



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA–UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Alimentos e Ciência de Alimentos

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS FILAMENTOSOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE VIDEIRAS (*Vitis Vinífera* L.) PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Autora: Mariana Ferreira Alves

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silmara Almeida de Carvalho

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Abril 2020

MARIANA FERREIRA ALVES

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS FILAMENTOSOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE VIDEIRAS (*Vitis Vinífera* L.) PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Silmara Almeida de Carvalho
Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Renata Cristina Ferreira Bonomo
Prof. Dr. Leandro Soares Santos

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Abril 2020

634.8
A48p Alves, Mariana Ferreira.
Produção de biossurfactantes por fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinifera* L.) para potencial aplicação na indústria de alimentos. / Mariana Ferreira Alves. – Itapetinga-BA: UESB, 2020.
130f.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^ª. D. Sc. Silmara Almeida de Carvalho e coorientação da Prof^ª. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e do Prof. D. Sc. Leandro Santos Soares.

1. Videiras - Fungos filamentosos isolados - Biossurfactantes. 2. Aditivo alimentar. 3. Tensoativos microbianos - Indústria alimentar. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Carvalho, Silmara Almeida de. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Soares, Leandro Santos. V. Título.

CDD(21): 634.8

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Biossurfactantes - Produção
2. Videiras - Fungos - Tensoativos microbianos
3. Indústria alimentar - Aditivo



GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA
 Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos - UESB/RTR/PPG/PPGECAL

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS FILAMENTOSOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE VIDEIRAS (*VITIS VINIFERA* L) PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

Autor (a): MARIANA FERREIRA ALVES

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Silmara Almeida de Carvalho

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de ***DOCTORA EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS***, pela Banca Examinadora.

Prof. ^a Dr. ^a Renata Cristina Ferreira Bonomo UESB	Prof. ^a Dr. ^a Luciana Amaral de Faria Silva UESB
Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira UESB	Prof. ^a Dr. ^a Andréa Miura da Costa Membro Externo - UESC
Prof. ^a Dr. ^a Silmara Almeida de Carvalho Orientadora - UESB	

Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 24 de abril de 2020



Documento assinado eletronicamente por **Silmara Almeida De Carvalho, Professor**, em 11/11/2020, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Cris na Ferreira Bonomo, Professor**, em 12/11/2020, às 08:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Amaral de Faria, Professor Adjunto**, em 12/11/2020, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



Documento assinado eletronicamente por **Djalma Menezes de Oliveira, Professor Titular**, em 12/11/2020, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Miura Da Costa, Professor**, em 15/11/2020, às 06:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://seibahia.ba.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **00024122717** e o código CRC **FAE4EADF**.

*Ninguém pode chegar ao topo armado apenas de talento.
Deus dá o talento;
Mas é o trabalho e a persistência
que o transformam em sucesso!
Ana Pavlovna*

*À Deus
À minha mãe
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

A Deus por dar-me fortaleza e fé em todo momento para que eu pudesse vencer mais uma etapa.

Aos meus pais, Fernando (in memorian) e Maria, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim. Obrigada mãe por todas as suas orações, pelos conselhos e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos Igor, Nívea e Péricles e à minha sobrinha Fernanda, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e compartilhando todos os momentos.

A todos meus familiares pelo apoio incansável e incentivo sempre.

Ao meu esposo João por todo carinho, amor e companheirismo. Sempre acreditando no meu potencial.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – PPGEAL, pela oportunidade de aprendizado e acolhimento durante estes anos.

À minha orientadora, professora Dr^a. Silmara Carvalho, pela amizade, confiança, orientação, colaboração e empenho para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus co-orientadores, professora Dr^a. Renata Bonomo e o professor Dr. Leandro Soares, por contribuírem e transmitirem os seus conhecimentos para realização desta pesquisa.

Aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite em contribuir com este trabalho.

Às minhas amigas, Marília e Mylena (3M), pela amizade e por terem compartilhado comigo os momentos mais alegres e difíceis durante os quase 12 anos vividos na UESB. À Olga e Marília pelo companheirismo vivenciado e partilhado no convívio no prédio 282 e na UESB. Obrigada por tudo meninas!

Aos meus colegas do LPNBio, pela colaboração, atenção e apoio que me deram. Em especial quero agradecer a você Lu, pela convivência, pelas caronas e pelos os ensinamentos compartilhados.

À Daniel, por toda ajuda desde o início deste trabalho, me “salvando” nas horas que mais precisava, sempre disposto a ajudar, mesmo quando distante. Obrigada pelos conselhos e por estar presente para o que der e vier!

À FAPESB pela concessão da bolsa.

A todos os meus amigos, espalhados por todos os cantos, que sempre me deram força e torceram para que eu pudesse conquistar mais essa vitória.

A todos que diretamente ou indiretamente, colaboraram de alguma forma na construção deste trabalho.

Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO GERAL	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Fungos	24
2.2 Aplicação de fungos na produção de substâncias diversas.....	25
2.3 <i>Trichoderma sp.</i>	26
2.4 Biossurfactantes.....	28
2.5 Tipos de Biossurfactantes.....	31
2.6 Ácidos graxos presentes na estrutura dos Biossurfactantes	34
2.7 Propriedades dos Biossurfactantes	36
2.7.1 Concentração micelar crítica (CMC).....	37
2.8 Aplicação dos biossurfactantes nas indústrias.....	39
2.9 Produção do biossurfactante e métodos de triagem.....	41
2.10 Planejamento experimental e otimização de processos.....	43
2.11 Extração, purificação e caracterização dos biossurfactantes	45
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
4. OBJETIVOS.....	64
4.1 Objetivo Geral.....	64
4.2 Objetivos Específicos	64
CAPÍTULOS	65
CAPÍTULO I.....	66
Resumo:.....	67
Abstract.....	68
1. Introdução.....	68
2. Materiais e métodos.....	70
2.1. Microrganismo	70
2.2. Preparação do inóculo e fermentação.....	70
2.3. Seleção primária	71
2.4. Seleção secundária.....	71
2.4.1 Índice de emulsificação e estabilidade	71
2.4.2 Medida da tensão superficial	72
2.5. Caracterização morfológica.....	72
2.6. Identificação molecular	72

