos de origem petroquímica (AKIBARI et al, 2018).

Neste contexto, vários são os surfactantes disponíveis no mercado e aplicados em diferentes setores conforme pode ser evidenciado na tabela 2.

Os surfactantes se distinguem conforme a polaridade de suas moléculas em iônicos e não iônicos. Os iônicos são divididos em aniônicos (carregados negativamente em sua porção hidrofílica), catiônicos (carregados positivamente em sua porção hidrofílica) e, anfotéricos ou zwitteriônicos (apresentam duas cargas distintas e opostas em locais adjacentes ou não adjacentes). Destes, os anfóteros se comportam como surfactantes catiônicos ou aniônicos em função da protonação, de acordo com o pH do meio, podendo ser ácido ou alcalino (SARUBBO et al., 2022; DAVE et al., 2017; ROSEN; KUNJAPPU, 2012, p.30; DALTIM, 2011, p.79). No entanto

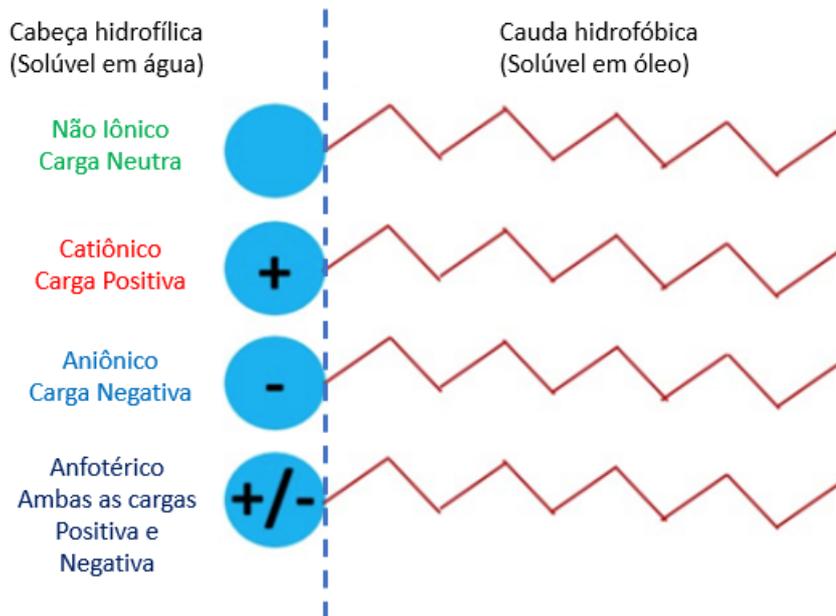
os surfactantes caracterizados como não iônicos, não apresentam carga verdadeira na parte hidrofílica da molécula, possuindo uma densidade de cargas ou dipolos, que tem origem em grupos altamente polares (Figura 4) (KALAM et al., 2021; ROSEN; KUNJAPPU, 2012, p.23; DALVIN, 2011, p.67).

Tabela 2 - Exemplos de surfactantes industriais

Estrutura química	Nome
	Brometo de (E)-decil-4-[(2-hidroxi-etilamino) metil] -N, N-dimetil benzenamínio
	Brometo de (E)-dodecil-4-[(2-hidro-xietilamino) metil] -N, N-dimetilbenzenamínio
	Brometo de N, N-bis(2-hidroxi-etil) -N-octilbenzo[d]tiazol-2-amônio
	Brometo de N, N bis(2-hidroxi-etil) -N-decilbenzo[d]tiazol-2-amônio
	Brometo de 1-dodecil-3-(hidroximetil)piridin-1-io
	CTAB
	Lauril sulfato de sódio
	Brometo de cetrimônio
	Triton X-100

Fonte: Autora “adaptado de” Aslam et al., 2021, Fatma et al., 2021.

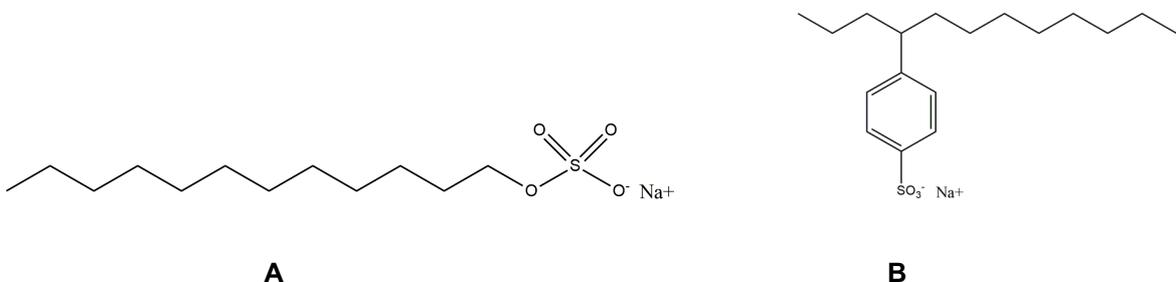
Figura 4 – Representação de um surfactante por categoria



Fonte: Autora “adaptado de” Kalam et al., 2021

A polaridade dos surfactantes é levada em consideração quando se define o tipo de aplicação. Assim, normalmente, surfactantes aniônicos como, por exemplo, o dodecil sulfato de sódio (SDS) e o linear alquilbenzeno sulfonato de sódio (LAS) (Figura 5), que apresentam caráter aniônico, são muito utilizados na produção de produtos de limpeza, desde detergentes usados na limpeza de tecidos, roupas, bem como para limpeza em geral, na indústria de cosméticos, farmacêutica e, remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos (KALAM, 2021; SIMMS et al, 2020; DAVE; JOSHI, 2017).

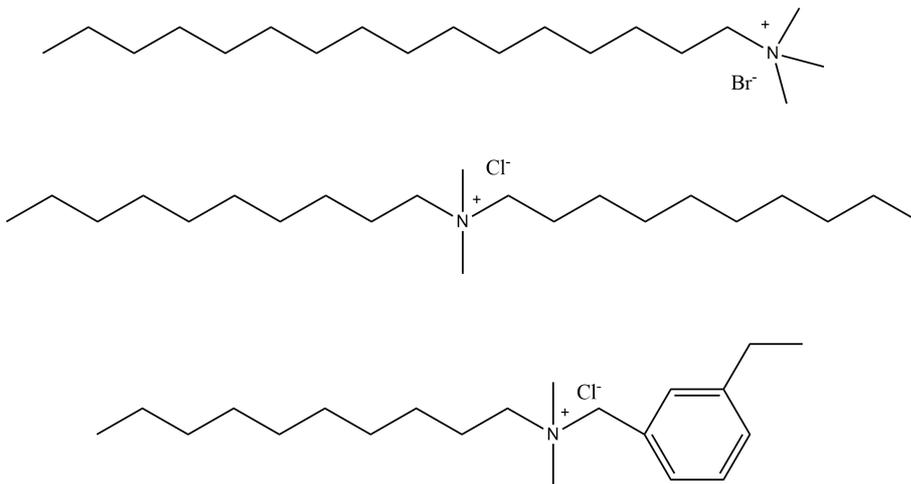
Figura 5 – Estruturas químicas: (A) SDS e (B) LAS



Fonte: Autora “adaptado de” Kalam, 2021; Simms et al, 2020

Já, os surfactantes catiônicos, que apresentam nitrogênio em sua estrutura (Figura 6), como por exemplo os haleto de amônio quaternário (MYERS, 2005, p.31, 97), são mais utilizados na produção de agentes condicionantes, amaciantes de tecidos e, algumas vezes, na formulação de tipos específicos de agentes de limpeza. Os surfactantes catiônicos apresentam menor capacidade de limpeza e melhores propriedades condicionantes e biocidas (FALK et al., 2019), além de apresentarem propriedades bactericidas. O fator dominante de eficiência destas estruturas surfactantes está relacionada ao tamanho do grupo alquil e adsorção ao grupo de amônio quaternário (MYERS, 2005, p.67).

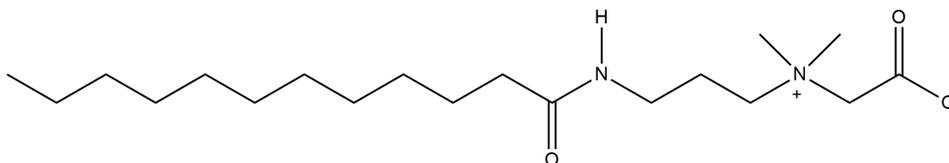
Figura 6 - Estrutura química de produtos Quaternários de amônio



Fonte: Autora “adaptado de” Falk et al., 2019; Dave et al., 2017.

Com relação aos surfactantes anfóteros, como por exemplo, o alquil amidopropil betaína (Figura 7), que possui carga que muda em função do pH, eles são utilizados em várias aplicações em função do ambiente (FALK et al, 2019).

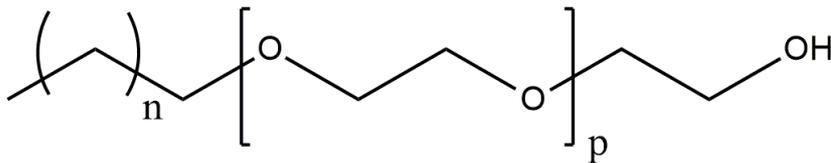
Figura 7 – Estrutura química Alquil Amidopropil Betaína



Fonte: Autora “adaptado de” Falk et al., 2019.

Com relação aos surfactantes não-iônicos (Figura 8), os mesmos apresentam maior aplicabilidade como emulsificantes, agentes umectantes, agentes dispersantes, sendo compatíveis com a todos os demais tipos de surfactantes bem como agentes estabilizantes de espuma (ROSEN; KUNJAPPU, 2012, p.23; IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010). Assim, esses compostos são muito aplicados em conjunto com os surfactantes iônicos visando um maior poder de limpeza bem como a resistência frente a dureza da água (DALVIN, 2011, p.67).

Figura 8 – Estrutura química de uma molécula de surfactante não iônico



Fonte: Autora “adaptado de” Ivanković; Hrenović, 2010

Porém, ao avaliar-se os produtos de caráter surfactante disponíveis em mercado, é possível identificar que, em grande maioria, estes são produtos similares oriundos de fornecedores diferentes. Assim, dentre tantas opções, as vezes pode ser difícil escolher o melhor ou a melhor estrutura a ser utilizada em uma aplicação específica ou não (ROSEN; DAHANAYAKE, 2000, p.1-3).

3.1.2 Impacto ambiental do uso de surfactantes

Com o uso global de surfactantes sintéticos sendo superior a 15 milhões de toneladas por ano, é estimado que cerca de 60% desse volume acaba sendo descartado no ambiente aquático (JOHNSON et al., 2021; PRADHAN; BHATTACHARYYA, 2017). Neste contexto, é importante salientar os altos níveis de toxicidade devido à baixa biodegradabilidade dos surfactantes, que leva a destruição de populações microbianas aquáticas até danos a peixes e outras formas de vida aquática.

Também deve ser levado em consideração a redução da eficiência de conversão de energia fotoquímica das plantas, além de sérias mudanças dos processos de tratamento de águas residuais, o que reforça ainda mais a necessidade de estudos de alternativas ecologicamente corretas com menores efeitos ambientais

adversos (BANAT et al., 2021; ONWOSI et al., 2021; JOHNSON et al., 2021; ROSEN; KUNJAPPU, 2012, p.31).

Dessa forma, diferentes alternativas sustentáveis vêm sendo exploradas sendo uma das possibilidades, a utilização de biossurfactantes, que apresentam várias vantagens em relação aos sintéticos, desde baixa tensão superficial, baixa toxicidade e maior biodegradabilidade (ONWOSI et al., 2021; ROSEN; KUNJAPPU, 2012).

Os biossurfactantes se mostram uma forma de reduzir os impactos ambientais. Esta eficácia comparável à de surfactantes sintéticos é demonstrada por meio de ensaios físico-químicos de avaliação de redução da tensão superficial, entre outros, no entanto, como comentado, as limitações e desafios para o uso de biossurfactantes também são discutidos, principalmente devido aos baixos rendimentos de produtividade e os custos envolvidos.

Embora tenha havido foco na obtenção de maiores rendimentos de produção, um problema remanescente é a falta de pesquisas sobre o uso de biossurfactantes para uma gama maior de aplicações industriais e que demonstre sua segurança e eficácia e, identificar bons candidatos a biossurfactantes para produção (JOHNSON et al., 2021).

3.2 BIOSSURFACTANTES

Ao se abordar o tema biossurfactante, naturalmente o mesmo se conecta ao tema biotecnologia. Assim, nesta seção são descritos os principais conceitos referentes a biotecnologia, biossurfactantes e aplicação desses compostos.

3.2.1 Biotecnologia

A biotecnologia é uma área muito ampla e aplicada, que visa a utilização de conhecimentos de diferentes campos que resultam em uma combinação de ciência com tecnologia. A definição mais geral de biotecnologia é o conjunto de atividades com base em conhecimentos multidisciplinares capazes de utilizar agentes biológicos como organismos, células e moléculas para o desenvolvimento de produtos ou solucionar problemas (BRUNO et al., 2014).

A partir desta definição é possível considerar que os seguintes processos abrangem as principais atividades da biotecnologia:

- obtenção ou modificação de produtos para utilização na área de saúde humana ou animal;
- melhoramento de plantas e animais ou desenvolvimento de microrganismos para usos específicos;
- aplicação das potencialidades dos microrganismos, através do cultivo de células animais ou vegetais ou parte delas na indústria, na saúde e nos processos diretamente relacionados ao meio ambiente e ao desenvolvimento sustentável;
- modificação e desenvolvimento de novos processos industriais (BRUNO et al., 2014).

A partir dessas considerações, é possível concluir que a biotecnologia está fortemente conectada com a inovação podendo ser descrita como “a ciência do futuro”. Assumindo um papel fundamental no desenvolvimento de processos sustentáveis, pois utiliza agentes biológicos (microrganismos e metabólitos) para a obtenção de produtos, proporcionando uma redução de atividades clássicas de caráter poluidor.

Neste contexto, a biotecnologia vem sendo amplamente utilizada em diversos setores produtivos como agricultura, indústria farmacêutica, química, petroquímica, alimentícia, de energia e meio ambiente (GUO et al., 2010; BORÉM et al, 2005) sendo, a obtenção de biossurfactantes, imprescindível no contexto de sustentabilidade e produtividade.

Apesar das diversas perspectivas e possibilidades, a biotecnologia gera de forma contínua impactos significativos na vida cotidiana de todos, mesmo de forma discreta (BRUNO et al., 2014).

3.2.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são compostos que apresentam massa molar média entre 500 Da e 1500 Da, produzidos naturalmente pelos microrganismos presentes na natureza e, com o avanço da biotecnologia, passaram a ser estudados e explorados em produções industriais para uma ampla gama de aplicações (SARUBBO et al., 2022).

Os mesmos são compostos surfactantes anfífilos de natureza neutra (ISMAIL et al., 2022; INÈS et al., 2015), aniônica, catiônica e são caracterizados por meio de sua massa molar, origem biológica ou modo de ação (DRAKONTIS et al., 2020; UZOIGWE et al., 2015). Destes compostos, os catiônicos são mais comumente produzidos (MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; DRAKONTIS et al., 2020).

A porção hidrofóbica de um biossurfactante apresenta ácidos graxos de cadeia longa linear, ramificada, saturada ou insaturada e sua porção hidrofílica pode ser composta de um peptídeo cíclico, aminoácido, ácido fosfato carboxílico, álcool (DRAKONTIS et al., 2020; SPINA et al., 2018; SANTOS et al., 2016) ou, ainda, monossacarídeo, dissacarídeo ou polissacarídeo (DRAKONTIS et al., 2020).

Dentre os biossurfactantes, destaca-se uma classe especial, os denominados bioemulsificantes, que apresentam composição química diferente de um biossurfactante. Salienta-se que, os biossurfactantes, normalmente quando apresentam elevada massa molar, são chamados de bioemulsificantes e são eficientes em estabilizar sistemas óleo-água, promovendo eficiente emulsão entre líquidos imiscíveis (DRAKONTIS et al., 2020; SANTOS et al., 2016). Um exemplo de vantagem desta característica, está em apresentar ação efetiva na despoluição de ambientes contaminados por óleo, pelo aumento da dispersão neste meio (UZOIGWE et al., 2015).

Já quando apresentam baixa massa molar são mais efetivos em reduzir a tensão superficial ar-água e em reduzir a tensão interfacial óleo-água (DRAKONTIS et al., 2020; UZOIGWE et al., 2015). Um exemplo de biossurfactante de baixa massa molar são os glicolipídios, considerados os mais populares dos biossurfactantes (INÈS et al., 2015, DRAKONTIS et al., 2020).

Os biossurfactantes são obtidos, principalmente, a partir de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras que secretam metabólitos secundários de forma extracelular ou aderem às superfícies celulares (SHARMA et al., 2021) sendo que, a realização de modificações genéticas, cepas mutantes ou recombinantes com rendimentos de produção aprimorados tem se mostrado favorável ao aumento da produtividade desses compostos (MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; ALMEIDA et al., 2016).

A composição, a concentração e as características dos biossurfactantes obtidos a partir de microrganismos podem ser influenciadas através da modificação das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas durante o processo de fermentação,

assim como pela presença de elementos inorgânicos tais como fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores do processo produtivo como pH, temperatura, agitação e tempo são relevantes para obtenção em quantidade e qualidade do biossurfactante a ser produzido (JIMOH; LIN, 2019; CASTIGLIONI et al., 2009).

Os biossurfactantes, em geral, apresentam atividade em superfície, mas podem não diminuir essencialmente a tensão superficial. No entanto, fornecem muitas vezes emulsões em sistemas líquidos água-óleo (JIMOH; LIN, 2019; CASTIGLIONI et al., 2009).

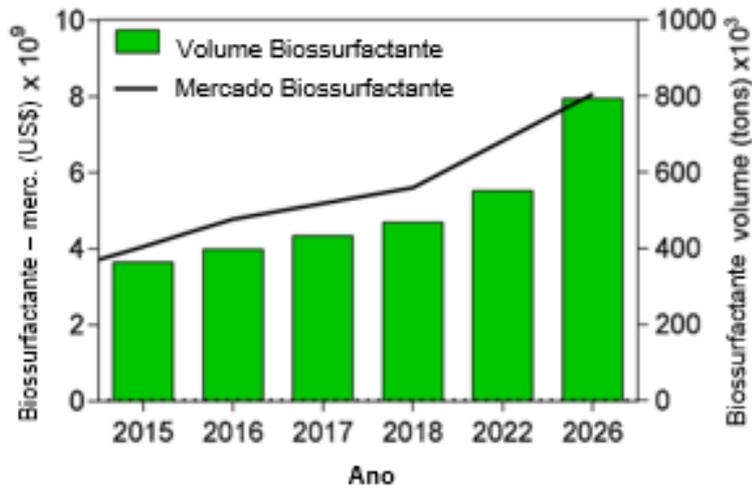
Esses compostos exibem também as mesmas funcionalidades dos seus análogos sintéticos, ao mesmo tempo em que possuem a capacidade de sinergia junto a outras moléculas (JIMOH; LIN, 2019; AKBARI et al., 2018). Isso reforça a possibilidade de se atingir diferentes mercados por meio de formulações inovadoras dependendo das características do produto obtido.

Assim, o interesse por essas substâncias se demonstra devido às vantagens como diversidade estrutural, baixa toxicidade, versatilidade em ampla faixa de pH, temperatura e salinidade, seletividade, menor CMC, maior biodegradabilidade e, produção envolvendo fontes renováveis como, por exemplo, resíduos industriais (ONWOSI et al., 2021; AKIBARI et al., 2018; SANTOS et al., 2016).

Os biossurfactantes ocorrem naturalmente na natureza, sendo a história e o momento de caracterização sobre eles um tanto fragmentada. Neste contexto, os mesmos são objeto de estudo e discussão desde o final dos anos 1800 e início dos anos 1900 (BUSHNELL et al., 1940), sendo registradas mais de 850 patentes de compostos com potencial para atuar como biossurfactante (MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021).