2.7. Avaliação dos tipos de fontes de carbono e nitrogênio e do tempo no processo de fermentação	73
2.7.1 Ensaio de espalhamento do óleo.....	73
2.8. Determinação de biomassa a partir da melhor fonte de carbono e nitrogênio	73
2.9. Efeito da concentração da melhor fonte de carbono e nitrogênio	73
2.10. Atividade antibacteriana	74
2.11. Extração do Biossurfactante	75
2.12. Estudo microcalorimétrico do biossurfactante e determinação da CMC	75
2.13. Caracterização estrutural do biossurfactante - Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR.....	76
2.14. Análise estatística	76
3. Resultados e Discussão.....	77
3.1. Seleção primária: Formação de emulsão	77
3.2. Seleção secundária: Tensão superficial e índice de emulsificação.....	78
3.3. Caracterização morfológica do I50.....	80
3.4. Identificação molecular do I50	81
3.5. Avaliação das fontes de nitrogênio e carbono e efeito do tempo de fermentação na produção do biossurfactante	81
3.6. Determinação da concentração de ureia e óleo vegetal de milho na produção de biossurfactante	84
3.7. Efeito inibitório de biossurfactantes sobre bactérias	87
3.8. Medida da entalpia do biossurfactante parcialmente purificado (BSPP) e CMC.....	88
3.9. Espectroscopia FTIR do biossurfactante parcialmente purificado (BSPP).....	89
4. Conclusão	90
Agradecimentos	91
Conflito de interesse	91
Referências	91
CAPÍTULO II.....	97
Resumo:	98
Abstract:	99
1. Introdução.....	100
2. Materiais e métodos.....	101
2.1. Microrganismo	101
2.2. Preparação do inóculo e fermentação submersa para a produção do biossurfactante	102
2.3. Otimização das fontes de carbono e nitrogênio utilizando a metodologia de superfície de resposta e matriz Doehlert	102
2.4. Extração e purificação parcial do Biossurfactante	103
2.5. Análise de pureza por HPLC	104

2.6. Tensão superficial e determinação da concentração crítica de micelas (CMC) do biossurfactante	104
2.7. Caracterização química e estrutural do biossurfactante	105
2.7.1 Análise FTIR	105
2.7.2 Análise de ésteres por Cromatografia gasosa (CG-DIC) e (CG-EM)	105
2.7.3 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN de ^1H e ^{13}C).....	106
2.8. Citotoxicidade contra <i>Artemia salina</i> como indicador	106
2.9. Ensaio de fitotoxicidade	106
2.10. Aplicação do Biossurfactante em uma matriz alimentícia emulsionada	107
3.Resultados e Discussão.....	107
3.1. Otimização da produção do biossurfactante.....	107
3.2. Análise de pureza do BSPP	111
3.3. Concentração micelar crítica (CMC).....	112
3.4. Caracterização do biossurfactante	113
3.4.1 Análise FTIR	113
3.4.2 Análise FAME obtida por CG-DIC do BSPP	114
3.4.3 Análise FAMES obtida por CG-EM para BSPP	115
3.4.4 Espectroscopia de RMN	117
3.5. Toxicidade do biossurfactante	120
3.6. Aplicação do BSPP.....	121
4. Conclusão	122
Agradecimentos	122
Conflito de interesse	122
Referências	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
ANEXOS	128

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Estruturas básicas formadas por biossurfactantes	29
Figura 2. Esquema representativo das estruturas de micelas das fases água em óleo, óleo em água e a estrutura de uma molécula do tensoativo	30
Figura 3. Representação da estrutura orgânica de um biossurfactante.....	31
Figura 4. Estrutura química de alguns biossurfactantes	33
Figura 5. Exemplos de ácidos graxos.	34
Figura 6. Principais ésteres de ácidos graxos aprovados para uso alimentar como surfactantes e suas estruturas químicas.	35
Figura 7. Comportamento do tensoativo entre as fases fluida e superficial, em função da tensão superficial, indicando a CMC.....	38

CAPÍTULO I: Artigo 1

Fig. 1 Deflexões que correspondem à variação de potência ao se fazer injeções consecutivas do extrato (biossurfactante)	76
Fig. 2 Tensão superficial inicial (TS ini = água) e final (TS fin) dos biossurfactantes produzidos pelos isolados fúngicos	79
Fig. 3 Índice de emulsificação dos biossurfactantes produzidos por isolados fúngicos em fermentação líquida por 15 dias	80
Fig. 4 Dendograma baseado em distância genética utilizando o método Neighbor-joining, demonstrando relação entre a sequência parcial do gene do fator de alongação do I50 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados CBS (atual Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) e Genbank	81
Fig. 5 Influência das fontes de nitrogênio (a) e carbono (b) na produção de biossurfactante por <i>T. asperellum</i> em termos de tensão superficial	82
Fig. 6 Influência das fontes de nitrogênio (a) e carbono (b) na produção de biossurfactante por <i>T. asperellum</i> em termos de espalhamento do óleo.....	83
Fig. 7 Gráfico de Pareto para modelos significativos para a variável resposta, tensão superficial - TS (%) em função das variáveis estudadas, concentração da fonte de carbono - óleo vegetal de milho (X1) e concentração da fonte de nitrogênio - ureia (X2) no processo de produção de biossurfactante pelo fungo endofítico <i>T. asperellum</i> em fermentação submersa.....	86