Estes estudos fazem com que o mercado global de biossurfactantes (Figura 9) testemunhe um aumento de seu valor de US\$ 1,7 bilhão em 2011 para US\$ 3,99 bilhões em 2016, bem como uma projeção de atingir-se US\$ 5,52 bilhões em comercialização destes produtos em 2022 conforme descrito por Ingsel et al. (2022). Esse aumento se mostra mais efetivo pelas empresas líderes na produção de biossurfactantes como Jeneil Biotech (EUA), Ecover (Bélgica), Evonik (Alemanha), entre outras (INGSEL et al., 2022).

Figura 9 – Mercado global de biossurfactantes (projeção 2015-2026)



Fonte: Autora “adaptado de” Onwosi et al., 2021.

3.2.3 Produção de Biossurfactantes

As principais técnicas biotecnológicas descritas na literatura para a produção de metabólitos microbianos, dentre eles os biossurfactantes, consistem na fermentação submersa e na fermentação no estado sólido. Estas duas formas de produção se distinguem principalmente pela quantidade de água presente no meio de cultivo. Na fermentação submersa a água é o solvente e os substratos estão dissolvidos neste meio, enquanto na fermentação no estado sólido, utiliza-se substratos sólidos e a água está em concentrações que podem variar de 30% a 70%. Nos dois processos, o controle de parâmetros físicos e químicos são fundamentais para o aumento da produtividade sendo, neste contexto, a aplicação de planejamentos importante para a otimização do processo e avaliação das condições ideais de produção e interações entre as variáveis (SARUBBO et al., 2022; VARJANI; UPASANI, 2017; MITCHELL et al., 2006).

Este estudo é importante uma vez que, como em todos os processos fermentativos, o crescimento celular está diretamente relacionado aos fatores de cultivo, ou seja, a produção e composição dos biossurfactantes pode variar de acordo com o tempo de fermentação, temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido

e grau de aeração (SARUBBO et al., 2022; VARJANI; UPASANI, 2017; CHEN et al., 2015; MULLIGAN et al., 2014).

Vale destacar que estudos vêm sendo desenvolvidos, principalmente por empresas que estão neste mercado ou entrando no mesmo, sobre a produção em larga escala de biossurfactantes, mostrando que os custos com matérias-primas e, principalmente a etapa de purificação, são os principais obstáculos para o aumento da produção destes materiais através da fermentação microbiana (DRAKONTIS et al., 2020).

3.2.4 Principais fontes de biossurfactantes

Os biossurfactantes são obtidos, principalmente, a partir de vários tipos de microrganismos capazes de produzir diferentes estruturas que, assim como na química, devem ser estudadas e testadas tanto no aspecto de eficácia em formulações, bem como em produtividade (DRAKONTIS et al., 2020; NAUGHTON et al., 2019; ACCORSINI et al., 2012).

Eles são produzidos na natureza, por microrganismos como bactérias (*Actinobacteria*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Rhodococcus*, entre outras), leveduras e fungos (*Candida lipolytica*, *Candida bombicola*, *Candida batistae*, *Aspergillus ustus*, *Trichosporon ashii*, entre outros), submetidos ao crescimento em diferentes meios de cultura, e é visto que, microrganismos submetidos ao crescimento em um substrato imiscível em água, como óleos e gorduras, mostram um maior acúmulo destas substâncias (KASHIF et al., 2022; SARUBBO et al., 2022; ONWOSI et al., 2021; HEALY et al., 1996).

Destes microrganismos, os fungos são conhecidos por produzirem biossurfactantes em maiores concentrações quando comparadas às bactérias (ACCORSINI et al., 2012).

São verificados atualmente, mais de 2000 diferentes substâncias com potencial para atuarem como biossurfactantes (VIEIRA et al., 2021), devido as suas propriedades industrialmente valiosas de detergência, emulsificação, estudos visando a aplicabilidade em larga escala na área da saúde humana e animal, bem como, relacionados a atividades biológicas implícitas, também vem sendo desenvolvidos (VIEIRA et al., 2021; FRACCHIA et al., 2015). Ainda, sob o contexto microbiológico, há um interesse particular sobre os biossurfactantes produzidos por meio de bactérias

e em relação às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais (JIMOH; LIN, 2019).

Salienta-se ainda a possibilidade de possíveis benefícios terapêuticos e biomédicos, tais como as aplicações de glicolipídios sugeridas por INÈS et al. (2015), além de antifúngicos e antibactericidas, agentes hemolíticos, antitumorais, disruptores de formação de biofilme, entre outros, a depender da aplicação e que vão um pouco além das questões de baixa toxicidade e biodegradabilidade, oferecidas pela aplicação destes compostos ao invés dos surfactantes sintéticos (AKBARI et al., 2018).

Salienta-se também que diversos estudos estão sendo desenvolvidos modificando-se as condições de cultivo visando o aumento de produtividade, relacionados ao processo de obtenção e modificações genéticas (MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; JIMOH; LIN, 2019). Neste sentido, são utilizados processos biotecnológicos, bem como técnicas de extração, precipitação e destilação, não sendo necessária a utilização de modificações químicas, o que os caracterizam como surfactantes de origem natural (ISMAIL et al., 2022).

Técnicas de extração isoladas ou em combinação com vários solventes, são aplicadas para extração e identificação da porção hidrofóbica do material produzido (JIMOH; LIN, 2019). Neste contexto, os solventes, como por exemplo, butanol, clorofórmio-metanol, clorometano-metanol, hexano-acetato de etila, pentano, ácido acético, clorofórmio, isopropanol, metanol e éter são os mais comumente aplicados na recuperação de biossurfactantes (JIMOH; LIN, 2019).

A escolha desses solventes se deve ao fato de as porções hidrofóbicas dos biossurfactantes serem solúveis em poucos solventes, o que ajuda na remoção e separação do produto bruto (JIMOH; LIN, 2019). Desta forma, métodos de extração por solvente são aplicados para purificar com sucesso diferentes tipos de biossurfactantes, como soforolipídios, celobiolipídios, raminolipídios, liposan e lipídios sintetizados por diferentes microrganismos (DRAKONTIS et al., 2020; JIMOH; LIN, 2019).

Salienta-se também, que existem diferentes possibilidades de produção dos biossurfactantes a partir de diferentes fontes ou substratos, desde resíduos dos mais variados tipos, tais como óleos residuais de culturas agrícolas, da indústria de processamento de alimentos tais como batatas e mandioca, de processamento de frutas, café, melão de cana-de-açúcar, processamento de petróleo, resíduo da

indústria de biodiesel, mineração, entre outros, o que os tornam ainda mais promissores (JIMÉNEZ-PEÑALVER et al., 2019; ACCORSINI et al., 2012; LIMA et al., 2016).

3.2.5 Extração e purificação de biossurfactantes

Após a produção dos biossurfactantes por fermentação, vem a etapa de extração e purificação desses compostos. O melhor método para o processamento dos biossurfactantes está diretamente relacionado à natureza do substrato, do tipo de fermentação e das propriedades físico-químicas dos compostos produzidos (SARUBBO et al., 2022; SEN, 2005).

Dentre os diversos métodos de purificação de biossurfactantes, é possível citar a precipitação ácida, a recuperação com solventes orgânicos (metanol, diclorometano, clorofórmio, ácido acético, éter etílico, acetato de etila, butanol ou uma combinação desses solventes), precipitação com sulfato de amônio, processos de adsorção em resinas, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, resinas poliméricas e, fracionamento de espuma (SARUBBO et al., 2022; KHIRE, 2010; BAKER, 2010) (Tabela 3).

Dentre as técnicas acima listadas, o processo de extração com solvente tem se mostrado a técnica mais vantajosa devido a maior eficiência, menor custo, maior agilidade e, maior pureza do biossurfactante obtido, porém, destaca-se também a realização de estudos envolvendo o fracionamento de espuma devido ao fato do mesmo não requerer a utilização de solventes e, desta forma, se mostrar mais sustentável (SARUBBO et al., 2022).

Porém, vale observar, que antes da escolha do método de extração, é necessário considerar alguns fatores para uma melhor recuperação dos biossurfactantes como carga iônica, solubilidade e localização (intracelular, extracelular ou ligada diretamente nas paredes celulares) (SARUBBO et al., 2022; AL-WAHAIBI et al., 2016). Deve-se levar em consideração também que, na recuperação de biossurfactantes hidrossolúveis extracelulares, são necessárias mais etapas, entretanto, biossurfactantes intracelulares tem um custo maior, uma vez que existe a necessidade de lise celular, portanto a produção de biossurfactantes extracelulares se mostra mais viável (SARUBBO et al., 2022; BAKER, 2010).

Tabela 3 – Exemplos de técnicas de extração, princípio da técnica e vantagens

Técnica	Princípio da técnica	Vantagem
Precipitação ácida	Baixa solubilidade de biossurfactantes em pHs ácidos.	Alta eficiência e baixo custo
Extração com solvente orgânico	Diferentes afinidades com solventes orgânicos.	Purificação parcial do biossurfactante e possibilidade de recuperação do solvente.
Precipitação com sulfato de amônio	Ocorre devido ao processo de “salting-out” na presença de biossurfactantes poliméricos ou que apresentem proteínas.	Alta eficiência na purificação de biossurfactantes poliméricos.
Adsorção em carvão ativado	Adsorção seguida da dessorção pelo uso de solventes orgânicos.	Biossurfactantes com elevada pureza, baixo custo, reutilização do carvão e solventes.
Adsorção em resina de poliestireno	Adsorção seguida da dessorção pelo uso de solventes orgânicos.	Biossurfactantes com elevada pureza, baixo custo, reutilização do carvão e solventes.
Centrifugação	Realizada em conjunto com uma técnica que promova a precipitação do biossurfactantes que é separado por centrifugação.	Alta recuperação do biossurfactante.
Cromatografia de troca iônica	Biossurfactantes que apresentam carga se ligam a resina de troca iônica presente na coluna cromatográfica e a separação ocorre devido a eluição na presença de tampão.	Alta pureza, recuperação do solvente, rápida.
Fracionamento de espuma	Durante a produção do biossurfactante ocorre formação de espuma e a mesma é separada por partição em espuma.	Possibilidade de aplicação em processo contínuo, alta pureza do produto.
Ultrafiltração	Os biossurfactantes formam micelas que podem ser aprisionadas por membranas poliméricas e separadas por centrifugação em altas rotações.	Rápida e leva a alta pureza do biossurfactante.

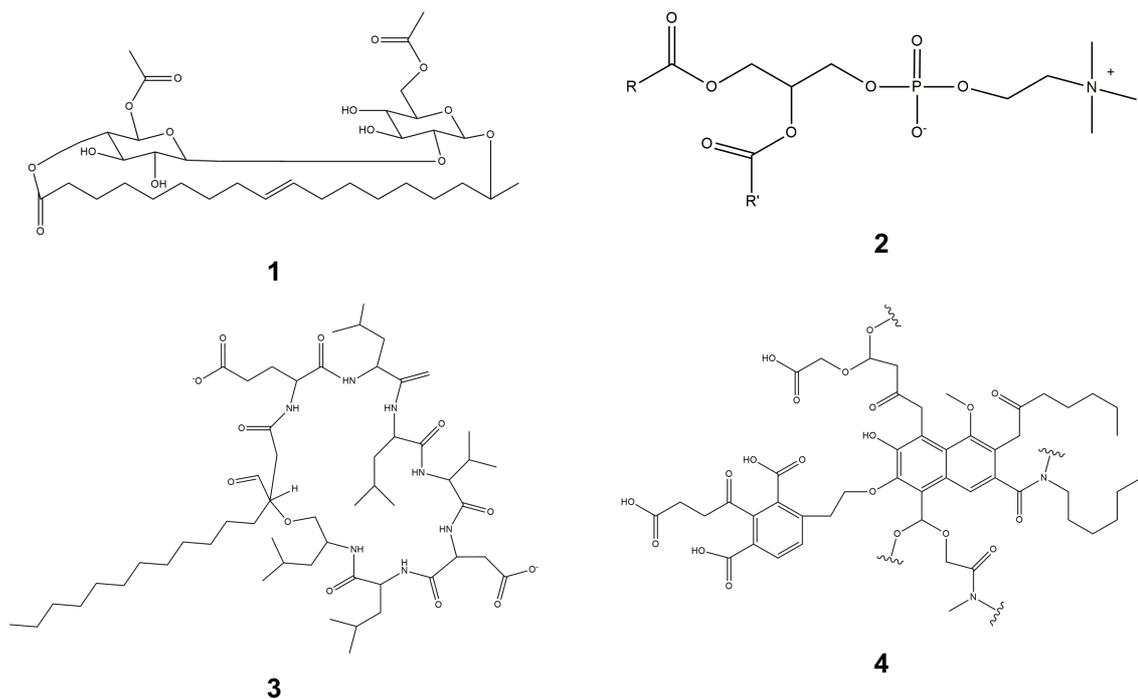
Fonte: Autora “adaptado de” Sarubbo et al., 2022

3.2.6 Principais biossurfactantes

Os principais biossurfactantes em destaque são, (1) glicolipídios, (2) fosfolipídios, (3) lipoproteínas ou lipopeptídeos e (4) biossurfactantes poliméricos (Figura 10, Tabela 4) (AMBAYE et al., 2021; HEALY et al., 1996).

Destes, a grande parte dos biossurfactantes são de glicolipídios, ou seja, carboidratos ligados a ácidos graxos de cadeia longa alifáticos ou hidroalifáticos por meio de uma ligação éster, sendo os mais conhecidos os ramnolipídios e os sofrorolipídios (FARIAS et al., 2021). Os mesmos são classificados de acordo com seu peso molecular e categorizados por sua origem, propriedades físico-químicas, composição microbiana (Figura 11) (DRAKONTIS et al., 2020; NAUGHTON et al., 2019, WINTERBURN et al., 2012).

Figura 10 – Exemplos de compostos de biossurfactantes



Fonte: Autora “adaptado de” Kashif et al., 2022; Singh; Glick; Rathore, 2018; Boffa et al., 2014

As principais propriedades dos biossurfactantes consistem na redução da tensão superficial e interfaciais na interface óleo/água e aumento da solubilidade das moléculas hidrofílicas (ONWOSI et al., 2021, AKBARY et al., 2018). Destaca-se que um biossurfactante eficaz pode reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m a

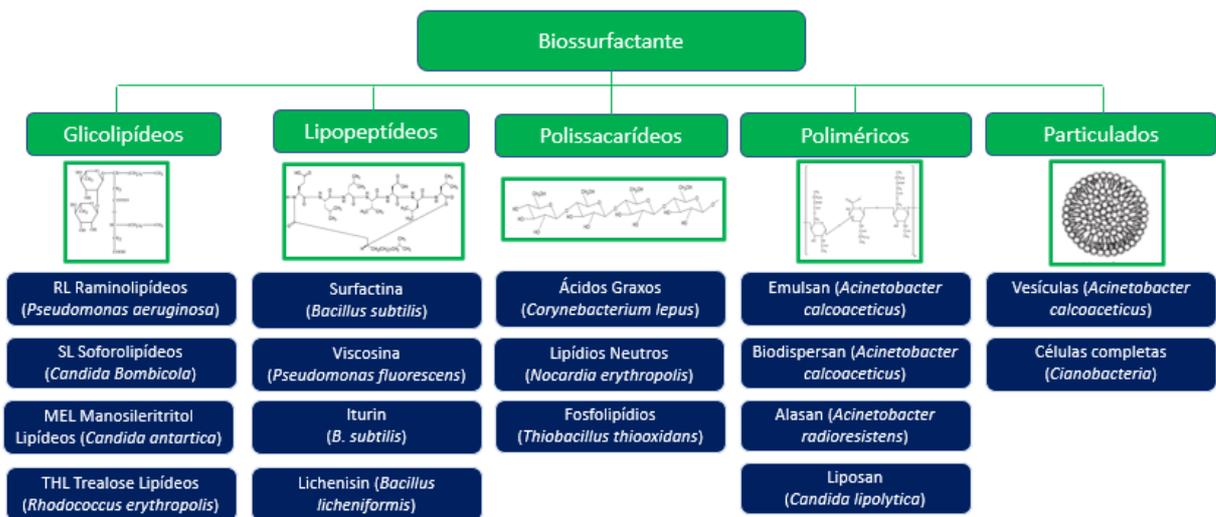
faixas em torno de 35 mN/m (ACCORSINI et al., 2012; DRAKONTIS et al., 2020, AKBARI et al., 2018).

Tabela 4 – Exemplos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores

Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	<i>Nocardiopsis lucentensis</i> MSA04
Soforolipídios	<i>Starmarella bombicola</i> ; <i>Starmella bombicola</i> ATCC 22,214
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IRMD-2010; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SS14; <i>Serratia rubidaea</i> SNAU02
Surfactina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XZ-173
Iturina A	<i>Bacillus subtilis</i> NB22; <i>Bacillus subtilis</i> RB14-CS; <i>Bacillus subtilis</i> iso 1; <i>Bacillus subtilis</i> TrigorCor 1448
Lipopeptídeos	<i>Bacillus cereus</i> SNAU01; <i>Bacillus subtilis</i> DM-03; <i>Bacillus subtilis</i> SPB1
Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i> TrigorCor 1448
Hidrofobina	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Outros	<i>Trametes versicolor</i> CECT 20,817; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> RG18; <i>Pleurotus ostreatus</i> ; <i>Candida tropicalis</i> ; <i>Nocardiopsis</i> sp. MSA13A; <i>Candida guilliermondii</i> ; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Aspergillus fumigatus</i>

Fonte: Autora “adaptado de” Banat et al., 2021.

Figura 11 - Classificação dos biossurfactantes



Fonte: Autora “adaptado de” Sharma et al., 2021

3.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Microrganismos são responsáveis por realizar atividades essenciais para manutenção de ecossistemas, sendo fundamentais para o meio ambiente, pois integram os ciclos biogeoquímicos, além das cadeias alimentares. Em relação aos microrganismos existentes na Terra, estima-se que apenas 10% deles tenham sido caracterizados e, um número pequeno de metabólitos produzidos pelos mesmos, estudados (BURCKE et al., 2011). Desta forma, em face aos eventos voltados ao desenvolvimento de alternativas à substituição de surfactantes sintéticos por biosurfactantes, observa-se que estes podem ser produzidos por meio de diferentes microrganismos como, por exemplo, os fungos endofíticos (ACCORSINI et. al, 2012) que, além de numerosos, podem sobreviver em diferentes ambientes, mesmo em condições extremas, suas populações variam de espécie para espécie e de região por região (FADIJI et al., 2020).

Os fungos endofíticos são microrganismos que colonizam diferentes partes de qualquer planta viva ou morta (em espaços intracelulares ou extracelulares) de maneira assintomática na maioria das vezes, isto é, sem causar nenhum prejuízo ou alterações patológicas à mesma, em uma relação de mutualismo, uma vez que ambos planta e fungos, exercem uma função de auxílio uns para com os outros (AMIRZAKARIYA; SHAKERI, 2022; LI et al., 2020; GUPTA et al., 2020). Estudos recentes também mostram que microrganismos endófitos podem ser patogênicos, comensais, não patogênicos e/ou benéficos (FADIJI et al., 2020) sendo que, os benéficos produzem uma série de compostos úteis para proteção das plantas frente às condições ambientais, corroborando com o crescimento e a sustentabilidade das mesmas, enquanto vivem convenientemente dentro de seus hospedeiros (FADIJI et al., 2020; GUPTA et al., 2020; LI et al., 2020). Desta forma, os fungos endofíticos também são reportados, por conferirem vários tipos de proteção a seus hospedeiros. (FADIJI et al., 2020).

Os fungos endofíticos são os microrganismos mais frequentemente isolados dos tecidos de plantas (FADIJI et al., 2020), eles pertencem aos ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos e os organismos oomicetos sendo que, destes grupos, os ascomicetos são predominantes e, também, os mais estudados com relação a produção de metabólitos bioativos em relação aos demais (GUPTA et al., 2020). Destes grupos, destaca-se a biodiversidade dos fungos endofíticos agrupados em

vários gêneros, tais como: *Arthrotrrys*, *Dendrophora*, *Diatrypella*, *Oudenmansiella*, *Mucor* e *Phlebiopsis*, *Botryosphaeria*, *Coprinus*, *Curvularia*, *Eutypella*, *Fusarium*, *Microdochium*, *Glomerella*, *Neotyphodiu*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Aternaria* e outros gêneros frequentemente citados (ALMEIDA et al., 2005).

Há diferentes formas de se categorizar os fungos endofíticos, elas podem ser:

- Meio de reprodução, sexual ou assexual;
- Modo de transmissão (vertical e endófitos horizontal);
- Fonte de nutrição (negrotróficos ou biotróficos);
- Forma de representação de infecções (sintomática ou assintomática);
- Parte da planta hospedeira afetada (raízes e folhas);
- Base ecológica (GUPTA et al., 2020).

Desta forma, devido à grande diversidade e característica de produção de diversos compostos com atividades biológicas bem como enzimas, muitos estudos estão sendo realizados visando a avaliação do potencial desses metabólitos sendo que, mais de 200 compostos já foram relatados na literatura incluindo policetonas, xantonas, alcaloides, esteroides, terpenóides, entre outros (CAO et al., 2021) muitos deles com atividades biológicas ou com potencial para aplicação em processos industriais como, por exemplo, as substâncias capazes de atuar como biossurfactantes.

No entanto, muitos estudos ainda se fazem necessários, uma vez que existem mais de 300.000 plantas e, cada uma pode hospedar diversos fungos diferentes, o que leva a milhares de possibilidades de microrganismos com capacidade de produção de diversos compostos (FADIJI et al., 2020; GUPTA et al., 2020; DUTTA et al., 2014; AZEVEDO, 1998).

Como exemplo, é possível citar o fungo *Vouchered Mycorrhizae*, microrganismo estudado no presente trabalho, isolado a partir de caules de mandioca (FIALHO; VIEIRA, 2011) e que ainda não existem relatos em literatura, até a presente data, com relação ao seu metabolismo bem como seu potencial biológico para produção de biossurfactantes.

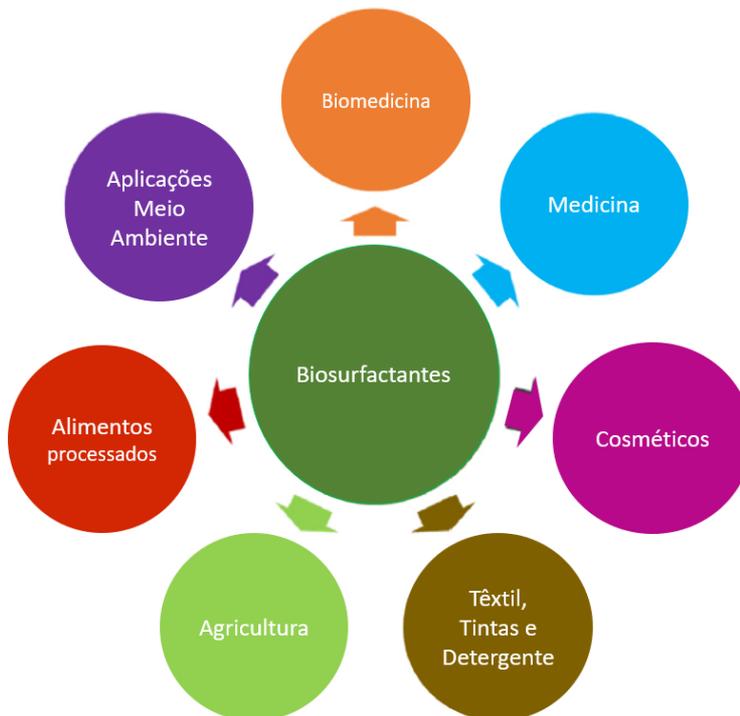
Por sua vez, a produção de mandioca é considerada de baixo custo e abundante, suas folhas e caules, são consideradas resíduos de uma cultura de subsistência bem adaptada às condições do Brasil, entre outras zonas tropicais das

Américas, África e Ásia (Parry et al., 2005; FIALHO; VIEIRA, 2011). Desta forma, se torna vantajosa a produção de microrganismos a partir destes resíduos.

3.4 APLICAÇÃO DOS SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Devido a vasta área de atuação, os surfactantes e biossurfactantes apresentam ampla importância econômica por terem aplicação tanto na ciência quanto na indústria (MYERS, 2005, p.32). Na aplicação industrial e de consumo, destacam-se desde produtos de limpeza (necessidade básica), passando pela área de saúde, alimentos, medicamentos, cosméticos, corantes, tintas, fibras, plásticos, petróleo, por serem um componente importantíssimo em muitos processos industriais (Figura 13) (JOHNSON et al., 2021; VIEIRA et al, 2021; VERMA et al., 2020; LAI 2006; MYERS, 2005, p.365).

Figura 13 - Aplicações industriais primárias dos Biossurfactantes



Fonte: Autora "adaptado de" Ingsel et al., 2022

Destaca-se também que, por serem esses compostos os principais ingredientes em formulações de sabões e detergentes, esta aplicação é a principal responsável pelo uso dos mesmos, devido as propriedades de emulsificação, entre

outras, tal como a espumação, uma característica muito importante na avaliação da eficácia destes produtos por consumidores (JESUS, et al., 2021).

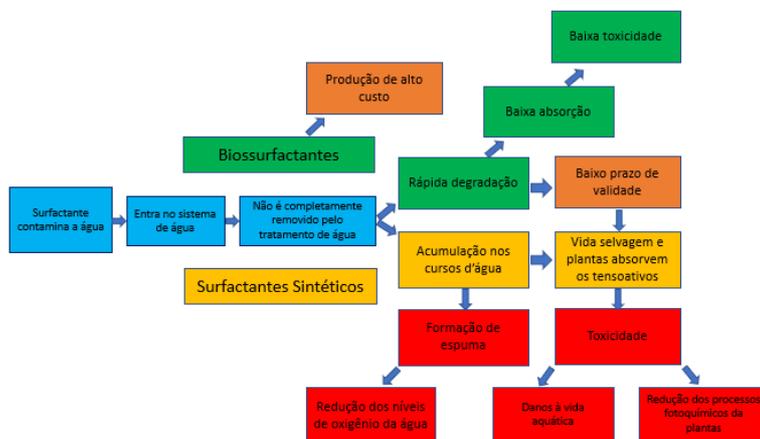
Outras aplicações que devem ser salientadas referem-se à utilização destes como fungicida, bactericida, inseticida e antiviral em diversos produtos como fármacos, cosméticos, alimentos, tintas e vernizes, têxtil, tingimento, polímeros, agroquímicos, entre outros (ASLAM et al., 2021; BANAT et al., 2021).

Destaque às aplicações como emulsificante, o que intensifica ainda mais os estudos para desenvolvimento de novas formulações de produtos de limpeza, produtos de higiene pessoal, utilizando principalmente, os biossurfactantes, devido a sua menor citotoxicidade e bioatividade (ASLAM et al., 2021; BANAT et al., 2021).

Também merece destaque a utilização de surfactantes ou biossurfactantes na extração do petróleo visando a redução dos impactos ambientais e favorecendo a inibição de corrosão, emulsificação e desemulsificação através de mudanças de pH, bem como por meio de melhorias no processo de extração. Também é observado um aumento nos últimos 5 anos, como comenta Banat et. Al (2021) pelo interesse por diferentes aplicações industriais de biossurfactantes, como na biorremediação de áreas contaminadas, aplicações em óleo, setor farmacêutico e novamente, o de cosméticos (BANAT et al., 2021).

Essa grande aplicabilidade dos surfactantes ou biossurfactantes em diversos setores para vários produtos, se deve, principalmente, à sua capacidade de redução da tensão superficial (BANAT et al., 2021), bem como a observação sobre o aspecto ambiental (Figura 14, Tabela 5).

Figura 14 – Aplicação dos biossurfactantes e surfactantes – aspecto ambiental



Fonte: Autor “adaptado de” Johnson et al., 2021

Tabela 5 – Empresas produtoras de biossurfactantes e aplicação

Empresa	País	Produto	Marca registrada	Aplicação
MG Intobio Co. LTD.	Coréia do Sul	soforolipídios	Sopholine®	Sabonete anti-acne, máscara facial
Allied Carbon Solution	Japão, EUA	soforolipídios	ACS-Sophor®	Cuidado com cabelos, anti-acne, antimicrobiana
Givaudan	Suíça	soforolipídios	Sopholiance® S	Antibactericida, anti-acne
Evonik Specialty Chemicals	Alemanha	soforolipídios, Ramnolipídios	ND	Cuidados pessoais, Xampu, gel para banho
Holifern Technology	Reino Unido	soforolipídios, lipídios de manosil eritritol	HoneySurfHoneySurf® LF/HF	Cuidados pessoais
Toyobo Technology	Japão	lipídios de manosil eritritol	SurfMellow®	Cuidados da pele, hidratante
Kanebo Cosmetics and AIST	Japão	lipídios de manosil eritritol	Twany Seasonal Essence®	Cuidados da pele, creme hidratante para pele
Biotopia Co. Ltd.	Coreia do Sul	lipídios de manosil eritritol	ND	Cuidados pessoais
Fraunhofer IGB	Alemanha	Lipídios de celobiose/ lipídios de manosil eritritol	ND	Emulsionantes, cosméticos
Sigma Aldrich	Alemanha	Ramnolipídios	ND	Emulsionantes
Paradigm Biomedical, Inc.	EUA	Ramnolipídios	ND	Antimicrobiana, cicatrização de feridas
Stepan Company Inc.	EUA	Ramnolipídios	NatSurFact®	Antimicrobiana, cicatrização de feridas
Glycosurf Inc.	EUA	Ramnolipídios	ND	Cuidados pessoais, insumos para limpeza na área médica
Biotensidon GmbH	Alemanha	Ramnolipídios	Rhapynal®	Cosméticos, farmacêuticos

Fonte: Autora “adaptado de” Onwosi et al., 2021

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são apresentados os materiais, os equipamentos e as metodologias experimentais adotadas na parte experimental para realização do presente trabalho.

4.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho foram:

- a) Batata dextrose ágar (Merck);
- b) Acetato de etila (Neon);
- c) Ácido acético (Neon);
- d) Acetato de sódio (Neon);
- e) Peptona (Merck);
- f) Glicose (Merck);
- g) Extrato de levedura (Merck);
- h) Sulfato de amônio (Neon);
- i) Azeite de oliva (Andorinha);
- j) Acetonitrila grau HPLC (Merck);
- k) Clorofórmio (Merck);
- l) Clorofórmio Deuterado (Merck);
- m) Dodecilssulfato de sódio 0,04N (Merck);
- n) Acetato de etila (Neon);
- o) Ramnolipídio – Biossurfactante R90 (Agae Technologies).
- p) sulfato de gentamicina

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram:

- a) Estufa modelo 515-C, Fanem;
- b) Autoclave horizontal, (SOC. FABBE LTDA);
- c) Freezer -80°C, Panasonic;
- d) Câmara climatizada MIR 554, Panasonic;
- e) Shaker - Orbital Shaker - Innova 43-Incubator Shaker Series;

- f) Ultrassom Ultraclear modelo USC 1600 A, Ultronic;
- g) Bomba t-Station 75, Edwards;
- h) Pipeta eletrônica 0,5-5 mL, Brand;
- i) Cromatógrafo HPLC Shimadzu, composto por bombas LC-20AD, detector de Índice de Refração RID-10A, Detector UV SPD-20A, Forno para coluna CTO-20A e controlador CBM-20A, Shimadzu;
- j) Tensiômetro KRUSS – Modelo K-100 - N° Série 30003340, KRUSS;
- k) Equipamento para análise de Ângulo de contato e formato de gota - KRUSS “Drop Shape analyzer” – Modelo DSA25E - N° Série 30003314, KRUSS;
- l) Espectrômetro de RMN Bruker Avance III HD 600, BRUKER.

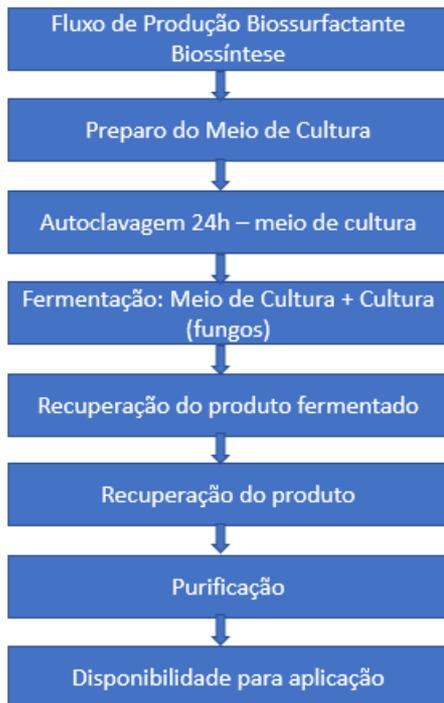
4.3 MÉTODOS

Nos itens dessa seção estão descritas as metodologias utilizadas durante o desenvolvimento do presente trabalho levando-se em consideração obtenção, fracionamento e caracterizações.

4.3.1 Fluxograma geral do trabalho

Na Figura 15, está descrito o fluxograma resumido de obtenção do biossurfactante pré-purificado obtido a partir do fungo CA10. Salienta-se que em todas as etapas foram realizadas caracterizações dos extratos e/ou frações.

Figura 15 - Fluxograma de obtenção do biossurfactante pré-purificado



Fonte: Autora

4.3.2 Obtenção dos fungos

Inicialmente, fungos foram isolados a partir de caules e folhas de mandioca e mantidos a 4°C em meio batata dextrose ágar (BDA) na Central de Laboratórios Químicos do Centro Universitário da FEI. Todos os fungos isolados foram enviados para identificação na BPI Biotecnologia. O processo foi realizado através do sequenciamento automático por eletroforese capilar utilizando-se o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) bem como o alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank (WHITE et al., 1990). Todos os fungos avaliados apresentaram 99% de identidade quando comparado com o fungo do banco de DNA.

Após a identificação, os fungos foram submetidos a três repiques consecutivos visando a ativação do sistema metabólico. Para isso, os fungos, no total de 12, foram submetidos a crescimento em meio sólido BDA, previamente esterilizado em autoclave. Após esse processo, foi realizada a adição de sulfato de gentamicina à concentração de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, atuando como agente antibiótico.

Os crescimentos dos fungos foram realizados por 7 dias à 23°C, em Câmara climatizada-Panasonic. Após o terceiro repique, os fungos foram submetidos ao crescimento em meio líquido para otimização das condições de produção de biossurfactantes.

4.3.3 Avaliação da produção de biossurfactantes

Durante a avaliação da produção de biossurfactantes por fungos associados a caules e folhas de mandioca, foram realizados os crescimentos dos mesmos, em meio sólido batata dextrose ágar previamente esterilizado em autoclave. Após esse processo foi realizada a adição de sulfato de gentamicina em uma concentração de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, usado como antibiótico. Todos os fungos foram submetidos ao processo de extração com solução tampão acetato (0,1 mol.L⁻¹) pH 6, sendo os respectivos extratos utilizados para a avaliação da produção de biossurfactantes por meio do teste de emulsificação. O potencial de atuação como biossurfactante foi comparado com um surfactante sintético, foi utilizado como referência o produto dodecilssulfato de sódio (SDS), em solução 0,04 mol. L⁻¹.

4.3.4 Influência do meio de cultivo na produção de biossurfactantes

Todos os fungos foram submetidos ao crescimento em meio líquido específico para aumentar a produção de compostos com potencial para atuar como biossurfactante, o meio líquido é composto por peptona (20 g.L⁻¹), glicose (20 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), sulfato de amônio (4 g.L⁻¹) e azeite de oliva (2%) (fonte extra de carbono), (MENESES et al., 2017; FERNANDES et al., 2020; RAPP et al., 2009). O meio de cultivo foi previamente esterilizado em autoclave e após esse processo, foi realizada a adição de sulfato de gentamicina em uma concentração de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, como antibiótico.

O tempo de crescimento foi de 7 dias, temperatura de 30°C, pH 6 e rotação do shaker de 180 rpm. Finalizado o processo, os micélios foram separados por filtração a vácuo, seguida de centrifugação a 6000 rpm e os extratos obtidos foram submetidos a caracterização, via determinação do índice de emulsificação e avaliação da redução da tensão superficial. O potencial de atuação como biossurfactante foi comparado com a solução padrão de dodecilssulfato de sódio 0,04 mol.L⁻¹ (SDS).

4.3.5 Influência do tempo, pH e temperatura

Após selecionado o fungo com maior produtividade para produção de biossurfactante (CA10 - *Vouchered mycorrhizae*), o mesmo foi novamente submetido ao crescimento em meio líquido conforme descrito anteriormente. Durante essa etapa, variou-se o tempo, a temperatura e, o pH; visando otimizar a produção desta classe de compostos através de um planejamento estatístico (Tabela 6). A rotação utilizada no shaker para esse processo foi de 180 rpm.

Tabela 6 – Planejamento experimental utilizado na otimização do crescimento

Variáveis codificadas			Variáveis não codificadas		
pH	Tempo (dia)	Temperatura (°C)	pH	Tempo (dia)	Temperatura (°C)
+1	+1	+1	8,00	13,0	35,0
0	0	0	6,00	9,0	29,0
0	0	$+\sqrt{3}$	6,00	9,0	39,1
0	0	$-\sqrt{3}$	6,00	9,0	18,9
0	$-\sqrt{3}$	0	6,00	2,3	29,0
$+\sqrt{3}$	0	0	9,36	9,0	29,0
+1	+1	-1	8,00	13,0	23,0
+1	-1	+1	8,00	5,0	35,0
-1	-1	+1	4,00	5,0	35,0
-1	+1	+1	4,00	13,0	35,0
+1	-1	-1	8,00	5,0	23,0
-1	+1	-1	4,00	13,0	23,0
-1	-1	-1	4,00	5,0	23,0
0	0	0	6,00	9,0	29,0
$-\sqrt{3}$	0	0	2,64	9,0	29,0
0	$+\sqrt{3}$	0	6,00	15,7	29,0

Fonte: Autora

Após o crescimento, cada sistema foi filtrado e em seguida, foram submetidos à centrifugação à 6000 rpm por 30 min, sendo o filtrado também avaliado em relação à produção de biossurfactante. O potencial de atuação como biossurfactante foi comparado com o padrão dodecilssulfato de sódio (SDS), solução 0,04 mol.L⁻¹. O pH de cada meio foi ajustado pela adição de solução de NaOH ou de HCl com concentração de 0,1 mol.L⁻¹ respectivamente.

Os dados de tensão superficial foram levados em consideração quanto a determinação da melhor condição de crescimento do fungo em meio líquido, visando a produção de biossurfactantes. Para isso, foi aplicado um planejamento estatístico por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (planejamento fatorial 2^3 , com seis pontos axiais e dois centrais). Sabendo-se do difícil controle do erro aleatório em experimentos com microrganismos, o modelo experimental escolhido auxiliou na avaliação da influência da temperatura, tempo e pH, na produção de material com características biossurfactantes, por meio de quantidades/combinções experimentais suficientes e que proporcionem estimativas adequadas aos efeitos dos fatores conhecidos e, também, de fatores eventualmente desconhecidos, consequentemente verificando-se o material produzido, por meio da redução da tensão superficial, como sendo um dos principais parâmetros de avaliação do produto.

Os resultados foram avaliados através da análise das superfícies de contorno, bem como, utilizando a função de desejabilidade e avaliação das variáveis que mais influenciaram na produção de biossurfactantes. Os dados foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA 14.0 (TIBCO Software Inc., 2020, Palo Alto, California, USA).