Fig. 8 Superfícies de resposta e linha de contorno para tensão superficial - TS (%) de acordo com a análise estatística do DCCR realizada para avaliar a influência da concentração da fonte de carbono - óleo vegetal de milho e da concentração da fonte de nitrogênio - ureia no processo de produção de biossurfactante pelo fungo endofítico <i>T. asperellum</i> em fermentação submersa.....	87
Fig 9. Variação da entalpia do sistema BSPP com água.....	89
Fig. 10 Espectro de FTIR obtido para o BSPP produzido pelo fungo endofítico <i>T. asperellum</i>	90

CAPÍTULO II: Artigo 2

Fig. 1 Gráfico de Pareto dos modelos estatísticos para a RM das variáveis respostas, porcentagem da redução da tensão superficial – % TS, índice de emulsificação – IE e espalhamento do óleo – EO em função das variáveis estudadas, concentração da fonte de carbono - óleo vegetal de milho (Carbono - C) e concentração da fonte de nitrogênio - ureia (Nitrogênio - N).....	109
Fig. 2 Superfícies de resposta e as linhas de contorno para a variável resposta RM em função das variáveis estudadas, concentração da fonte de carbono - óleo vegetal de milho (Carbono - C) e concentração da fonte de nitrogênio - ureia (Nitrogênio - N)	110
Fig. 3 Cromatograma CLAE obtido do BSPP produzido pelo fungo <i>Trichoderma asperellum</i> CBS 433.97.....	111
Fig. 4 Concentração micelar crítica (CMC) do BSPP. Os resultados representam a média de três medições independentes e as barras de erro representam desvios padrão dos valores médios.....	112
Fig. 5 Espectro de FTIR obtido para o BSPP produzido pelo fungo endofítico <i>T. asperellum</i>	113
Fig. 6 Cromatograma CG-DIC da composição dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no BSPP produzido pelo fungo filamentoso endofítico <i>T. asperellum</i> CBS 433.97.....	114
Fig. 7 Cromatograma de íons totais - TIC (CG-EM) do BSPP. Ampliação do TIC na região entre 13 e 24 min.....	116
Fig. 8 Espectro de RMN de ¹ H de BSPP obtido de <i>T. asperellum</i> (CDCl ₃ , 500 MHz)	118
Fig. 9 Espectro de RMN de ¹³ C de BSPP obtido de <i>T. asperellum</i> (CDCl ₃ , 125 MHz)	119

Fig. 10 Efeito fitotóxico, em sementes de <i>Latuca sativa</i> L., do BSPP produzido pelo fungo endofítico <i>T. asperellum</i>	120
Fig. 11 Teste de aplicabilidade do BSPP e outros emulsificantes em uma matriz alimentícia.....	121

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.....	32
Tabela 2. Principais aplicações dos biossurfactantes.	40

CAPÍTULO I: Artigo 1

Tabela 1. Fatores do delineamento composto central rotacional e as faixas de variação de acordo com os níveis experimentais.....	74
Tabela 2. Isolados fúngicos selecionados na seleção primária para produção de biossurfactante - formação de emulsões.....	77
Tabela 3. Planejamento experimental obtido para o DCCR e os valores experimentais das respostas. Os valores previstos foram apresentados apenas para a variável significativa (% de Tensão Superficial)	85
Tabela 4. Concentração mínima inibitória do biossurfactante encontrada para as bactérias Gram-positivas (<i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i>) e Gram-negativas (<i>E. coli</i> e <i>S. choleraesuis</i>) e em comparação com a amostra padrão de antibiótico o clorafenicol.....	87

CAPÍTULO II: Artigo 2

Tabela 1 Fatores da matriz Doehlert e as faixas de variação de acordo com os níveis experimentais.....	103
Tabela 2 Emulsificantes utilizados na composição das emulsões azeite de oliva - suco de limão (1:1)	107
Tabela 3 Matriz Doehlert da concentração dos fatores, resultados dos ensaios experimentais e somatório dos resultados (resposta múltipla – RM)	108
Tabela 4 Porcentagem de redução da tensão superficial das frações coletadas do BSPP.....	112
Tabela 5 Conteúdo de ácidos graxos obtido por CG do BSPP produzido pelo fungo endofítico <i>T. asperellum</i> CBS 433.97.....	115
Tabela 6 Atribuição dos dados do espectro de RMN de 1H (CDCl ₃ , 500 MHz) das principais cadeias acila identificadas na amostra de BSPP obtida de <i>T. asperellum</i>	118

LISTA DE SIGLAS

Siglas	Significado
MSR	Metodologia de superfície de resposta
GRAS	Generally recognized as safe
FDA	Food and Drug Administration
AESA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)
RMN	Ressonância magnética nuclear
CMC	Concentração micelar crítica
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
MEOR	Microbial Enhanced Oil Recovery
FS	Fermentação submersa
FES	Fermentação em estado sólido
CCR	Composto central rotacional
RM	Repostas múltiplas
EM	Espectrometria de massa
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa - Espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida - Espectrometria de massa
ESI	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
FAB	Fast atom bombardment
I50	Isolado fúngico 50
DCCR	Delineamento composto central rotacional
CRCD	Central rotational composite design
PDA	Potato Dextrose Agar

BSB	Biossurfactante bruto
IE	Índice de emulsificação e estabilidade
TS	Tensão superficial
MIC	Minimum inhibitory concentrations
BSPP	Biossurfactante parcialmente purificado
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
ATR	Attenuated total reflectance
DTGS	Deuterated triglycine sulfate
CL	Cromatografia líquida
EO	Índice de espalhamento do óleo
DAD	Detector de arranjo de diodos
DIC	Detector de ionização de chama
FAME	Fatty acids methyl esters
TIC	Total ion chromatogram
CLA	Ácido linoleico conjugado
TG	Triacilgliceróis