4.3.6 Pré-purificação dos biossurfactantes

Após a determinação da condição ideal para realização do crescimento do fungo CA10 (*Vouchered mycorrhizae*) em meio líquido, foi realizado um novo crescimento nesta condição (pH = 8,0, T = 30°C, tempo = 15 dias), os compostos com potencial para atuarem como biossurfactantes foram pré purificados, utilizando-se a técnica de extração líquido-líquido. Foi avaliada a eficiência da pré-purificação, através da realização de dois processos de extração com diferentes solventes. No primeiro processo, foi utilizado somente clorofórmio e para o segundo processo, foram utilizadas extrações consecutivas, inicialmente com acetato de etila e posteriormente, com o clorofórmio.

Para isso, 300 mL de extrato foram submetidos ao processo de extração líquido-líquido utilizando-se 200 mL de clorofórmio. Foram realizadas duas extrações consecutivas e, após finalizadas as extrações, o material foi concentrado em rotoevaporador e armazenado para posterior realização das caracterizações.

No segundo processo, 300 mL do extrato foi submetido inicialmente a duas extrações consecutivas com 200 mL de acetato de etila e, posteriormente, duas extrações com 200 mL de clorofórmio. Os extratos obtidos (fração clorofórmio e fração acetato de etila) foram concentrados em rotaevaporador e armazenados para realização das caracterizações.

Todas as frações foram avaliadas via HPLC para verificação da eficiência do processo de extração. Também foram realizadas análises via RMN-¹H das frações obtidas do resíduo de extração e do extrato inicial bem como determinações do índice de emulsificação, tensão superficial e avaliação de ângulo de contato.

4.3.7 Análises de caracterizações

Durante o desenvolvimento do trabalho foram realizadas caracterizações por meio da determinação da tensão superficial, índice de emulsificação, HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência, via RMN - ressonância magnética nuclear e avaliação do ângulo de contato.

4.3.7.1 Índice de emulsificação

Para avaliação do índice de emulsificação, foram utilizados 2,0 mL de cada extrato obtido e misturados com 2,0 mL de azeite de oliva, a mistura foi agitada em vórtex durante 2 min. Após essa etapa, cada sistema foi deixado em repouso por 24 h sendo posteriormente calculado o índice de emulsificação por meio divisão entre as medidas da camada emulsionada pela medida da altura total da mistura em centímetros, multiplicando-se o resultado por 100, para se obter o percentual de emulsificação (Eq. 1),

$$IE_{24}(\%) = \frac{\text{altura da camada emulsificada}}{\text{Altura total da camada de líquido}} \times 100 \quad (1)$$

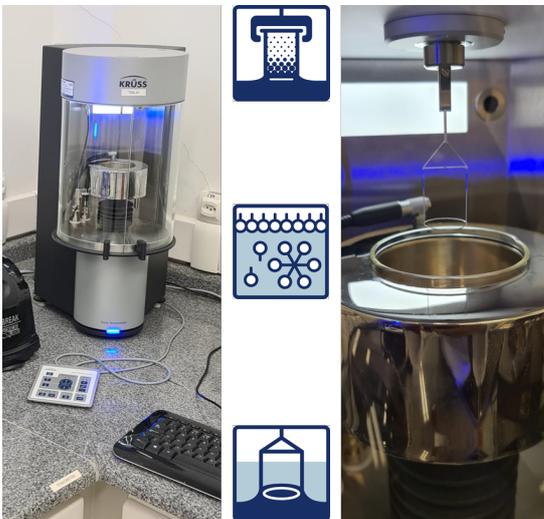
em que: IE_{24} (%) representa a porcentagem de emulsificação.

4.3.7.2 Tensão superficial

Este parâmetro é importante, pois surfactantes são substâncias capazes de alterar a tensão superficial, e a transferência de massas em interfaces líquidas, esta é uma propriedade chave de moléculas anfífilas, é requerido para a formação de emulsões cineticamente estáveis (JAHAN et al., 2020), é a mais comumente medida para avaliação de surfactantes, pois depende diretamente da substituição das moléculas de solvente da interface por moléculas de surfactantes.

Desta forma, após o cultivo dos fungos em diferentes condições, as tensões superficiais dos extratos e resíduos, foram ambas avaliadas em tensiômetro automático pelo Método do Anel - “Du Noüy Ring” por meio de leitura direta enquanto resíduos pós-extração (conforme 4.3.5), e também por leitura direta dos extratos diluídos em água (20mL), enquanto extratos pós extração. Todos os ensaios analisados em um tensiômetro KRUSS - modelo K100, Serial Nº 000340 (Figura 16).

Figura 16 - Tensiômetro utilizado para avaliação de tensão superficial



Fonte: Autora

O método do anel de Du Noüy é o mais comumente utilizado para medidas de tensão superficial. Neste método, um anel de platina, em um plano paralelo à superfície líquida analisada., é imerso no líquido, em um ângulo de contato perpendicular à superfície (DALVIN, 2011, p. 112). As leituras são realizadas nos resíduos e extratos do material líquido após filtrado, à temperatura de 21°C, em

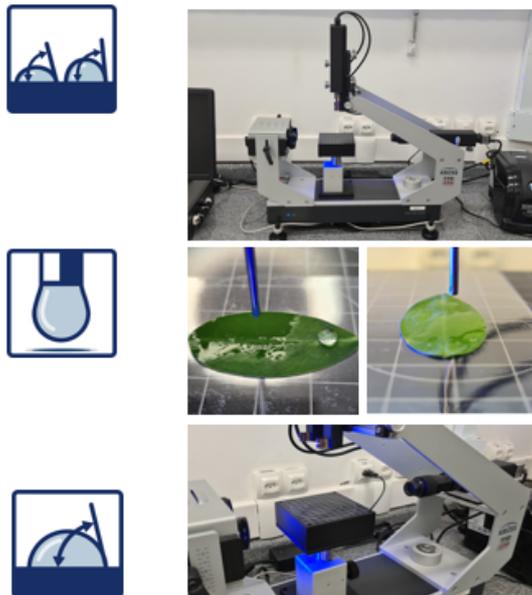
programa automático de leitura entre 1 e 7 minutos. São realizadas análises de força x tempo na avaliação da redução da tensão superficial para cada amostra avaliada.

Como referência, é utilizada o valor da tensão superficial da água à 20 °C, que apresenta um valor de 72,75 mN.m⁻¹.

4.3.7.3 Ângulo de contato

A avaliação do ângulo de contato foi realizada pelo equipamento para determinação de formato de gota da marca KRUSS - “Drop Shaper analyzer”, modelo DSA25E, Serial N° 30003314 (Figura 17), esta avaliação é empregada para analisar a capilaridade e umectação de agentes surfactantes, onde pode-se avaliar o comportamento do agente surfactante em diferentes superfícies, tal como inox, vidro, plástico ou outras.

Figura 17 - Análise de ângulo de Contato



Fonte: Autora

As leituras foram realizadas nos resíduos e seus extratos do material líquido após filtrado, à temperatura de 21°C, em programa automático de leitura do equipamento. Assim, foi possível quantificar essa tendência do líquido aderir ou não em uma parede sólida pelo ângulo de contato. Esse ângulo é medido entre a parede e a tangente à superfície do líquido no ponto de contato com a parede.

Ambas capilaridade e umectação, envolvem um sistema de três fases (sólido, líquido e gasoso), a gota do líquido é colocada sobre uma superfície sólida, seu ângulo inicial é tangencial à superfície do líquido no ponto de contato com a parede sólida, sendo em um ângulo de 180° , quando a força peso que atua na gota, a espalha, a tensão superficial reduz o ângulo da gota em relação à superfície sólida e estas forças entram em equilíbrio em diferentes dimensões, neste ponto de contato líquido-sólido, as três forças interfaciais envolvidas, estão em equilíbrio (DALTIM, 2011, p. 137).

4.3.7.4 Ressonância magnética nuclear

A fração pré purificada foi caracterizada via Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (RMN- H^1), foi utilizado como solvente, o DMSO deuretado (dimetilsulfóxido). A análise foi realizada em um Espectrômetro de RMN Bruker Avance III HD 600 (Figura 18), do Instituto de Química – UNESP – Araraquara. A caracterização dos compostos orgânicos pela espectroscopia de RMN, é o método muito aplicado para identificar compostos orgânicos.

Figura 18 - Foto ilustrativa do Espectrômetro de RMN



Fonte: Autora

A análise foi feita nos extratos do material líquido após filtrado, conforme descrição dos extratos: Fração clorofórmio direto, Fração clorofórmio e Fração acetato-clorofórmio.

4.3.7.5 Análises via HPLC

As análises via HPLC do extrato bruto obtido a partir do fungo CA10 bem como o extrato obtido após a realização do crescimento em meio líquido e da fração obtida após a pré-purificação, foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu (Figura 19), utilizando-se uma coluna C18 Phenomenex ODS-3 100A com comprimento de 250 mm e diâmetro de 4,6 mm. Durante as análises foi utilizado um gradiente de acetonitrila de 5 % até 100 %, conforme indicado na Tabela 7 com detector UV, operando em comprimento de onda de 254 nm.

Tabela 7 – Gradiente utilizado nas análises via HPLC

Tempo	Acetonitrila(%)	Água
0	2	98
30	2→100	98→0
40	100	0
45	100→2	0→98

Fonte: Autora

Figura 19 - Foto ilustrativa do equipamento utilizado



Fonte: Autora

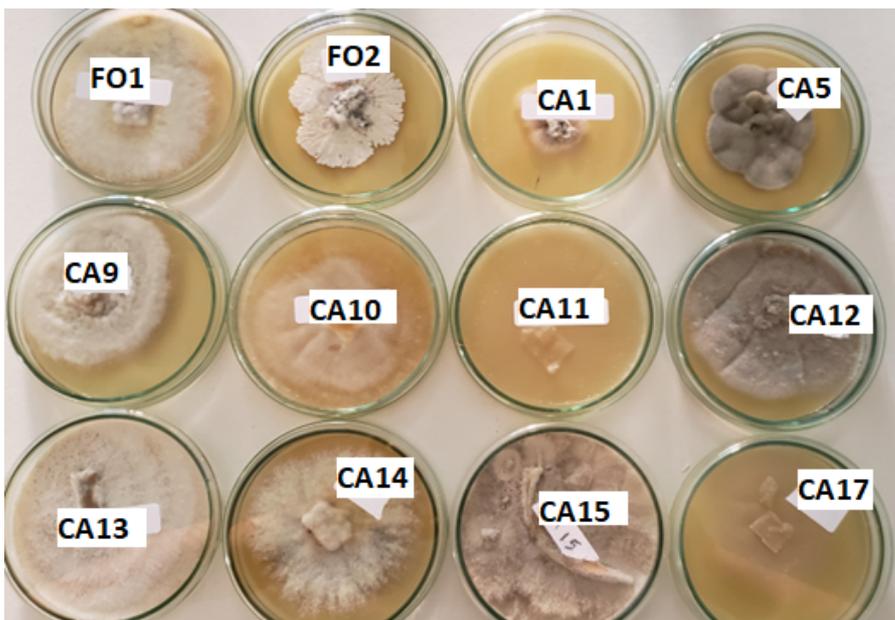
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos itens desta seção estão descritos os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho, que teve como objetivo a avaliação da produção de biossurfactantes por fungos associados a caules e folhas de mandioca, visando a possibilidade de aplicação futura em diferentes tipos de formulações, tais como cosméticos, detergentes, cuidados pessoais entre outros. Também é abordado, o planejamento desenvolvido neste estudo.

5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados 12 fungos isolados de caules e folhas de mandioca, previamente identificados conforme descrito na tabela 8 e exemplificados na figura 20. Dessa forma, os mesmos foram submetidos a três repiques consecutivos em meio BDA (batata dextrose agar) visando a ativação do sistema metabólico dos mesmos. Posteriormente, iniciou-se a avaliação da produção de compostos com capacidade de atuar como biossurfactantes por meio de processo fermentativo.

Figura 20 – Fungos obtidos a partir de caules e folhas de mandioca



Fonte: Autora

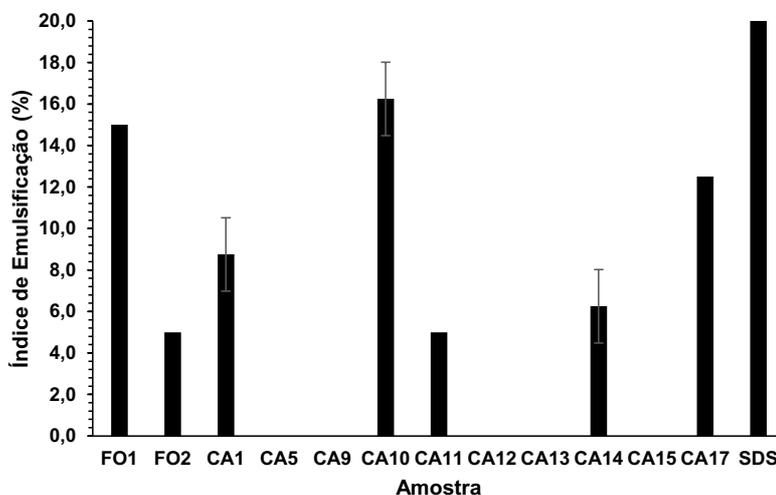
Tabela 8 – Identificação dos fungos avaliados

Fungo	Identificação
<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>	FO1
<i>Xylaria sp</i>	FO2
<i>Microdochium lycopodium</i>	CA1
<i>Alternaria sp.</i>	CA5
<i>Diaporthe endophytica</i>	CA9
<i>Vouchered mycorrhizae</i>	CA10
<i>Phanerochaete australis</i>	CA11
<i>Diaporthe caatingaensis</i>	CA12
<i>Stenocarpella maydis</i>	CA13
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	CA14
<i>Sordariomycetes sp.</i>	CA15
<i>Phanerochaetaceae sp.</i>	CA17

Fonte: Autora

Após o terceiro repique, cada fungo foi submetido ao processo de extração utilizando tampão acetato pH 6,0 sendo avaliado o índice de emulsificação de cada extrato obtido, para seleção do fungo que apresentasse o maior potencial de produção de biossurfactante. Após a análise dos resultados, verificou-se que os fungos que se mostraram mais promissores foram os fungos identificados como FO1 (*Cladosporium xanthochromaticum*) e, CA10 (*Vouchered mycorrhizae*), (Figura 21, Tabela 9).

Figura 21 – Comparação dos índices de emulsificação dos extratos



Fonte: Autora

Tabela 9 - Índices de emulsificação para cada extrato (crescimento em BDA)

Extrato	Índice de emulsificação (%)
FO1	15,0 ± 0,0
FO2	5,0 ± 0,0
CA1	8,8 ± 1,8
CA5	0,0 ± 0,0
CA9	0,0 ± 0,0
CA10	16,3 ± 1,8
CA11	5,0 ± 0,0
CA12	0,0 ± 0,0
CA13	0,0 ± 0,0
CA14	6,3 ± 1,8
CA15	0,0 ± 0,0
CA17	12,5 ± 0,0

Fonte: Autora

Estes fungos apresentaram os maiores valores de índices de emulsificação, característica observada em vários biossurfactantes compostos por lipopolissacarídeos ou lipoproteínas, assim como diversos surfactantes químicos (VARJANI; UPASANI, 2017).

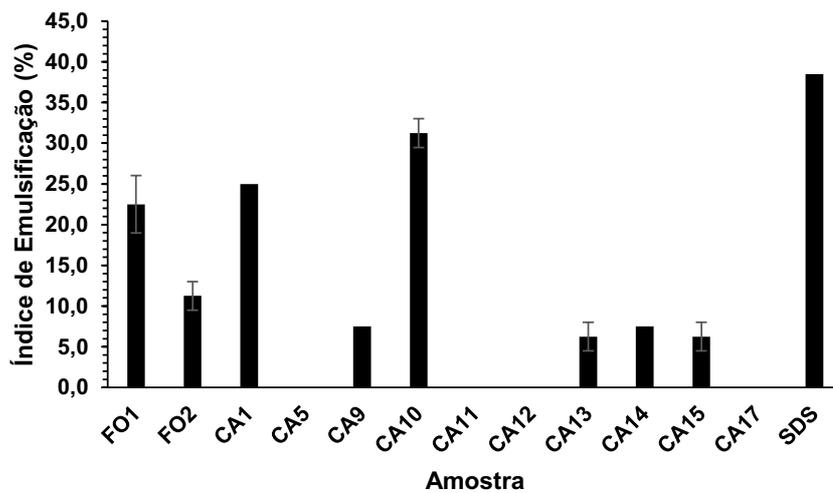
Após a obtenção dos dados referentes a análise preliminar, foi realizado um novo crescimento de cada fungo em meio líquido específico, para estimular a produção de biossurfactantes, sendo então os extratos obtidos, avaliados através da determinação do índice de emulsificação, bem como avaliação da redução de tensão superficial, que segundo Ferreira et al. (2020), se mostra o método mais utilizado para avaliação da presença de compostos com capacidade para atuar como biossurfactantes a partir de extratos biológicos.

Através da análise dos resultados de índice de emulsificação (Figura 22, Tabela 10), verifica-se um aumento do mesmo de 50 % para fungo FO1 e de 92 % para fungo CA10 quando comparados aos valores iniciais obtidos a partir da extração dos compostos bioativos diretamente do fungo, o que sugere a produção de compostos com potencial para atuar como biossurfactante principalmente por CA10 (*Vouchered mycorrhizae*), (em relação aos fungos CA5, CA9, CA12, CA13 e CA15, não foi detectado índice de emulsificação, Figuras 21 e 22).

Salienta-se também, segundo Ferreira e colaboradores (2020) que, muitas vezes, compostos bioemulsificantes não levam a uma redução significativa da tensão

superficial e, desta forma, sugere que as duas características não se correlacionam, o que pode levar a uma seleção inicial equivocada, uma vez que moléculas com potencial para atuar como biossurfactante nem sempre são bioemulsificantes (VARJANI; UPASANI, 2017), sendo verificada, aqui neste contexto, maior aplicabilidade de compostos com capacidade de redução da tensão superficial.

Figura 22 – Comparação dos dados de índice de emulsificação dos extratos



Fonte: Autora

Tabela 10 – Índices de emulsificação de cada extrato (meio líquido)

Extrato	Índice de emulsificação (%)
FO1	22,5 ± 3,5
FO2	11,3 ± 1,8
CA1	25,0 ± 0,0
CA5	0,0 ± 0,0
CA9	7,5 ± 0,0
CA10	31,3 ± 1,8
CA11	0,0 ± 0,00
CA12	0,0 ± 0,00
CA13	6,3 ± 1,8
CA14	7,5 ± 0,0
CA15	6,3 ± 1,8
CA17	0,0 ± 0,0

Fonte: Autora

Visando a confirmação dos resultados, foi realizada a avaliação da tensão superficial, sendo verificados os melhores resultados para o fungo CA10. Analisando a tensão superficial dos meios de crescimento (ricos em metabólitos secretados pelo fungo), verifica-se uma maior redução da tensão superficial, quando comparada com a tensão superficial da água, pelo extrato obtido a partir de CA10 (Figuras 23 e 24, Tabela 11), o que pode ser explicado pela provável presença de maiores teores de compostos que possam atuar como biossurfactantes, e que corrobora com os dados de índice de emulsificação apresentados anteriormente.

Salienta-se que o percentual de redução da tensão superficial de cada fungo em relação à água, foi calculado subtraindo-se o valor da tensão superficial individual de 100 e dividindo o resultado obtido pelo valor da tensão superficial da água multiplicando-se por 100, conforme descrito na equação 2.

$$(\%) \text{ Redução TS, } 21^{\circ}\text{C} = \frac{TS_{\text{produto}}}{TS_{\text{água}}} \times 100 \quad (2)$$

em que: (%) Redução TS, representa a porcentagem de redução da tensão superficial do produto de fermentação em relação à água, à 21°C.

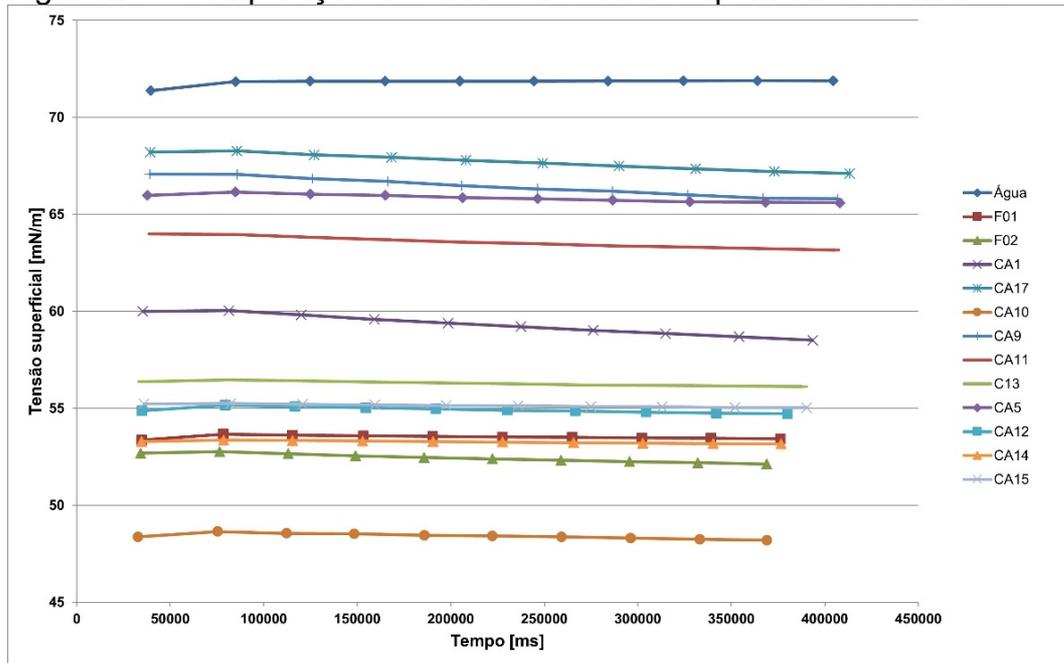
Tabela 11 – Dados de tensão superficial obtidos (meio líquido)

Extrato	Tensão superficial (mN.m ⁻¹)
FO1	53,47
FO2	52,26
CA1	58,85
CA5	65,68
CA9	66,02
CA10	48,31
CA11	63,31
CA12	54,80
CA13	53,18
CA14	53,20
CA15	55,07
CA17	67,35
Água	71,88

Fonte: Autora

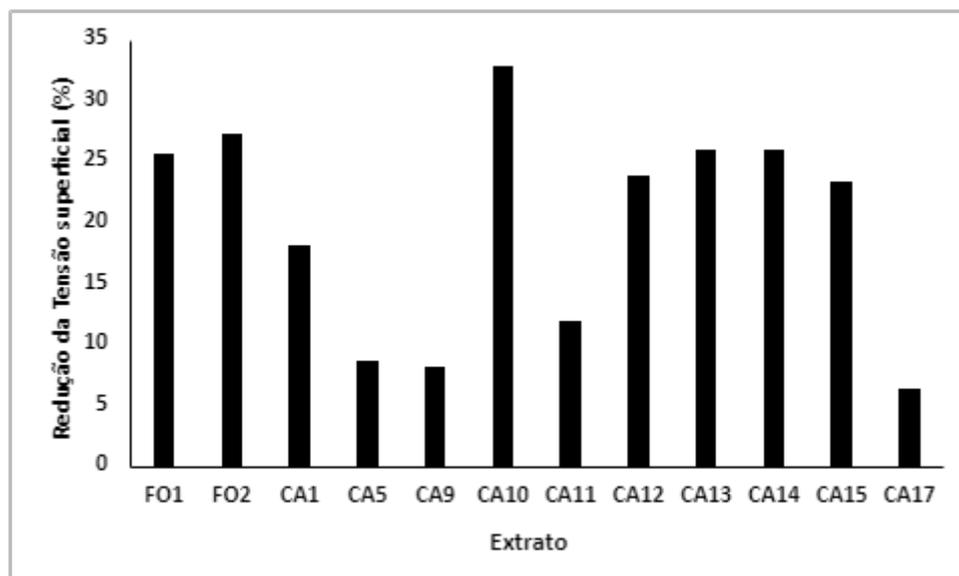
Desta forma, o fungo CA10 foi selecionado para a continuidade do trabalho e avaliação da otimização das condições de produção de biossurfactantes por meio da aplicação de planejamento estatístico, modificando-se o tempo de crescimento, a temperatura, bem como o pH do meio.

Figura 23 – Comparação dos dados de tensão superficial dos extratos



Fonte: Autora

Figura 24 – Comparação da redução da tensão superficial em relação a água



Fonte: Autora

5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR CA10

Após a verificação da eficiência de produção de compostos capazes de atuar como biossurfactantes pelo fungo CA10 (*Vouchered mycorrhizae*), foi realizada a otimização da condição de crescimento, (visando maximizar a produção de compostos). Desta forma, foram modificados o pH do meio de cultura, bem como o tempo e, temperaturas de crescimento. Esta avaliação, se deve ao fato de ocorrerem modificações na produção de compostos a partir de microrganismos em função da variação das condições de crescimento e, especificamente, em função da maior produção desta classe de compostos na fase exponencial de crescimento das espécies (BANAT et al., 2021).

Avaliando-se os dados obtidos pelos ensaios de índice de emulsificação e de redução de tensão superficial (Tabelas 12-14; Figuras 25-27), verifica-se que a utilização do tempo, acima de 9 dias, favoreceu a produção de compostos que levaram a redução da tensão superficial, bem como temperaturas próximas de 29°C e um pH ligeiramente ácido.

Tabela 12 – Condições de crescimento utilizadas

Condição	Temperatura (°C)	pH	Tempo (dia)
A	29	6	15
B	18,9	6	9
C	29	2,64	9
D	29	6	2,3
E	29	9	9
F	23	8	5
G	23	4	5
H	35	8	5
I	39,1	6	9
J	35	8	13
K	29	6	9
L	29	6	9
M	35	4	5
N	35	4	13
O	23	8	13
P	23	4	13

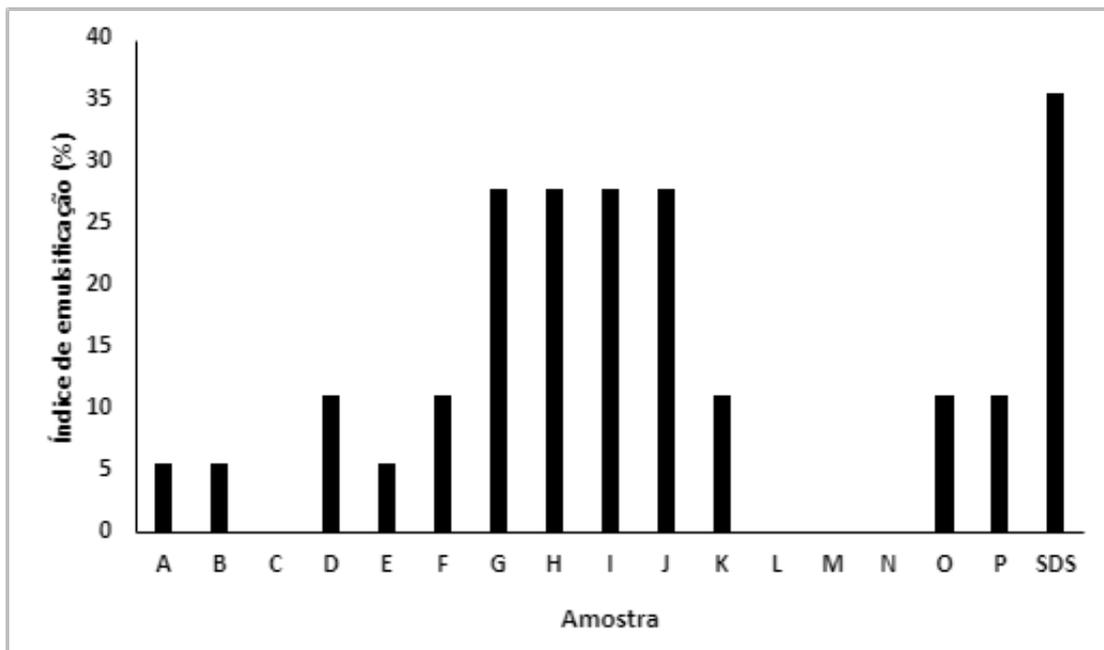
Fonte: Autora

Tabela 13 – Dados de emulsificação mudando a condição de crescimento

Condição	Temperatura (°C)	pH	Tempo (dia)	Índice de emulsificação (%)
A	29	6	15	2,5
B	18,9	6	9	2,5 ± 0,0
C	29	2,64	9	0,0 ± 0,0
D	29	6	2,3	5,0 ± 0,0
E	29	9	9	2,5 ± 1,8
F	23	8	5	5,0 ± 0,0
G	23	4	5	12,5 ± 0,0
H	35	8	5	12,5 ± 0,0
I	39,1	6	9	12,5 ± 0,0
J	35	8	13	12,5 ± 0,0
K	29	6	9	5,0 ± 1,8
L	29	6	9	0,0 ± 3,5
M	35	4	5	0,0 ± 0,0
N	35	4	13	0,0 ± 0,0
O	23	8	13	5,0
P	23	4	13	5,0

Fonte: Autora

Figura 25 – Comparação dos índices de emulsificação obtidos nos tratamentos



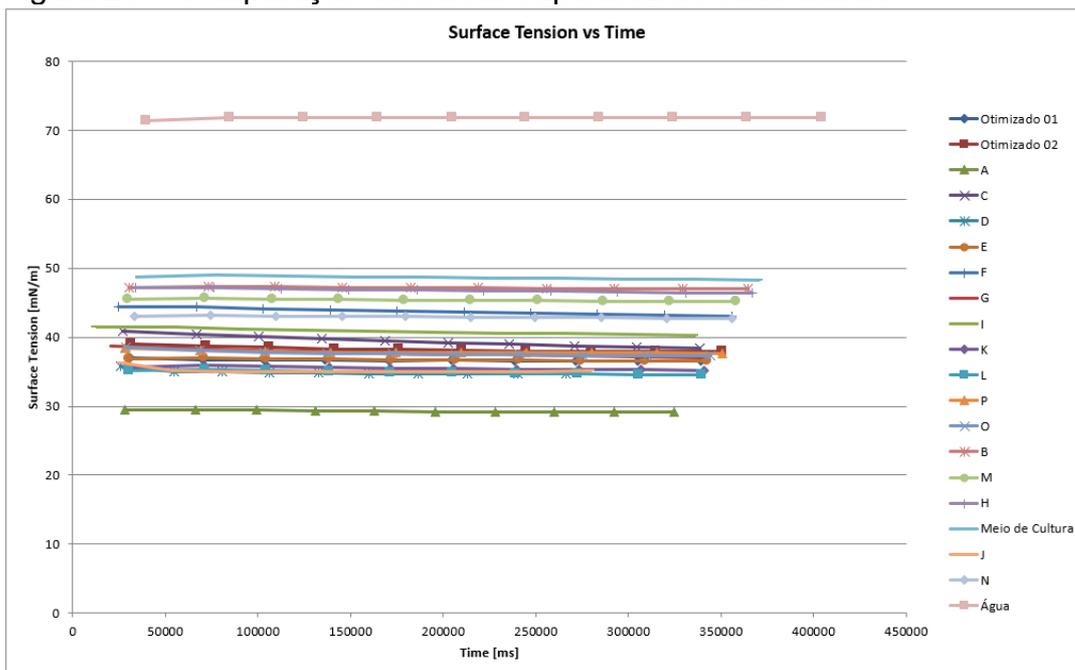
Fonte: Autora

Tabela 14 – Dados de tensão superficial

Amostra	Temperatura (°C)	pH	Tempo (dia)	Tensão superficial (mN.m ⁻¹)
A	29	6	15	30
B	18,9	6	9	47
C	29	2,64	9	39
D	29	6	2,3	35
E	29	9	9	37
F	23	8	5	43
G	23	4	5	37
H	35	8	5	47
I	39,1	6	9	41
J	35	8	13	35
K	29	6	9	35
L	29	6	9	35
M	35	4	5	45
N	35	4	13	43
O	23	8	13	37
P	23	4	13	38
Meio de cultura				48
SDS				33
Água				70

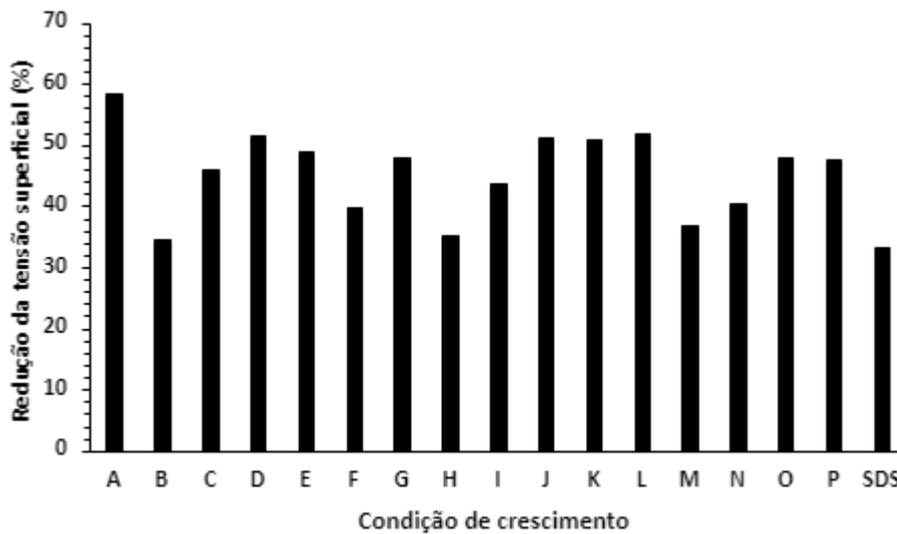
Fonte: Autora

Figura 26 – Comparação da tensão superficial de cada extrato



Fonte: Autora

Figura 27 – Redução na tensão superficial em função da condição de crescimento



Fonte: Autora

É importante destacar que esses resultados corroboram com dados descritos por Sarubbo e colaboradores (2022), que descreve como pH ideais para produção de biossurfactantes entre os valores de 5,7 e 7,8 e temperaturas entre 27 e 30°C. É verificado, no entanto, um antagonismo em relação a avaliação do índice de emulsificação, uma vez que foram observados valores significativamente elevados ao utilizar-se tempos menores de crescimento e temperaturas variadas, corroborando com o que foi verificado por Ferreira et al., (2020) conforme citado anteriormente, onde compostos bioemulsificantes não levam a uma redução significativa da tensão superficial e desta forma, sugere que as duas características não se correlacionam, podendo levar a uma seleção inicial equivocada, uma vez que moléculas com potencial para atuar como biossurfactante nem sempre são bioemulsificantes.

Assim como descrito por Drakontis et al. (2020), existem importantes aspectos que devem ser levados em consideração quando se avalia as distinções entre compostos biossurfactantes e compostos com aspectos bioemulsificantes. Quando compostos biossurfactantes apresentam baixa massa molar, os mesmos se mostram melhores em reduzir a tensão superficial na interface ar-água e a tensão interfacial da interface óleo-água. Diferentemente, compostos que apresentam alta massa molar, verifica-se que os mesmos são mais efetivos na estabilização de sistemas de emulsões óleo em água agindo como bioemulsificantes.

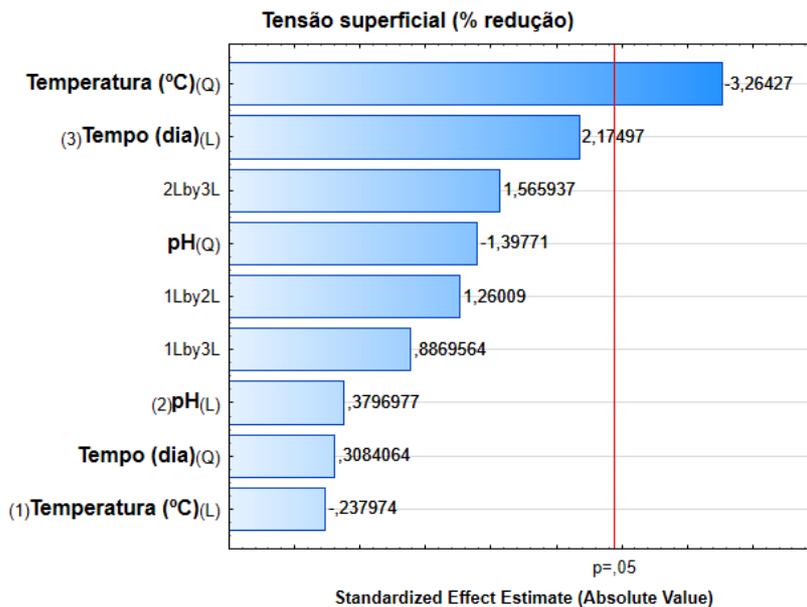
Dessa forma, levando-se em consideração os dados obtidos, foram utilizados os resultados de redução da tensão superficial, para avaliação da melhor condição de crescimento do fungo, na avaliação da produção de compostos com potencial para atuar como biossurfactante, através da realização de uma análise estatística, por meio do programa Statistica (versão 14.0.0.15 - 1984-2020 TIBCO Software INC.).

Analisou-se, assim, os resultados através do gráfico de Pareto, em que o efeito de cada variável é padronizado e a interação é calculada pela equação 3 com um nível de confiança de 95%. Desta forma, verifica-se que a variável que mais influenciou na produção dos compostos desejados foi a temperatura (termo quadrático) (Figura 28).

$$t_{\text{cal}} = \frac{\theta^{\wedge}}{EP(\theta^{\wedge})} \quad (3)$$

em que: θ^{\wedge} representa o valor do efeito e $EP(\theta^{\wedge})$ o erro padrão para cada efeito

Figura 28 – Gráfico de Pareto para redução da tensão superficial



Fonte: Autora

A análise da estimativa dos efeitos corrobora com os dados obtidos via análise do diagrama de Pareto (Tabela 15), uma vez que a análise dos resultados, considerando um valor de p menor que 0,05, mostra maior influência da temperatura no processo. Esse dado pode ser explicado pela redução do crescimento do fungo em temperaturas elevadas devido à baixa resistência do mesmo e destruição dos micélios. Verifica-se também, embora não sendo considerada na análise como fator

mais relevante, que o tempo (modo linear) de crescimento também se mostrou uma variável importante, uma vez que o fungo necessita de tempo suficiente para crescimento e secreção dos compostos de interesse.

Tempos muito curtos não são suficientes para ativação do metabolismo e produção em grande quantidade de compostos provenientes de seu metabolismo secundário. Com relação ao pH (faixa entre 6 – 9), o mesmo não se mostrou um parâmetro fundamental no crescimento do fungo e produção de biossurfactantes.