RESUMO

ALVES, M.F. **Produção de biossurfactantes por fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinífera* L.) para potencial aplicação na indústria de alimentos.** Itapetinga-BA: UESB, 2020. 130p. Tese. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de concentração em Ciência de Alimentos)*

Os tensoativos microbianos ou biossurfactantes são compostos anfipáticos formados por um componente hidrofílico e hidrofóbico que possui várias aplicações. Objetivou-se com este trabalho produzir biossurfactantes utilizando fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinífera* L.) para aplicação como aditivos alimentares. Foram avaliados 49 e 26 isolados fúngicos nas etapas de seleção primária e secundária, respectivamente, com a finalidade de selecionar o isolado fúngico com melhor resultado na produção do biossurfactante. Dentre esses, o isolado 50 identificado como *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 se mostrou como melhor produtor. Após a avaliação do meio de cultura em relação as fontes de carbono (glicose, glicerol, sacarose, óleo vegetal e lactose) e nitrogênio (nitrato de sódio, ureia, extrato de levedura, extrato de malte e sulfato de amônio), e em relação ao tempo de fermentação 0, 3, 9 e 15 dias, verificou-se que o óleo de milho e a ureia foram os melhores indutores para a produção do biossurfactante, respectivamente, com 3 dias de fermentação. Utilizando ferramentas estatísticas de superfície de resposta e planejamentos experimentais, foi possível obter os níveis ótimos da concentração de carbono ($C = 9,20 \text{ g.L}^{-1}$) e nitrogênio ($N = 17,46 \text{ g.L}^{-1}$) para a maximização da produção do biossurfactante. O biossurfactante produzido por *T. asperellum* foi identificado como sendo uma mistura complexa formada por ácidos graxos saturados e insaturados, aplicando as técnicas de espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), cromatografia líquida (CL), cromatografia gasosa (CG), CG-Massas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Estes compostos apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, destacando a *Staphylococcus aureus* com uma concentração inibitória mínima de 125 mg.L^{-1} quando comparada com o padrão de Cloranfenicol (100 mg.L^{-1}). O biossurfactante apresentou também baixa toxicidade contra *Artemia salina* L. e em sementes de *Lactuca sativa* L. A concentração de micelar crítica (CMC) observada pela medida da tensão superficial foi de 1400 mg.L^{-1} e pela Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) foi de 1488 mg.L^{-1} . O biossurfactante foi efetivo na emulsificação de uma matriz alimentícia. Portanto, o fungo endofítico *T. asperellum* CBS 433.97 demonstrou ser uma potencial fonte para a produção do biossurfactante, podendo este tensoativo microbiano

ser, possivelmente, aplicado como aditivo na indústria alimentícia.

Palavras-chave: ácidos graxos, aditivos alimentares, microrganismos, tensoativos, otimização.

*Orientadora: Silmara Almeida de Carvalho, Dr^a. UESB e Co-orientadores: Renata Cristina Ferreira Bonomo, Dr^a.UESB; Leandro Soares Santos, Dr. UESB.

ABSTRACT

ALVES, M.F. **Production of biosurfactants by endophytic filamentous fungi isolated from vines (*Vitis vinifera* L.) for potential application in the food industry.** Itapetinga-BA: UESB, 2020. 130p. Thesis. (Doctorate in Engineering and Food Science, Area of concentration in Food Science)*

Microbial or biosurfactant surfactants are amphipathic compounds formed by a hydrophilic and hydrophobic component having various applications. The objective of this work was to produce biosurfactants using endophytic filamentous fungi isolated from vines (*Vitis vinifera* L.) for application as food additives. 49 and 26 fungi isolates were evaluated in the primary and secondary selection stages, respectively, in order to select the fungus isolate with the best result in the production of the biosurfactant. Among these, the fungus identified molecularly as *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 proved to be the best producer. After evaluating the culture medium in relation to carbon and nitrogen sources, it was found that corn oil and urea were the best inducers for the production of the biosurfactant, respectively, with 3 days of fermentation. Using response surface statistical tools and experimental designs, it was possible to obtain the optimal levels of carbon ($C = 9.20 \text{ g.L}^{-1}$) and nitrogen ($N = 17.46 \text{ g.L}^{-1}$) to maximize the production of the biosurfactant. The biosurfactant produced by *T. asperellum* was identified as a complex mixture formed by saturated and unsaturated fatty acids, applying Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, liquid chromatography (GC), gas chromatography (CG), CG - Masses and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). These compounds showed antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, highlighting *Staphylococcus aureus* with a minimum inhibitory concentration of 125 mg.L^{-1} when compared to the chloramphenicol standard (100 mg.L^{-1}). The biosurfactant also showed low toxicity against *Artemia salina* L. and in seeds of *Lactuca sativa* L. The critical micellar concentration (CMC) observed by measuring surface tension was 1400 mg.L^{-1} and by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) was 1488 mg.L^{-1} . The biosurfactant was effective in emulsifying a food matrix. Therefore, the endophytic fungus *T. asperellum* CBS 433.97 proved to be a potential source for the production of the biosurfactant, and this microbial surfactant can possibly be applied as an additive in the food industry.

Keywords: fatty acids, food additives, microorganisms, optimization, surfactants.