Tabela 15 – Estimativa dos efeitos para o crescimento de CA10

Fatores ($r^2 = 0,8013$)	Coefficiente	Erro padrão	t (6)	p	-95 %	+95 %
Média	18,4917	3,400564	5,43782	0,001606	10,1708	26,81254
Efeitos						
T (°C) (L)	-0,6211	2,610080	-0,23797	0,819820	-7,0078	5,76550
T (°C) (Q)	-10,3236	3,162605	-3,26427	0,017157	-18,0622	-2,58498
pH (L)	0,9919	2,612224	0,37970	0,717246	-5,4000	7,38374
pH (Q)	-4,4356	3,173461	-1,39771	0,211695	-12,2008	3,32961
Tempo (dia) (L)	5,6885	2,615441	2,17497	0,072563	-0,7112	12,08826
Tempo (dia) (Q)	0,9838	3,189829	0,30841	0,768200	-6,8215	8,78899
Interações						
T (°C) X pH	4,2988	3,411528	1,26009	0,254428	-4,0489	12,64654
T(°C) X tempo (dia)	3,0259	3,411528	0,88696	0,409244	-5,3218	11,37358
pH X Tempo (dia)	5,3422	3,411528	1,56594	0,168403	-3,0055	13,68995

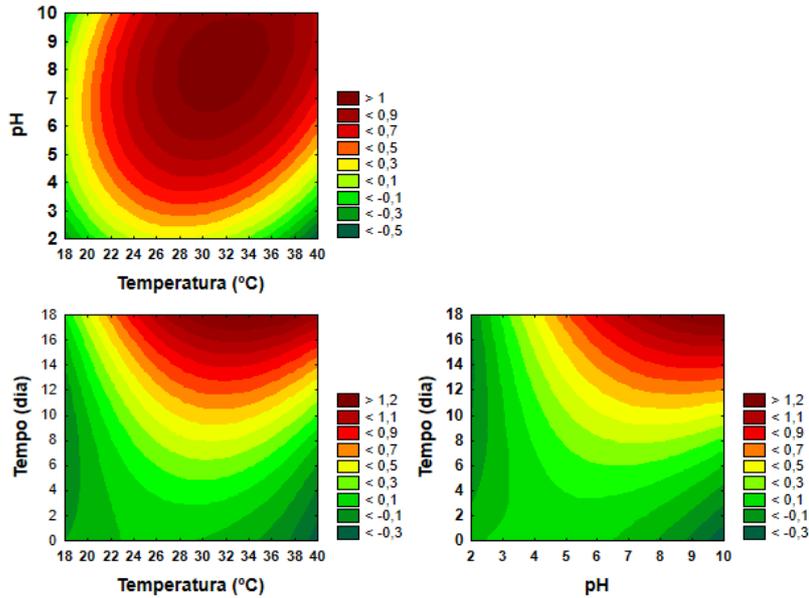
Fonte: Autora

Através da análise das superfícies de contorno (Figura 29) também foi possível determinar que temperaturas entre 27°C e 35°C, pH ligeiramente básicos e tempos superiores a 10 dias favorecem a produção de compostos com potencial para atuar como biossurfactante. Verifica-se também que pH ácidos desfavorecem a produção de biossurfactantes bem como tempos muito baixos, que não são suficientes para ativar o metabolismo do fungo.

Utilizando-se a função de desejabilidade, foi possível determinar a condição ideal para crescimento do fungo e produção de compostos com potencial para atuar como biossurfactante (Figura 30). Essa condição foi a utilização de um pH igual a 8, uma temperatura de 30°C e um tempo de crescimento de 15 dias. Os dados obtidos apresentam uma boa confiabilidade, uma vez que a desejabilidade obtida foi 1, porém, para validação dos resultados, foi realizado um novo crescimento nessa condição e, o extrato obtido foi avaliado via determinação da tensão superficial, índice de

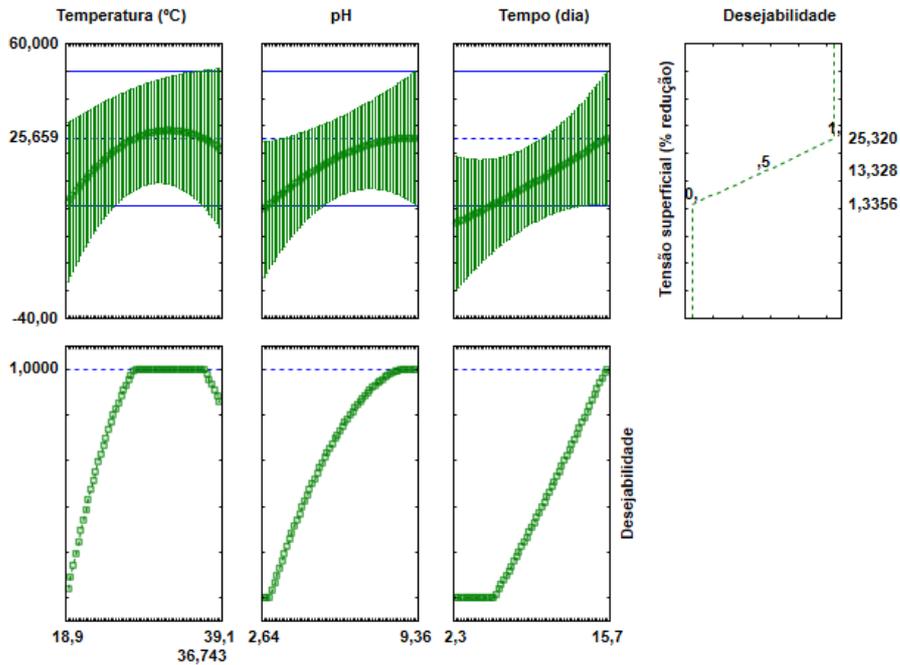
emulsificação e, ângulo de contato. Após a realização dessas análises, foi realizada a pré purificação do extrato visando a identificação da classe de compostos responsável pela ação como biossurfactante.

Figura 29 – Superfícies de contorno obtidas durante a análise estatística



Fonte: Autora

Figura 30 – Otimização das condições de crescimento



Fonte: Autora

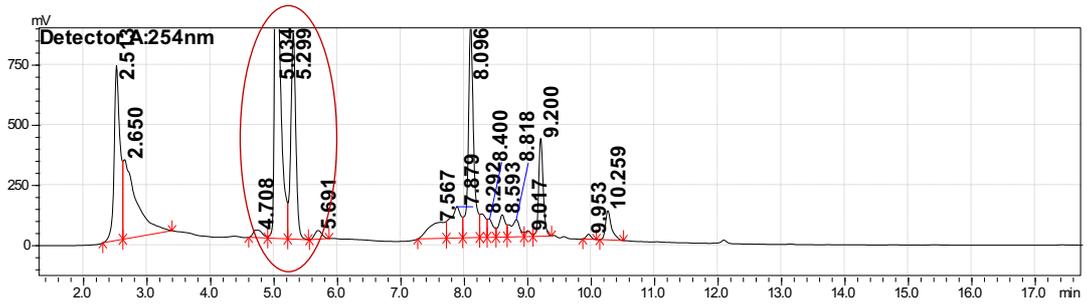
5.3 PRÉ PURIFICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Após a determinação da condição ideal para crescimento do fungo CA10 (pH = 8, temperatura = 30°C e, tempo = 15 dias), visando a produção de compostos com potencial para atuar como biossurfactante, foi realizado um novo crescimento nessa condição e, posteriormente, realizada a pré-purificação através da extração líquido-líquido. Foram avaliados dois processos diferentes de extração líquido-líquido (item 4.3.6.). Após a realização desta etapa, foram realizadas análises via HPLC dos extratos e frações obtidos (Figura 31-36).

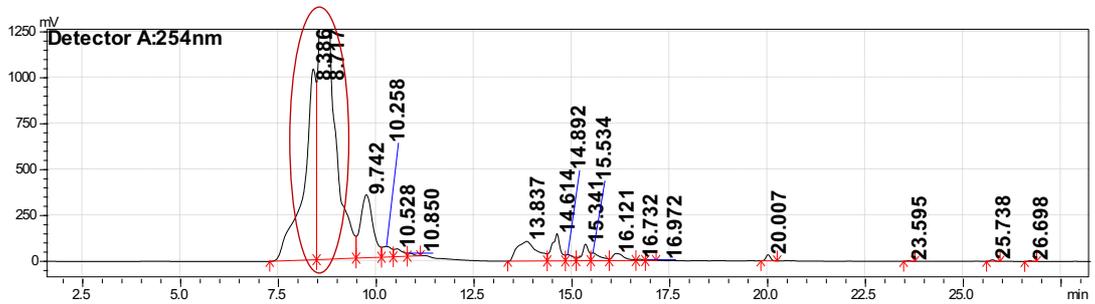
Analisando-se as amostras obtidas após a realização de duas extrações consecutivas somente com clorofórmio, verifica-se que a fração clorofórmio mostrou a presença de um menor número de compostos quando comparado com o extrato bruto bem como uma predominância de compostos com tempo de retenção entre 7 e 10 min (Figura 32), o que indica a presença de compostos de média polaridade. Também é possível identificar a presença de uma elevada concentração de compostos de média polaridade entre 7 e 10 min no resíduo da extração (Figura 33), o que sugere a necessidade de outras etapas de extração visando aumentar a concentração de compostos na fração orgânica.

Com relação a realização de extrações com dois solventes (inicialmente com acetato de etila e, posteriormente, com clorofórmio), verifica-se a presença de compostos de média para alta polaridade na fração acetato (Figura 34) bem como a presença de compostos de média para baixa polaridade na fração clorofórmio (Figura 35). Também é possível verificar que a extração com dois solventes se mostrou mais eficiente na extração de metabólitos produzidos pelo fungo CA10 (*Vouchered mycorrhizae*). Dessa forma, visando a realização de uma avaliação referente a eficiência dos processos de extração utilizados na pré purificação de biossurfactantes, foram realizados ensaios referentes a determinação da redução da tensão superficial, determinação do índice de emulsificação, bem como determinação do ângulo de contato.

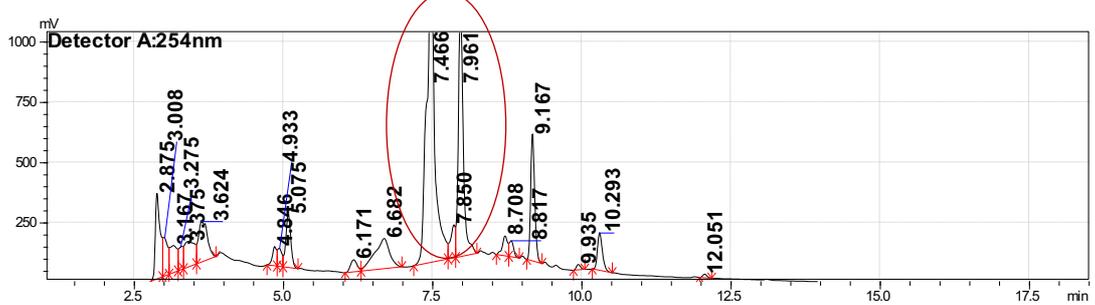
Figura 31 – Cromatograma do extrato bruto obtido



Fonte: Autora

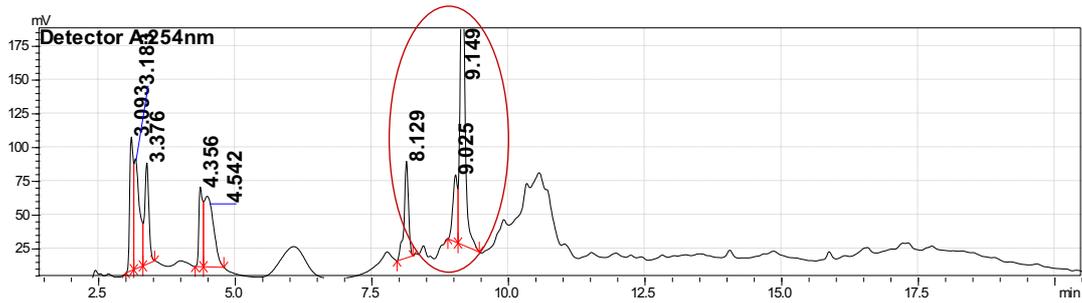
Figura 32 - Cromatograma da fração clorofórmio (extração somente com CHCl_3)

Fonte: Autora

Figura 33 - Cromatograma do resíduo (extração somente com CHCl_3)

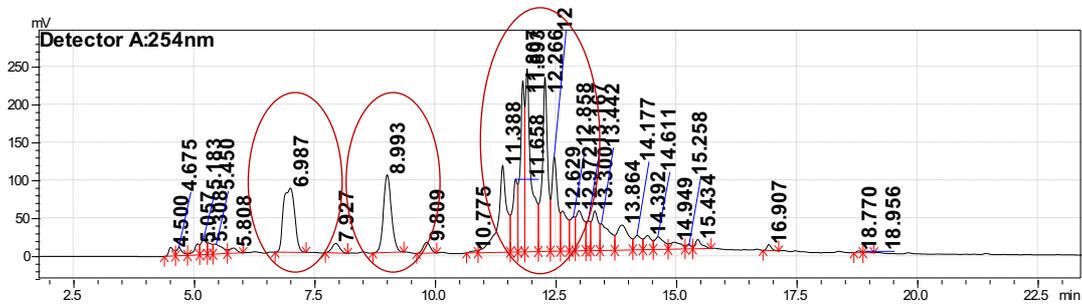
Fonte: Autora

Figura 34 – Cromatograma da fração acetato (extração com acetato e CHCl_3)



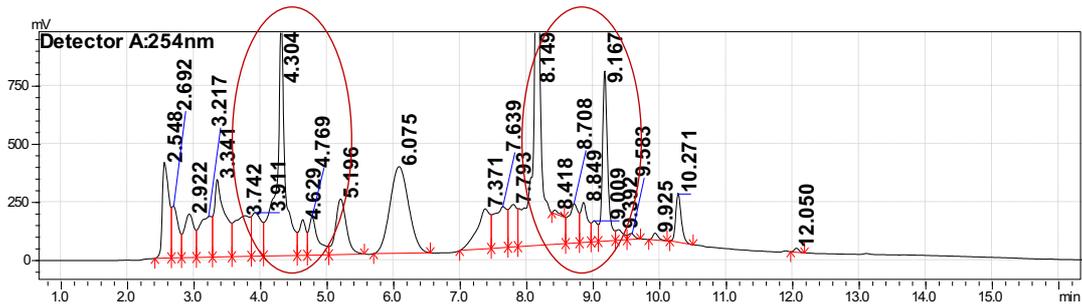
Fonte: Autora

Figura 35 - Cromatograma da fração clorofórmio (extração com acetato e CHCl_3)



Fonte: Autora

Figura 36 - Cromatograma do resíduo (extração com acetato e CHCl_3)



Fonte: Autora

A análise da tensão superficial do extrato inicial, das frações obtidas e dos resíduos (Tabela 16, Figura 37-39) mostram uma redução de 53,4% na tensão superficial em relação a água, ao avaliar-se a fração obtida após a extração somente com clorofórmio. Com relação a fração clorofórmio obtida durante o processo de

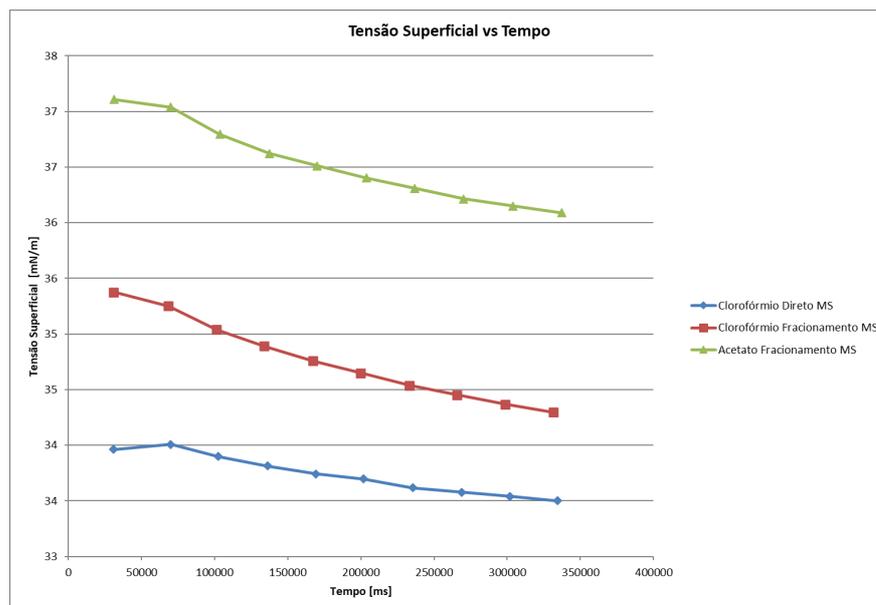
extração inicialmente com acetato de etila e posteriormente, com clorofórmio, verifica-se uma redução de 52,1%, a concentração das soluções preparadas a partir dos resíduos em água, para leitura da redução da tensão superficial, é de ~ 5% (1% resíduo seco reconstituído em 20 mL de água), no entanto as soluções dos extratos foram lidos tal e qual e, para um comparativo avaliou-se o teor de sólidos, para referência de concentração em relação às frações diluídas a partir dos resíduos (Figuras 37 a 40).

Tabela 16 – Dados de tensão superficial obtidos durante a pré-purificação

Extrato/Fração	Tensão (mN.m^{-1})
Extrato inicial	34,58
Fração CHCl_3 (direto)	33,59
Resíduo (CHCl_3 direto)	34,49
Fração acetato/ CHCl_3	36,23
Fração CHCl_3	34,46
Resíduo	46,74
RL 0,5 %	31
Água	72

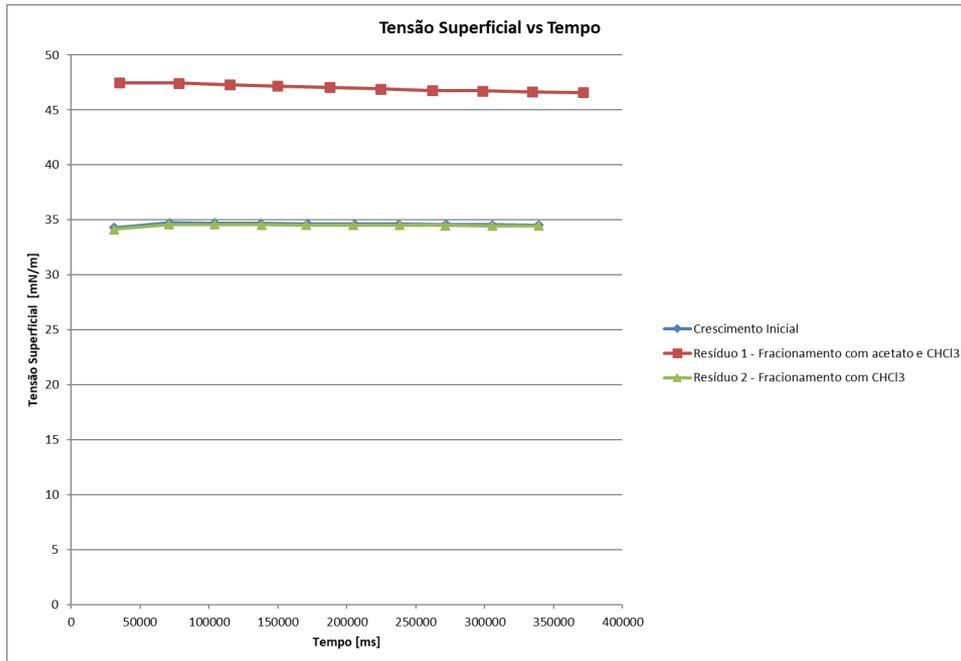
Fonte: Autora

Figura 37 – Comparação da tensão superficial das frações obtidas



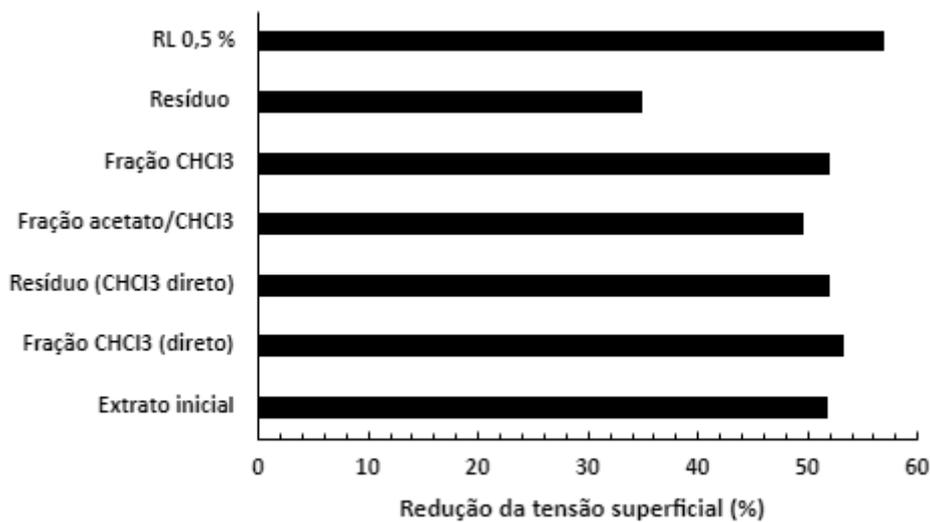
Fonte: Autora

Figura 38 – Gráficos da tensão superficial dos resíduos de fracionamento



Fonte: Autora

Figura 39 – Redução da tensão superficial em comparação com a água



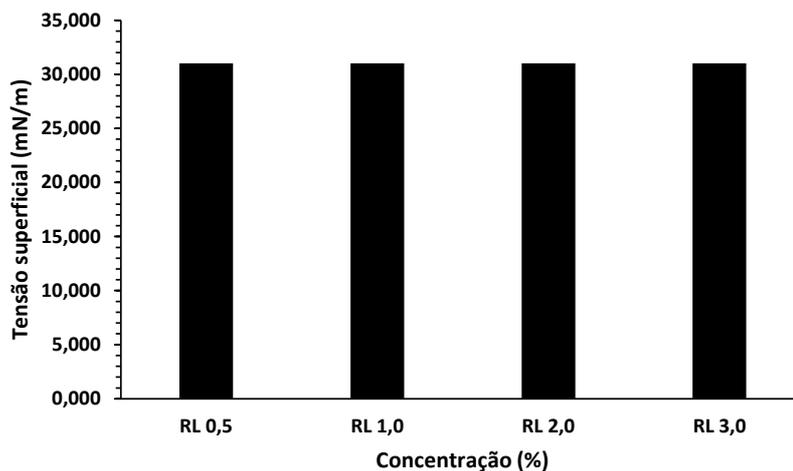
Fonte: Autora

Desta forma, verifica-se que a utilização de dois solventes nesta etapa de pré-purificação, para estes materiais, não justifica, uma vez que não houve incremento satisfatório na extração dos compostos. De forma que, em trabalhos futuros, seja interessante a realização de um maior número de extrações somente com clorofórmio visando aumentar a eficiência desta etapa.