*Advisor: Silmara Almeida de Carvalho, Dr^a. UESB e Co-advisors: Renata Cristina Ferreira Bonomo, Dr^a.UESB; Leandro Soares Santos, Dr. UESB.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Diversos microrganismos têm sido aplicados na produção de várias substâncias de interesse econômico tais como, enzimas, antibióticos, vitaminas e aminoácidos. Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos se destacam, pois são utilizados como fontes de produção de metabólitos primários e secundários. Ao longo do tempo já vem sendo estudado fontes variáveis de compostos bioativos e com isso, o isolamento de novos metabólitos fúngicos é uma tendência que continua a ser discutida e explorada (ARCHER et al., 2008; SUN et al., 2011).

Os fungos endofíticos, aqueles que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar aparentemente dano imediato ao seu hospedeiro, apresentam alto potencial na produção de metabólitos secundários com diversas aplicações industriais (TEJESVI et al., 2007), principalmente no que diz respeito a sua utilização para o setor de agricultura no controle biológico de doenças e pragas. Esse interesse biotecnológico tem incentivado pesquisas em relação à bioprospecção de fungos endofíticos (FELBER & PAMPHILE, 2013).

As videiras encontram-se entre as mais antigas plantas cultivadas pelo homem, sendo a uva uma das frutas mais consumidas no mundo, utilizada como base na fabricação de vinhos (CARNEIRO & COELHO, 2007). Os fungos endofíticos de videiras são potencialmente aplicados no controle biológico de patógenos, entretanto seu potencial biotecnológico tem sido pouco explorado, ao contrário do que acontece com fungos endofíticos isolados de outras plantas (RODRIGUEZ et al., 2016).

Na indústria de alimentos, os fungos são empregados como fontes de biomassa e ou subprodutos. A biomassa fúngica pode ser utilizada como fonte de alimentos para animais e apresentam rendimento elevado na sua produção (ZHANG et al., 2008). Já os seus subprodutos incluem uma série de metabólitos secundários, dentre eles, os acidulantes, corantes, aromas e surfactantes (SANKARAN et al., 2010).

Os surfactantes, também conhecidos por tensoativos, compreendem uma classe importante de compostos químicos que são utilizados em vários setores industriais. São moléculas anfifílicas com propriedades que a depender de sua natureza química podem apresentar a formação de macro e micro emulsões, ação espumante, adsorção, formação de micelas ou antiespumante, solubilidade e detergência (NISTCHKE & PASTORE, 2002). Embora os tensoativos de síntese químicas sejam altamente eficazes, tais substâncias tendem a ser tóxicas e perigosas para o ambiente. Esse problema pode ser minimizado ou até mesmo evitado por meio da utilização de surfactantes microbianos ou biosurfactantes, que são compostos biológicos produzidos extracelularmente ou como parte de membranas celulares de

uma variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CHEN et al., 2007; LAWNICZAK et al., 2013).

Os biossurfactantes são facilmente degradados no ambiente e específicos na sua ação, devido à presença de grupos funcionais característicos (BHARALI et al., 2011), têm melhores propriedades de formação de espuma e são estáveis em intervalos extremos de pH, temperatura e salinidade, e podem ser produzidos a partir de várias substâncias, incluindo açúcares, óleos e resíduos (RAHMAN & GAKPE, 2008). Suas principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (BANAT et al. 2000). Os biossurfactantes podem ser utilizados na indústria alimentar como emulsionantes, solubilizantes, agentes antiadesivos e antimicrobianos (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

Mesmo com todas essas vantagens, existe ainda uma dificuldade no desenvolvimento de um processo eficiente e econômico para sua obtenção. A otimização das condições da produção do biossurfactante está entre as abordagens mais importantes para maximizar a produção (BANAT et al., 2014). Para encontrar as condições ideais de um processo, usualmente são empregados planejamentos experimentais como, composto central rotacional, planejamento Box Behnken e a Matriz Doehlert, bem como a metodologia de superfície de resposta (MSR) (DEEPIKA et al., 2016; FERREIRA et al., 2004). As ferramentas estatísticas são empregadas com sucesso na otimização da etapa de produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos (BHANGE et al., 2016; SANTOS et al., 2014).

Assim, a busca por fungos produtores com alto rendimento pode nos levar à descoberta de novos produtores potentes de biossurfactantes. O estudo sobre fungos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinífera* L.) representa essa nova abordagem, podendo ser bastante explorado o seu aproveitamento. Com isso, este trabalho tem como objetivo estudar a produção de biossurfactantes por fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinífera* L.) com potencial para aplicação como aditivos alimentares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos

Os fungos são seres eucarióticos e heterotróficos, eficazes na degradação de uma vasta gama de substratos. Ocorrem em associações com outras espécies, tais como, líquens ou micorrizas, como patógenos de animais e plantas ou como espécies de vida livre. Por mecanismo de absorção é realizado a sua nutrição, graças à presença de enzimas, as quais são produzidas e empregadas na degradação dos nutrientes (MUELLER & SCHMIT, 2007). São capazes de estarem presentes nos mais diversos habitats, devido à sua diversificação ao longo do processo evolutivo, proporcionando ampla diversidade genética e metabólica (GRIMM et al., 2005). A sua morfologia pode ir de formas pluricelulares, os fungos filamentosos, a tipos unicelulares, as chamadas leveduras (BOTHÁ, 2011).

Os fungos são conhecidos por produzirem metabólitos que têm sido investigados como produtos naturais (metabólitos secundários) para aplicação médica, industrial e agrícola (LIU et al., 2008). As substâncias produzidas podem ser classificadas em metabólitos primários, que são moléculas produzidas ao longo do crescimento vegetativo e em metabólitos secundários, estruturas químicas que não apresentam função no crescimento celular, que geralmente são bioativos e de baixa massa molecular (BRAKHAGE et al., 2010).

Segundo estudos, acredita-se que existam mais de 1,5 milhões de espécies fúngicas, porém apenas 100 mil foram descritas (MENOZZI et al., 2017). Dentro no Reino Fungi são destacados três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos, sendo os dois primeiros classificados fungos microscópicos e o último macroscópico (ARCHER et al., 2008).

No grupo dos fungos filamentosos, algumas espécies como o *Trichoderma reesei*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Acremonium chrysogenum* são utilizados há muito tempo pelo setor industrial de alimentos. Estes microrganismos possuem status GRAS (*Generally recognized as safe*) de acordo com o FDA (*Food and Drug Administration*), que indica que o produto químico ou substância adicionada ao alimento é considerado seguro (IWASHITA, 2002).

As leveduras também são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, por exemplo, são empregadas na produção de pães, bebidas alcoólicas, como fontes de alimentos, vitaminas e outros fatores de crescimento. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o eucarioto mais estudado devido a sua importância nos processos biotecnológicos, seja na produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas ou na panificação, como também, na produção de

combustível renovável, dessa forma também é admitido o status GRAS (GUIMARÃES et al., 2010).

Os fungos macroscópicos são diretamente reconhecidos pelo grupo dos cogumelos comestíveis, que sempre foram apreciados por seu valor gastronômico, nutricional e medicinal. Com relação aos seus atributos medicinais é possível relatar, efeitos antivirais, anti-hipertensivos, antiateroscleróticos, hepatoprotetores, antidiabéticos, anti-inflamatórios, moduladores do sistema imune, antibacterianos, antiparasitários e antitumorais. Porém algumas espécies podem desencadear efeitos nocivos ao homem (PHILIPPOUSSIS, 2009).

Os fungos podem ser classificados em epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais, e endofíticos, que são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, habitando, de modo geral, suas partes aéreas, como folhas e caules sem causar aparentemente danos aos seus hospedeiros (SOUZA et al., 2004). Os compostos bioativos produzidos pelos endofíticos podem ter propriedades antibacterianas, antifúngicas e antibiofilme (ASHITHA et al., 2020). Os endofíticos contribuem para a planta produzindo uma infinidade de substâncias que propiciam benefícios de proteção e sobrevivência à planta hospedeira (PATIL et al., 2016). A transmissão pode ocorrer horizontalmente, por meio de esporos transportados pelo ar, ou podem ser transmitidos verticalmente, através de sementes do hospedeiro, como no caso de fungos endofíticos de gramíneas (HARTLEY & GANGE, 2009). Alguns fungos endofíticos podem sintetizar metabólitos secundários iguais ou semelhantes aos seus hospedeiros. Essas características dos fungos endofíticos favorece a produção de compostos ativos por fermentação industrial (KUSARI et al., 2012).

2.2 Aplicação de fungos na produção de substâncias diversas

Para a indústria, os microrganismos são particularmente importantes, pois conseguem sintetizar uma série de produtos valiosos, que incluem bebidas, aditivos alimentares, produtos para a saúde humana e animal e biocombustíveis. Apresentam capacidade de produzir compostos químicos que não foram sintetizados no laboratório como também aqueles em que sua produção é difícil (PAUL et al., 2019).

Atualmente, a grande maioria das indústrias buscam sistemas alternativos para obter seus principais produtos de forma mais sustentável. Isso mostra a crescente demanda do mercado consumidor por produtos naturais em substituição aos aditivos sintéticos (PÊSSOA et al., 2019).

A aplicação de fungos filamentosos como fonte alternativa na produção de diversas substâncias nas indústrias farmacêuticas e de alimentos se deve, principalmente, pelo

crescimento relativamente fácil em processos fermentativos, sendo bem adaptáveis à produção em escala industrial (SMEDSGAARD & NIELSEN, 2005). Produzem uma ampla variedade de enzimas extracelulares e metabólitos primários, incluindo os ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico, glucônico e fumárico. O emprego dos fungos filamentosos na produção de enzimas extracelulares, em especial a lipase, é devido à maior estabilidade no processo, bem como a diversidade de substratos que podem ser utilizados (GEOFFRY & ACHUR, 2018). Também produzem metabólitos secundários importantes, por exemplo, penicilina e cefalosporina. Muitas destas substâncias apresentam propriedades bioativas, como antibióticos, agentes redutores de colesterol, agentes antitumorais e imunossupressores (PUNT et al., 2002; SMEDSGAARD & NIELSEN, 2005). Além da produção de substâncias bioativas com aplicação farmacêutica, os fungos filamentosos são utilizados para produção de diversas substâncias, como aditivos alimentares como acidulantes, corantes, vitaminas, antioxidantes, aromas, substituintes, enriquecimento alimentar, dentre outros (JASIM et al., 2013).

Os fungos filamentosos são reconhecidos no dia a dia, principalmente, pelo seu surgimento durante a deterioração de alimentos. A presença dos fungos filamentosos em alimentos também pode ser útil, como na produção dos queijos tipo Roquefort, Gorgonzola e os queijos azuis, onde a inoculação e desenvolvimento da espécie *Penicillium roqueforti* promove a presença de sabores e aromas peculiares, como o composto volátil aristoloqueno produzido especificamente pela espécie *P. roqueforti* (DALL'ASTA et al., 2008; KARLSHØJ & LARSEN, 2005).

Na produção de agentes biotensioativos ou biossurfactantes, estudos foram realizados utilizando algumas espécies de fungos como potenciais produtores desses compostos. Dentre os fungos, o *Aspergillus ustus* (KIRAN et al., 2009), *Curvularia lunata* (PARASZKIEWICZ et al., 2002), *Pseudozyma sp.* (MARCHANT & BANAT, 2012) e *Trichoderma sp.* (LIU et al., 2006) tem sido abordados na literatura.