É importante destacar que foi realizada uma comparação da redução da tensão superficial com a de um biossurfactante comercial, Ramnolipídio (R90 *Rhamnolipid Biosurfactant* - *Agae Technologies*, lote: A791256129) (Apêndice A), por meio da análise dos resultados, verifica-se que a utilização do mesmo em uma concentração de 0,5 % em água levou a resultados próximos aos obtidos durante a realização do trabalho (56,94%) com o material pré purificado, o que confirma a eficiência dos compostos metabolizados pelo fungo *Vouchered mycorrhizae*, como biossurfactante.

Salienta-se que a utilização de concentrações mais elevadas do biossurfactante comercial (BC) utilizado não levaram a mudanças significativas na tensão superficial (Figura 40).

Figura 40 – Tensão superficial do BC em diferentes concentrações



Fonte: Autora

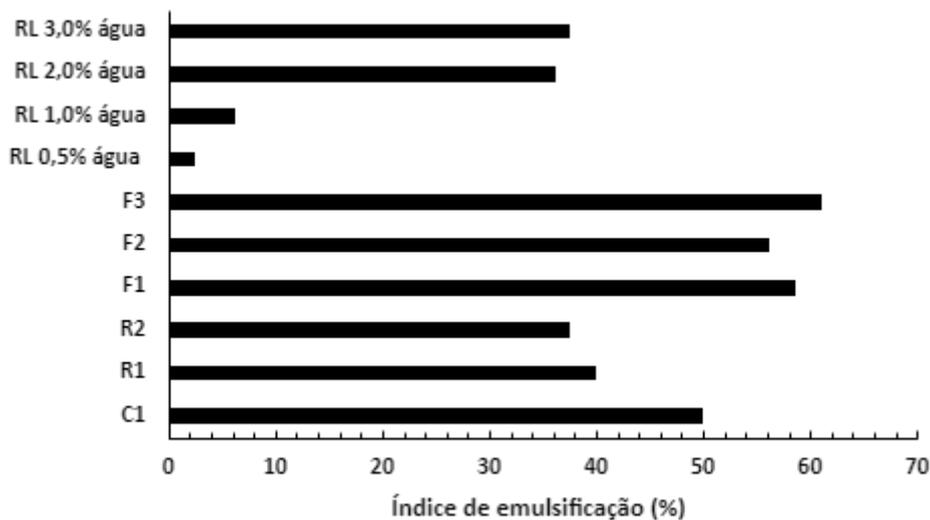
Além da avaliação da variação da tensão superficial, também foram realizados ensaios referentes a determinação do índice de emulsificação (Tabela 17, Figura 41). Ao se analisar os resultados, verificou-se que as frações dos extratos purificados apresentam melhor performance de índice de emulsificação quando comparado aos extratos brutos (resíduos) e às soluções de Ramnolipídio a 0,5% e a 3,0% em água. Os resíduos após a extração também apresentam bom resultado dentro do comparativo, o que direciona para uma melhoria no processo de pré-purificação.

Tabela 17 – Dados de Emulsificação

Material / Extrato	% de emulsificação
Crescimento Inicial	50
Resíduo (acetato e CHCl ₃)	40
Resíduo(CHCl ₃)	38
Fração com acetato	59
Fração CHCl ₃ direto	56
Fração CHCl ₃	61
RL 0,5% água	3
RL 1,0% água	6
RL 2,0% água	36
RL 3,0% água	38

Fonte: Autora

Figura 41 – Índice de emulsificação (biossurfactante em diferentes concentrações)



*C1-Crescimento Inicial, R1-Resíduo (da ext. Acetato de etila e clorofórmio), R2-Resíduo Clorofórmio, F1-Fração acetato de etila, F2-Fração Clorofórmio direto (extração única com clorofórmio), F3-Fração clorofórmio (da ext. Acetato e clorofórmio).

Fonte: Autora

A avaliação de ângulo de contato (Tabela 18, Figura 42) foi feita levando-se em consideração a relação com a água e em superfície de inox. Os ensaios foram feitos com o resíduo e extratos do material pré-purificado, usando como comparativo um surfactante não iônico, o álcool graxo etoxilado C11-5EO, (material que possui baixa

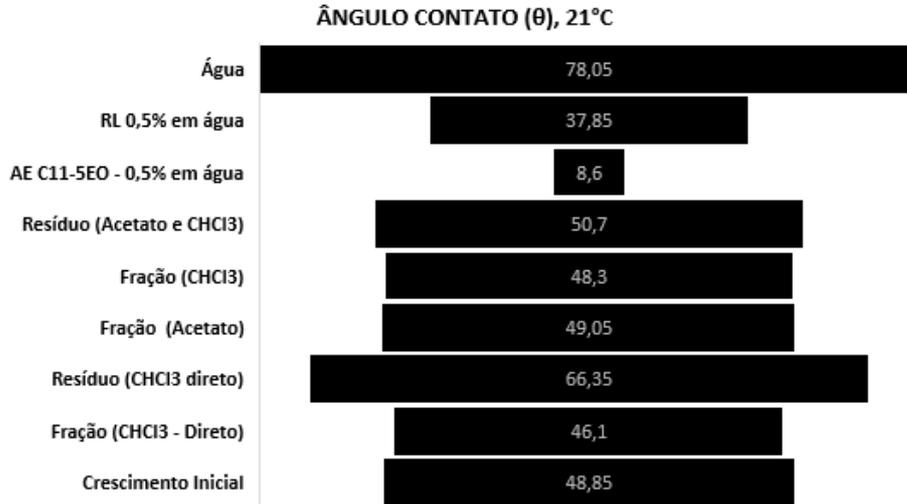
tensão superficial, sendo um excelente espalhante, muito aplicado no segmento agroquímico).

Tabela 18 - Dados de ângulo de contato obtidos a 21°C (INOX)

Produto / Extrato	Esquerda	Direita	Média
Água	77,2	78,9	78,05
RL 0,5% em água	37,4	38,3	37,85
AE C11-5EO - 0,5% em água	9,3	7,9	8,6
Resíduo (Acetato e CHCl_3)	51,2	50,2	50,7
Fração CHCl_3	48,9	47,7	48,3
Fração Acetato	47,4	50,7	49,1
Resíduo (CHCl_3 direto)	66,5	66,2	66,35
Fração CHCl_3 -Direto	46,1	46,1	46,1
Crescimento Inicial	48,6	49,1	48,85

Fonte: Autora

Figura 42 - Avaliação do ângulo de contato sobre superfície de inox



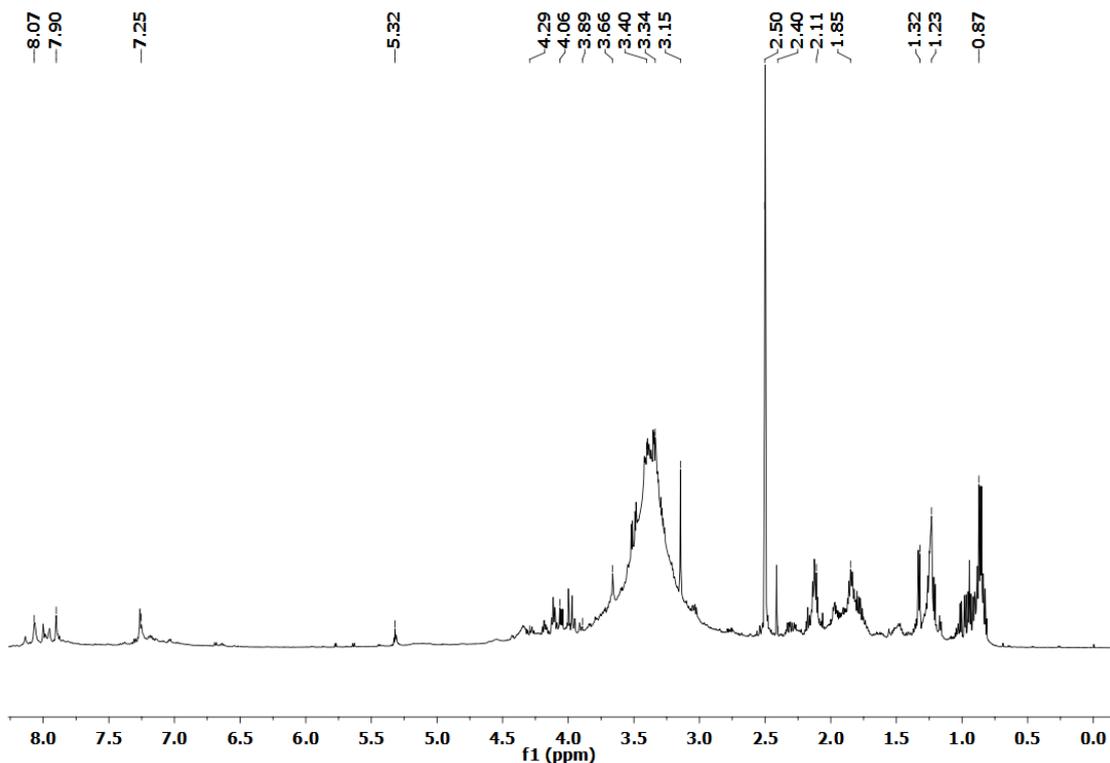
Fonte: Autora

Em relação aos resultados obtidos pela avaliação de ângulo de contato, observa-se que os valores baixos, ou seja, $\theta < 90^\circ$, podem ser relacionados a uma boa umectação, molhabilidade, enquanto, valores mais altos de ângulo de contato $\theta > 90^\circ$, indicam uma não boa umectação, molhabilidade. Quando o ângulo de contato é 0° , pode-se observar que a superfície em teste se molhará por completo.

Além das análises referentes a tensão superficial, índice de emulsificação bem como ângulo de contato, forma realizadas análises via RMN para avaliação do tipo de biossurfactante presente. Em relação às análises dos espectros de RMN- H^1 das frações obtidas, é possível verificar a presença de hidrogênios atribuídos a glicosídeos bem como hidrogênios de estruturas alifáticas. Analisando-se o espectro obtido após a realização da extração com solvente orgânico somente com clorofórmio (Figura 43), verifica-se a presença de sinais na região entre 3,0 e 4,5 ppm que sugerem a presença de hidrogênios de carbonos vizinhos a oxigênio de compostos glicosilados.

Também é possível verificar a presença de vários hidrogênios de cadeias alifáticas entre 0,5 e 2,5 ppm bem como um sinal em 5,32 ppm que sugere a presença de hidrogênios vizinhos a grupos carbonílicos em estruturas cíclicas e, um sinal em 7,27 ppm, que sugere a presença de grupos N-H de ligações peptídicas (KOPALLE; POTHANA; MADDILA, 2022; PAUL et al., 2022; PANDEY et al., 2022; ZARGAR et al., 2022). Esses sinais observados sugerem a presença de glicolipídios e lipopeptídios.

Figura 43 – H^1 -RMN da fração clorofórmio (extração com $CHCl_3$)



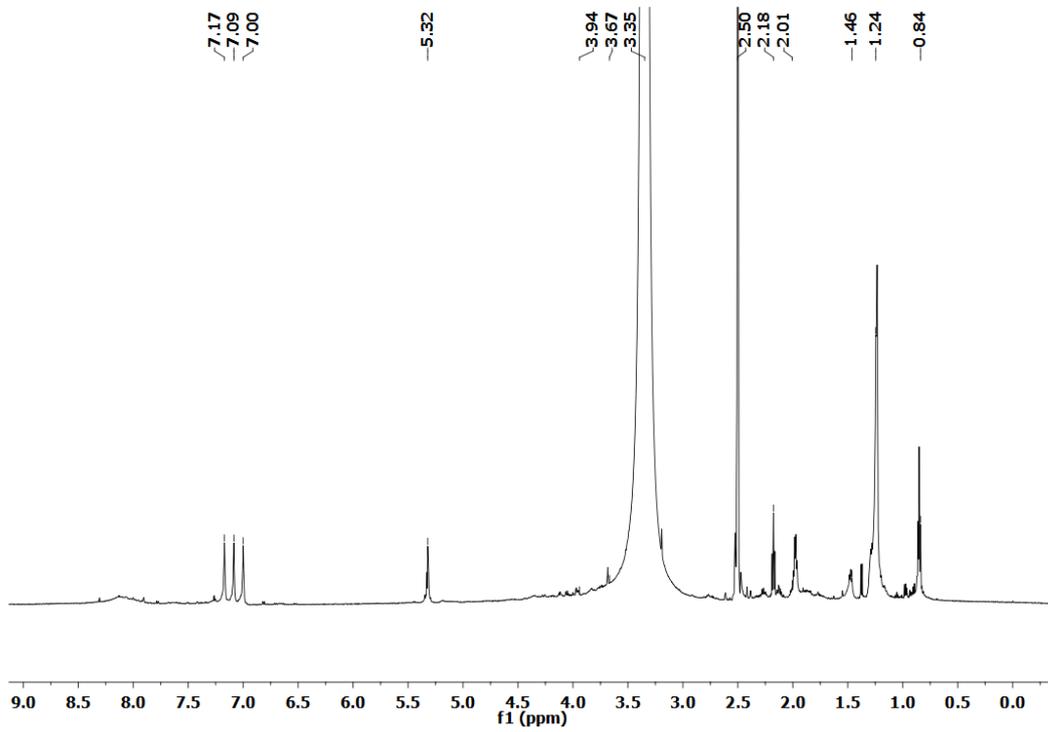
Fonte: Autora

Esses resultados corroboram com dados obtidos por Pandey e colaboradores (2022) que avaliaram a produção de biossurfactantes por *Aeromonas hydrophila* RP1 e, após o processo de fermentação e extração com clorofórmio, obtiveram uma fração rica em glicolipídios com ação de biossurfactante. Em análise via RMN, foram obtidos sinais semelhantes aos verificados na fração avaliada. Também é possível citar estudo realizado por Zargar et al., (2022), que evidenciaram a produção de biossurfactantes glicosilados por *Bacillus* sp. IITD106 e verificaram a presença de grupos carboxílicos de compostos glicosídicos em análises via RMN ou estudos realizados por Kopalle e colaboradores (2022) que também estudaram glicolipídios e verificaram sinais de mesmo deslocamento químico, observado no presente trabalho (região de 5,3 ppm). Com relação a presença de lipopeptídeos, destaca-se estudos realizados por Paul et al. (2022) que evidenciaram sinais na região de 7,2 ppm referentes a grupos N-H de ligações peptídicas e corroboram com os dados apresentados.

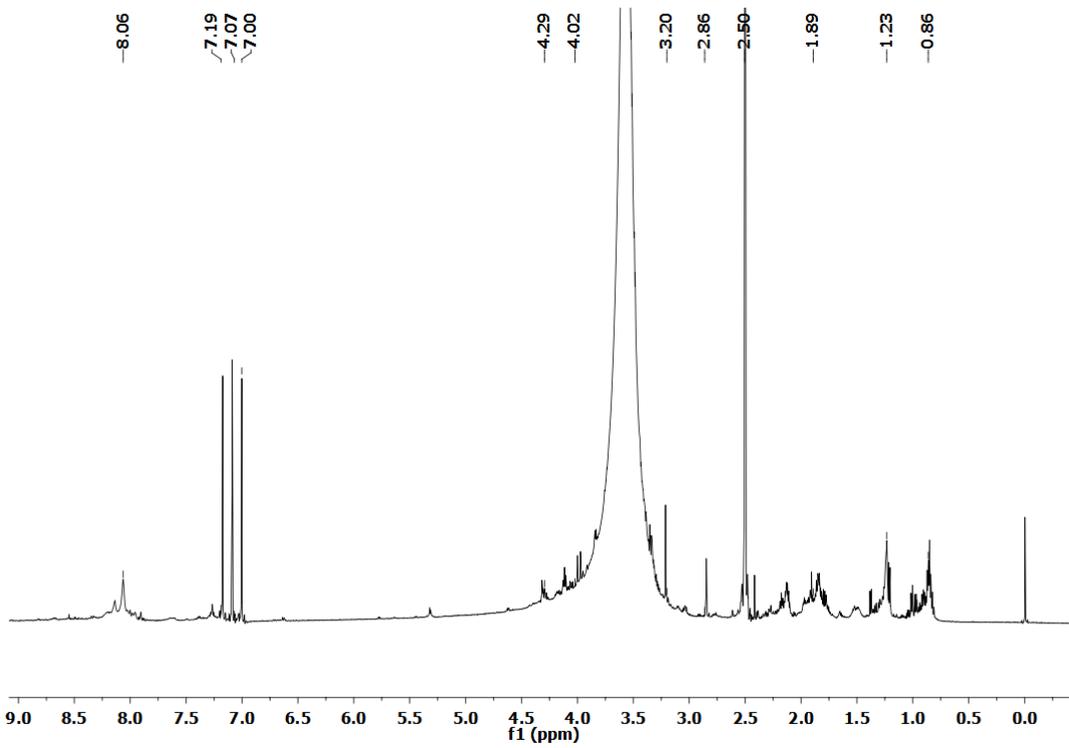
Ao analisar-se as frações obtidas a partir da extração com acetato de etila (Figura 44) seguida da extração com clorofórmio (Figura 45) verifica-se também a presença de hidrogênios referentes a estruturas glicosiladas na região entre 3,0 e 4,5 ppm, bem como, hidrogênios de cadeias alifáticas entre 0,5 e 2,5 ppm, como evidenciado anteriormente, porém, na fração acetato é evidenciada a presença de um sinal em 5,30 ppm que sugere a presença de hidrogênios vizinhos a grupos carboxílicos de estruturas cíclicas.