2.3 *Trichoderma sp.*

O gênero *Trichoderma* é muito explorado devido ao seu grande potencial de aplicação industrial e biotecnológico (HE et al., 2019; LEA et al., 2018). Este microrganismo compreende os fungos de vida livre, com reprodução assexuada e que estão presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (HARMAN et al., 2004). Além disso, também é encontrado em diferentes materiais vegetais, bem como, raízes colonizadoras, lixo, madeira em decomposição e casca em decomposição (LEE et al., 2012).

Este gênero foi descrito pela primeira vez por Parsonn em 1794. Porém, a sua classificação foi considerada contraditória e duvidosa, com isso posteriormente foram feitas novas descrições realizadas por Rifai em 1969. Ele classificou o gênero *Trichoderma* de maneira mais viável e agregou novas espécies. O estudo avançado de *Trichoderma* foi realizado por Samuels em 1996, que desenvolveu metodologias baseadas em técnicas e ajudou a melhorar o entendimento do gênero até o nível da espécie (HARMAN et al., 2004; SAMUELS, 1996). Pelo menos 254 espécies de *Trichoderma* foram identificadas anteriormente (BISSETT et al., 2015). Entre o ano de 2015 e 2018, 71 espécies a mais de *Trichoderma* foram recentemente identificadas, e há, sem dúvida, muitas mais aguardando descoberta (QIAO et al., 2018).

De acordo com o Index Fungorum (ver www.indexfungorum.org), classifica o gênero *Trichoderma* como: pertencente ao Domínio Eucaryota, “Grupo” Fungi/Metazoa, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Subclasse Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, “Família” Hypocreales mitosporicos (ou Famíliaia Hypocreacea), Gênero *Trichoderma*.

O *Trichoderma* promove o crescimento das plantas e funciona como um agente de biocontrole contra diversos patógenos vegetais. Ele coloniza na Rizosfera e na superfície das raízes das plantas e cria uma barreira para a invasão de patógenos vegetais, promovendo a defesa geral da planta. As enzimas líticas quitinases e β 1,3-glucanases produzidas pelo *Trichoderma spp.*, hidrolisam a parede celular dos patógenos, limitando o crescimento de patógenos fúngicos (BENÍTEZ et al., 2004). Antigamente, existia uma hipótese de que o *Trichoderma* não crescia como endofítico, porém estudos recentes destacam as suas atividades endofíticas em diferentes plantas (PATEL et al., 2019).

Por meio de metodologias bioquímica e da taxonomia, os pesquisadores identificaram um total de 104 espécies do gênero *Trichoderma* (SAMUELS et al., 2006). A grande parte das espécies deste gênero caracterizam-se por utilizarem uma variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, serem tolerantes a diferentes tipos de fungicidas e resistentes a inibidores produzidos por outros microrganismos (DARYAEI et al., 2016). Apresentam uma vasta diversidade genética sendo capazes de produzir proteínas extracelulares com potencial enzimático como, quitinases e celulasas (BUBICI et al., 2019). Espécies desse fungo contribui para o crescimento de plantas devido a sua capacidade em produzir sideróforos, enzimas solubilizadoras de fosfato e reguladores do crescimento vegetal (LÓPEZ-BUCIO et al., 2015).

Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são caracterizados pela produção de esporos (conídios) de vários tons de verde e pelo rápido crescimento. Eles apresentam diversidade genética de alto nível e são utilizados para a produção de vários produtos de interesse ecológico e comercial (WOO et al., 2006). Por ser um agente de controle biológico, o

Trichoderma spp. são comercialmente vendidos como biopesticidas, biofertilizantes e inoculantes do solo (HARMAN et al., 2004).

O *Trichoderma* é considerado um forte fungo antagonista e sua existência em qualquer solo suprime a população de outros microrganismos competitivos, tornando-o um agente de biocontrole dominante no local (AZARMI, 2011). O antagonismo mediado por este gênero envolve a implantação de diversos mecanismos como: antibiose, que ocorre com a produção de substâncias capazes de inibir o crescimento ou até mesmo destruir o patógeno; o micoparasitismo, que se inicia pelo reconhecimento do patógeno e, com a produção de várias enzimas extracelulares permite a absorção dos nutrientes que finalmente levará a morte do patógeno; e resistência da planta hospedeira, que constitui um importante mecanismo de supressão de doenças realizado pelo agente de biocontrole (HERMOSA et al., 2012).

As espécies de *Trichoderma* são fungos filamentosos encontrados em uma variedade de ecossistemas. Entre essas espécies, algumas comumente estudadas na literatura são *T. asperellum*, *T. ghanense*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. viride*, *T. virens*. O *T. harzianum* é considerado um dos fungos mais comuns do gênero, utilizados no controle biológico de fungos fitopatogênicos, são facilmente recuperados dos mais variados tipos de solo (HARMAN, 2002). Lima (2002) observou que os isolados do *T. harzianum* apresentaram alta capacidade micoparasítica e produção de enzimas hidrolíticas. O *Trichoderma asperellum* é uma dessas espécies também que são utilizadas no controle de patógenos vegetais, incluindo por exemplo, o patógeno *Fusarium* em tomates (SEGARRA et al., 2010). Estudos realizados por Silva e colaboradores (2018) demonstraram que o isolado *T. asperellum* IBLF 914 pode ser compatível com os demais tratamentos fitossanitários utilizados na cultura da alface. O controle biológico efetivo desta espécie também foi comprovado em outro estudo para *Phytophthora megakarya* (MGARBA et al., 2014).

Alguns isolados do *Trichoderma* também foram investigados na produção de compostos surfactantes microbianos, os biossurfactantes. Durante os processos de biossorção de cádmio, foi verificado que o gênero *Trichoderma sp.* produziu biossurfactantes demonstrando a importância deste composto nos processos de remoção de metais de meios líquidos (COLLA et al., 2012). A maioria dos estudos encontrados na literatura mostra a ação do *Trichoderma spp.* como agente de biocontrole. Contudo ainda são poucos os estudos que correlacionam à ação do *Trichoderma sp.* como produtores de biossurfactantes.