Esse sinal não é evidenciado na fração clorofórmio. Destaca-se também a presença de singletos na região entre 6,92 e 7,26 ppm que sugerem a presença de estruturas aromáticas e, um sinal em 8,02 ppm que sugere a presença de hidrogênios de grupos carboxílicos. Salienta-se que o sinal mais intenso em 3,35 ppm e em 3,65 ppm, se refere a presença de água e que o sinal em aproximadamente 2,5 ppm em todos os espectros, se refere ao solvente deuterado utilizado (DMSO).

Dessa forma, os resultados sugerem a produção de uma combinação de glicolipídios e lipopeptídios durante o processo de produção de biossurfactante utilizando o fungo CA10 sendo necessária realização de outras etapas de purificação, para avaliação da capacidade de atuar como biossurfactante das substâncias isoladas ou se existe a necessidade de sinergia entre as mesmas.

Figura 44 - H^1 -RMN da fração acetato (extração com acetato e $CHCl_3$)

Fonte: Autora

Figura 45 - H^1 -RMN da fração clorofórmio (extração com acetato e $CHCl_3$)

Fonte: Autora

6 CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foi possível verificar a produção de biossurfactantes por fungos associados a caules e folhas de mandioca bem como avaliar a influência dos parâmetros temperatura, pH e tempo no aumento da produção desses compostos. Dessa forma, após a caracterização do material via determinação da tensão superficial, bem como do índice de emulsificação, verificou-se a maior produção desses compostos pelo fungo *Vouchered mycorrhizae* (CA10).

Observou-se também que temperatura foi a variável de maior relevância na produção de biossurfactante pelo fungo *Vouchered mycorrhizae*, seguida do tempo (horas/dias) e do pH. Também foi possível verificar que, embora o fungo apresente característica de produtividade de biossurfactantes, o mesmo também pode ser capaz de produzir compostos com potencial para atuar como bioemulsificante.

O efeito de redução de tensão superficial, bem como o espalhamento observado pela análise de ângulo de contato em superfície de inox dos extratos (clorofórmio direto, clorofórmio e acetato) frente à água, demonstram baixas forças de coesão, podendo o material ser um potencial agente em limpeza de superfícies.

A realização da pré-purificação do extrato obtido a partir do fungo CA10, após a realização do cultivo em meio otimizado, possibilitou a obtenção de um composto com elevada pureza, sendo possivelmente, o responsável pela ação biossurfactante, sendo que, purificações adicionais serão necessárias, visando a identificação deste composto, bem como a avaliação do potencial econômico para a aplicação do mesmo em processos industriais.

Verificou-se assim, a possibilidade de se ter alternativas à produção de biossurfactantes de base glicosiladas, substituindo bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, por fungos oriundos de caules e folhas de mandiocas. É importante destacar também como recomendação de próximas etapas, uma avaliação toxicológica do material produzido, bem como o atendimento a composição dos dados de segurança de produtos químicos visando identificar campos de aplicação do produto.

REFERÊNCIAS

ACCORSINI, Fábio R. et al. Biosurfactants production by yeast using soybean oil and glycerol as low-cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 116-125, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjm/a/nstzFjCDMqFVxNFRqsY7WLn/?lang=en>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

ADU, Simms A. et al. Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1099, 2020. Disponível em: <Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations>. Acesso em: 09 abr. 2022.

AHUJA, Kunal; BAYAS, Sarita. Global Biosurfactants Market Size, Share and Industry Analysis Report by Product (Sphorolipids, Rhamnolipids, Alkyl Polyglucosides [APG], Methyl Ethyl Sulfonates [MES], Sucrose Esters, Sorbitan Esters, Lipopeptides) and Application (Household Detergents, Personal Care, Industrial Cleaners, Food Processing, Oilfield Chemicals, Agricultural Chemicals, Textiles), Region Outlook, Application Development, Competitive Market Share & Forecast, 2021 – 2027. **Global Biosurfactants Market**. 2022. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/biosurfactants-market-report>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

AKBARI, Sweeta et al. Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 81-90, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452072118300182>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

ALMEIDA, Darne G. et al. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1718, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27843439/>>. Acesso em: 09 jun. 2022.
AL-WAHAIBI, Y. et al. Injection of biosurfactant and chemical surfactant following hot water injection to enhance heavy oil recovery. **Petroleum Science**, v. 13, p. 100–109, 2016.

AMBAYE, Teklit G. et al. Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 102090, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186421007343>>. Acesso em: 21 out. 2022.

AMIRZAKARIYA, Bahman Z.; SHAKERI, Abolfazl. Bioactive terpenoids derived from plant endophytic fungi: An updated review (2011–2020). **Phytochemistry**, p. 113130, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942222000462>>. Acesso em: 09 jul. 2022.

ASLAM, R. et al. Application of surfactants as anticorrosive materials: A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 295, p. 102481, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001868621001226>>. Acesso em: 20 jun 2022.

AZEVEDO, João Lúcio. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 117-137, 1998. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo_Microrganismosendofiticos_000fdrap80702wx5eo0a2ndxyo89f39n.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2022.

BAKER, S. C.; CHEN, C.-Y. Enrichment and purification of lipopeptide biosurfactants. In: SEN, R. (ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 281-288. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672)

BANAT, Ibrahim M. et al. **Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. Bioresource Technology**, v. 320, p. 124222, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852420314966>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

BHALERAO, Madhura; KARADBHAJNE, Vijay Y. Polymeric Surfactants-Its Evolution and Review. **International Journal of ChemTech Research**, v.12 Nº 1, p. 183-19, 2019. Disponível em: <https://www.academia.edu/50393406/Polymeric_Surfactants_Its_Evolution_and_Review>. Acesso em: 19 jun. 2022.

BOFFA, Vittorio et al. Role of a waste-derived polymeric biosurfactant in the sol-gel synthesis of nanocrystalline titanium dioxide. **Ceramics International**, v. 40, n. 8, p. 12161-12169, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884214005951>>. Acesso em: 13 jul. 2022.

BORÉM, Aluizio. A história da biotecnologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 10-12, 2005. Disponível em: <https://www.academia.edu/8854694/A_HIST%C3%93RIA_DA_BIOTECNOLOGIA_Alu%C3%ADzio_Bor%C3%A9m>. Acesso em: 14 jul. 2022.

BRUNO, Alessandra N. **Biotecnologia I: princípios e métodos: Introdução à Biotecnologia**. Porto Alegre. Artmed, p. 11, 2014.

BURKE, David J. et al. Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 795-803, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071710004839>>. Acesso em: 14 jul. 2022.

BUSHNELL, L.D.; HAAS, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653-673, 1941. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374727/>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

CAO, Duo et al. Secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata*. **Fitoterapia**, v. 155, p. 104970, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X21001453>>. Acesso em: 09 jul. 2022.

CASTIGLIONI, Gabriel L.; BERTOLIN, Telma E.; COSTA, Jorge A.V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, p. 292-295, 2009. Disponível em: <http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000200005>. Acesso em: 09 abr. 2022.

CHEN, Wei-Chuan; JUANG, Ruey-Shin; WEI, Yu-Hong. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158-169, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X15300188>>. Acesso em: 09 out. 2022.

DALTIN, Decio. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações. 1ª ed. Oklahoma. Blucher, 2011.

DAVE, N.; JOSHI, T. A concise review on surfactants and its significance. **International Journal of Applied Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 663-672, 2017. Disponível em: <https://www.ripublication.com/ijac17/ijacv13n3_21.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2022.

DRAKONTIS, Constantina E.; AMIN, Samiul. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 77-90, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359029420300297>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

DUTTA, Devanushi et al. Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 621-629, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/babt/a/rwXL6mFttgSrbzbFCncLw5N/?lang=en>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

FADIJI, Ayomide E.; BABALOLA, Olubukola O. Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 3622-3633, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20303387>>. Acesso em: 14 jul. 2022.

FALK, Nancy A. Surfactants as antimicrobials: a brief overview of microbial interfacial chemistry and surfactant antimicrobial activity. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 22, n. 5, p. 1119-1127, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7166552/>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

FARIAS, Charles B.B. et al. Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 28-39, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

FATMA, Ishrat et al. Current trends in protein-surfactant interactions: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 341, p. 117344, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167732221020687>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

FERNANDES, Natalia de A.T. et al. Eco-friendly biosurfactant from *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 as larvicidal and antimicrobial. **Microbiological Research**, v. 241, p. 126571, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32818706/>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

FERREIRA, Isabela N.S. et al. Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 51-58, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345820300300>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

FIALHO, Josefino de F.; VIEIRA, Eduardo A. Mandioca no Cerrado: orientações técnicas. **Planaltina: Embrapa**, 2011. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1354377/1743416/Mandioca+no+Cerrado+orienta%C3%A7%C3%B5es+t%C3%A9cnicas.pdf/2df4d240-b1b5-4107-84ed-12f85305ec67?version=1.0>>. Acesso em: 09 jul. 2022.

FRACCHIA, Letizia et al. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 144-162, 2015. Disponível em: <<https://www.aimspress.com/article/id/365>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

GreyViews. The Global Biosurfactants Market is expected to grow from USD 1,903.0 Million in 2020 to USD 3,408.7 Million by 2028, at a CAGR of 5.9% during the forecast period 2021-2028: Greyviews, 2022. Disponível em: <<https://www.globenewswire.com/news-release/2022/04/07/2418654/0/en/The-Global-Biosurfactants-Market-is-expected-to-grow-from-USD-1-903-0-Million-in-2020-to-USD-3-408-7-Million-by-2028-at-a-CAGR-of-5-9-during-the-forecast-period-2021-2028-Greyviews.html>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

GUPTA, Shubhpriya et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology advances**, v. 39, p. 107462, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975019301624>>. Acesso em: 09 jul. 2022.

GUO, Peng et al. Functional characteristics and diversity of a novel lignocelluloses degrading composite microbial system with high xylanase activity. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 254-264, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20208427/>>. Acesso em: 09 jul. 2022.

HEALY, M. G.; DEVINE, C. M.; MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. **Resources, conservation and recycling**, v. 18, n. 1-4, p. 41-57, 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921344996011676>>. Acesso em: 09 jul. 2022.

HIEMENZ, Paul; RAJAGOPALAN, Raj. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**, 3^a edition. Nova York. Marcel Dekker Inc. 1997. Disponível em: <[https://www.eng.uc.edu/~beaucag/Classes/Properties/Books/\(Undergraduate%20Chemistry%20Series\)%20Paul%20C.%20Hiemenz,%20Raj%20Rajagopalan%20-%20Principles%20of%20colloid%20and%20surface%20chemistry-Marcel%20Dekker%20\(1997\).pdf](https://www.eng.uc.edu/~beaucag/Classes/Properties/Books/(Undergraduate%20Chemistry%20Series)%20Paul%20C.%20Hiemenz,%20Raj%20Rajagopalan%20-%20Principles%20of%20colloid%20and%20surface%20chemistry-Marcel%20Dekker%20(1997).pdf)>. Acesso em: 14 jul.2022.

INÈS, Mnif; DHOUBA, Ghribi. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. **Carbohydrate Research**, v. 416, p. 59-69, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008621515002207>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

INGSEL, Tenzin; DE SOUZA, Felipe M.; GUPTA, Ram K. Biosurfactants for industrial applications. In: **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**. Academic Press, 2022. p. 467-493. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85146-6.00016-4>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

ISMAIL, Nur L.; SHAHRUDDIN, Sara; OTHMAN, Jofry. Overview of Bio-Based Surfactant: Recent Development, Industrial Challenge, and Future Outlook. In: **Surfactants**. IntechOpen, 2022. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/online-first/80063>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

IVANKOVIĆ, Tomislav; HRENOVIĆ, Jasna. Surfactants in the environment **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 61, n. 1, p. 95-109, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20338873/#:~:text=After%20use%2C%20residual%20surfactants%20are,aquatic%20organisms%20are%20well%20known.>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

IVANKOVIĆ, Tomislav; HRENOVIĆ, Jasna; GUDELJ, Ivana. Toxicity of commercial surfactants to phosphate-accumulating bacterium. **Acta Chim Slov**, v. 56, p. 1003-1009, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7166552/>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

JAHAN, Ruksana et al. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in colloid and interface science**, v. 275, p. 102061, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868619302544>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

JESUS, Carolina F. et al. Mini-review: Synthetic methods for the production of cationic sugar-based surfactants. **Journal of Molecular Liquids**, v. 342, p. 117389, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117389>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, Pedro et al. Biosurfactants from waste: structures and interfacial properties of sophorolipids produced from a residual oil cake. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 23, n. 2, p. 481-486, 2020. Disponível em: <<https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jsde.12366>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

JIMOH, Abdullahi A.; LIN, Johnson. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental safety**, v. 184, p. 109607, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651319309388>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

JOHNSON, Phillip et al. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Advances in colloid and interface science**, v. 288, p. 102340, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102340>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

KALAM, Shams et al. A review on surfactant retention on rocks: mechanisms, measurements, and influencing factors. **Fuel**, v. 293, p. 120459, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236121003355>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

KASHIF, Ayesha et al. Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants—A critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 102718, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001868622001208>>. Acesso em: 09 jul. 2022.

KIRAN, G. Seghal et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19570659/>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

KHIRE, J. M. Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biosurfactants**, p. 146-157, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20545280/>>. Acesso em: 21 out. 2022.

KOPALLE, Parimala; POTHANA, Shanmukha A.; MADDILA, Suresh. Structural and physicochemical characterization of a rhamnolipid biosurfactant. **Chemical Data Collections**, v. 41, p. 100905, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2405830022000775>>. Acesso em: 21 out. 2022.

LAI, Kuo-Yann. **Liquid detergents**. 2^a ed. New Jersey. Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

LI, Fang-Zhou et al. Bioprospecting of a novel endophytic *Bacillus velezensis* FZ06 from leaves of *Camellia assamica*: Production of three groups of lipopeptides and the inhibition against food spoilage microorganisms. **Journal of Biotechnology**, v. 323, p. 42-53, 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165620302030>>.

Acesso em: 19 jun. 2022.

LIMA, João M.S. et al. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil.

African Journal of Biotechnology, v. 15, n. 24, p. 1217-1223, 2016. Disponível em:

<<https://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/0AF3F3858866>>. Acesso

em: 09 abr. 2022.

MANDIOCA Conab, 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 out. 2022.

MARKANDE, Anoop R.; PATEL, Divya; VARJANI, Sunita. A review on biosurfactants: properties, applications, and current developments. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124963, 2021. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852421003023>>.

Acesso em: 09 abr. 2022.

MCCLEMENTS, David J.; JAFARI, Seid M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in colloid and interface science**, v. 251, p. 55-79, 2018. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001868617303196>>.

Acesso em: 09 abr. 2022.

MENESES, Dayana P. et al. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer.

Microbiological research, v. 204, p. 40-47, 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501317303749>>. Acesso

em: 09 abr. 2022.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. 3ª Ed. 1, Heidelberg: Springer, 2006.

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. **Biosurfactants: research trends and applications**. CRC Press: Boca Raton, 2014. 352p.

MYERS, Drew. **Surfactant science and technology**. 3ª ed. New Jersey. John Wiley & Sons, 2005.

NAUGHTON, P. J. et al. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 1, p. 12-28, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30828919/>>.

Acesso em: 19 jun 2022.

ONWOSI, Chukwudi O. et al. Microbial-derived glycolipids in the sustainable formulation of biomedical and personal care products: A consideration of the process economics towards commercialization. **Process Biochemistry**, v. 100, p. 124-139, 2021. Disponível

em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511320310187>>.

Acesso em: 19 jun 2022.

PANDEY, Ranjan et al. Evaluation of a glycolipopeptide biosurfactant from *Aeromonas hydrophila* RP1 for bioremediation and enhanced oil recovery. **Journal of Cleaner Production**, v. 345, p. 131098, 2022. Disponível

em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959652622007302>>.

Acesso em: 19 out. 2022.

PARRY, Mauricio Moller et al. Estado nutricional da mandioca cultivada em diferentes épocas sob cobertura morta e duas adubações. **Revista Ciências Agrárias Belém** - Nº 43, p. 91-114, 2005.

PAUL, Indrani; MANDAL, Tamal; MANDAL, Dalia D. Assessment of bacterial biosurfactant production and application in Enhanced Oil Recovery (EOR)—A green approach. **Environmental Technology & Innovation**, v. 28, p. 102733, 2022. Disponível

Disponível

em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186422002401>>.

Acesso em: 19 out. 2022.

PRADHAN, Ambika; BHATTACHARYYA, Amitabha. Quest for an eco-friendly alternative surfactant: Surface and foam characteristics of natural surfactants.

Journal of Cleaner Production, v. 150, p. 127-134, 2017. Disponível

em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095965261730447X>>.

Acesso em: 19 jun 2022.

RAPP, Bastian E. **Measuring Surface Tension and Free Surface Energy. Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics**. 1ª ed. Cambridge,

Elsevier BV, 2017. Cap. 20, p. 453-465. Disponível

em:<<https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1006205482>>. Acesso em: 19 jun 2022.

ROSEN, Milton J.; KUNJAPPU, Joy T. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. 3ª ISBN 978-0-470-54194-4. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2012.

ROSEN, Milton J.; DAHANAYAKE, Manilal. **Industrial Utilization of Surfactants – Principals and Practices**. AOCs Press. ISBN 1-893997-11-1, year: 2000.

SALAGER, Jean-Louis. **Surfactants types and uses**. FIRP booklet, 2ª ed. Mérida. Universidad de Los Andes, 2002. Disponível em:

<<http://www.nanoparticles.org/pdf/Salager-E300A.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2022.

SANTOS, Danyelle K.F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26999123/>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

SARUBBO, Leonie A. et al. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, p. 108377, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X22000468>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

SHARMA, Jyoti; SUNDAR, Durai; SRIVASTAVA, Preeti. Biosurfactants: Potential Agents for Controlling Cellular Communication, Motility, and Antagonism. **Frontiers in Molecular Biosciences**, p. 893, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34708073/>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

SHIRI, Mohammad S.Z.; HENDERSON, William; MUCALO, Michael R. A review of the lesser-studied microemulsion-based synthesis methodologies used for preparing nanoparticle systems of the noble metals, Os, Re, Ir and Rh. **Materials**, v. 12, n. 12, p. 1896, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31212850/>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

SIMMS, Charlotte et al. Understanding the role of surfactants in the interaction and hydrolysis of myoglobin by Zr-MOF-808. **European Journal of Inorganic Chemistry**. V. 202200145, p. 1 of 11, 2022. Disponível em: <<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ejic.202200145>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

SINGH, Ratan; GLICK, Bernard R.; RATHORE, Dheeraj. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: A review. **Pedosphere**, v. 28, n. 2, p. 170-189, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1002016018600189>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

SPINA, Federica et al. Screening of anionic biosurfactants production among fungi and bacteria. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 493, 2018. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Screening-of-anionic-biosurfactants-production-and-Spina-Giulia/1068ea541326244507c0fc4ddc5465163ec5d244>>. Acesso em: 13 jul. 2022.

UZOIGWE, Chibuzo et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 245, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387539/>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

VARJANI, Sunita J.; UPASANI, Vivek N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource technology**, v. 232, p. 389-397, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28238638/>>. Acesso em: 21 out. 2022.

VERMA, Rahul et al. Experimental investigation of molasses as a sole nutrient for the production of an alternative metabolite biosurfactant. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101632, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214714420305109>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

VIEIRA, Isabela Maria M. et al. An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1-18, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1226086X21002914> >. Acesso em: 09 abr. 2022.

WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990, Academic Press, San Diego, CA.

WINTERBURN, J.B.; MARTIN, P.J. Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 2, p. 187-195, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22038550/>>. Acesso em: 09 abr. 2022.

Apêndice A – Certificado de Análise Ramnolípídeo R90

Certificado de Análise - *R90 Rhamnolipid Biosurfactant* – Lote: A791256129

Pureza: ~ 90% por HPLC (método protegido como “Proprietary”);

Glicolípídios identificação: Mistura de ramnolípídeos congêneres Confirmado por LC-MS.

Produzido por: AGAE Technologies LLC, Corvallis, Oregon, USA