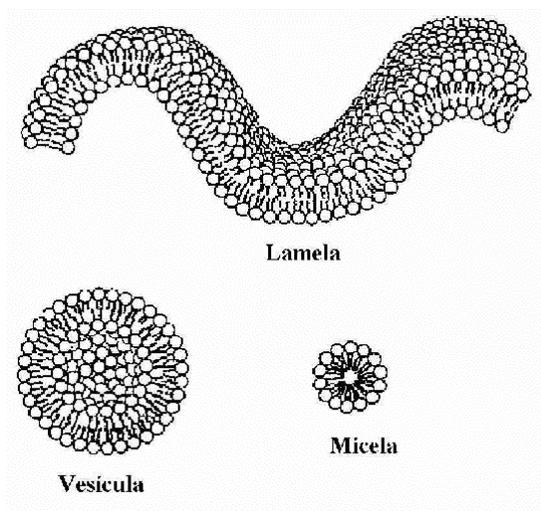
2.4 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são compostos produzidos por microrganismos, dentre eles, bactérias, leveduras e fungos filamentosos que sintetizam substâncias com propriedades surfactantes. São compostos anfifílicos (constituídas de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica), com alta atividade emulsificante, que atuam na interface das emulsões e apresentam estabilidade e funcionalidade a temperatura, pH e concentração de sais semelhante aos surfactantes sintéticos (ABDEL-MAWGROUND & LÉPINE, 2010).

Existe uma tendência para substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais, principalmente por serem biodegradáveis e por apresentarem baixa toxicidade, além de apresentarem excelente atividade de superfície e adequados ao meio ambiente (MOUAFI et al., 2016; SHARMA et al., 2018). Os biossurfactantes são obtidos de substratos renováveis que podem ser modificados pela engenharia genética, biologia e bioquímica (MONTEIRO et al., 2010).

As estruturas básicas formadas por biossurfactantes podem ser vesículas esféricas ou irregulares, micelas, estruturas lamelares, entre outras (Figura 1) (MULLIGAN et al., 2001).

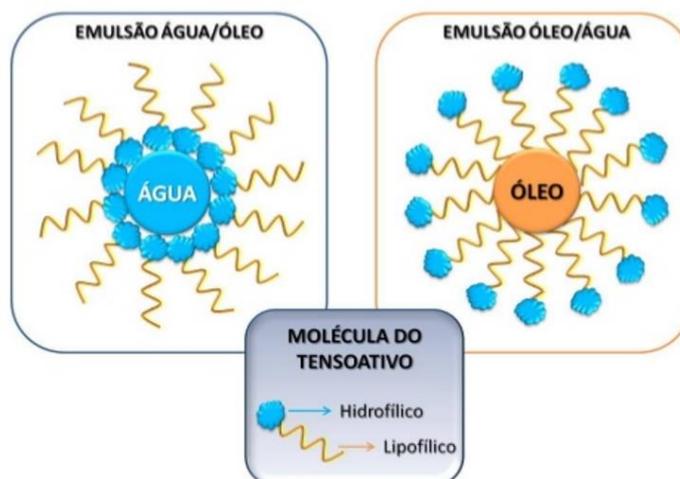
Figura 1. Estruturas básicas formadas por biossurfactantes.



Fonte: CHAMPION et al., 1995.

Devido à aglomeração na interface em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os biossurfactantes apresentam diferentes graus de polaridade, como óleo/água e água/óleo (Figura 2), o que permite reduzir a tensão interfacial e a tensão superficial pela formação de um filme molecular entre duas fases imiscíveis (BARATHI & VASUDEVAN, 2001).

Figura 2. Esquema representativo das estruturas de micelas das fases água em óleo, óleo em água e a estrutura de uma molécula do tensoativo.



Fonte: SARTORI et al., 2010.

Uma diversidade de microrganismos, em sua maioria bactérias, são amplamente utilizadas na produção dos biossurfactantes, dentre elas, a *Corynebacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Haloarcula sp.* e *Candida sp.* (LUNA et al., 2008; PINTO et al., 2009; TARAN et al., 2012).

Na literatura, a maioria dos estudos utilizam as bactérias para a produção de biossurfactantes, no entanto, a parede e a membrana celular das bactérias são mais sensíveis a altas concentrações de biossurfactantes e, a natureza patogênica de algumas bactérias limita a aplicação desses compostos (AMARAL et al., 2010; ELSHIKH et al., 2017). Por isso, a busca de outros microrganismos para a produção de biossurfactantes aumentaram nos últimos anos.

As leveduras são potentes produtores de biossurfactantes e possuem características promissoras para aplicações industriais (ALMEIDA et al., 2017; BOGAERT et al., 2016). Seus produtos são utilizados em indústrias farmacêuticas, particularmente como agentes antimicrobianos, antitumorais, antivirais e também nas indústrias alimentícias (DE OLIVEIRA et al., 2015). Entre as leveduras, o *Aureobasidium pullulans* é o mais relatado como produtor de biossurfactante (BRUMANO et al., 2017; LEATHERS et al., 2015).

A produção de biossurfactantes utilizando fungos filamentosos é menos frequente quando comparado a outros microrganismos. Geralmente isso acontece devido a produção em alguns casos de micotoxinas e ao seu crescimento mais lento. No entanto, são excelentes produtores de biossurfactantes, com capacidade de prover emulsões estáveis que permitem sua aplicação em diversos setores (SILVA et al., 2018). Os trabalhos encontrados na literatura que

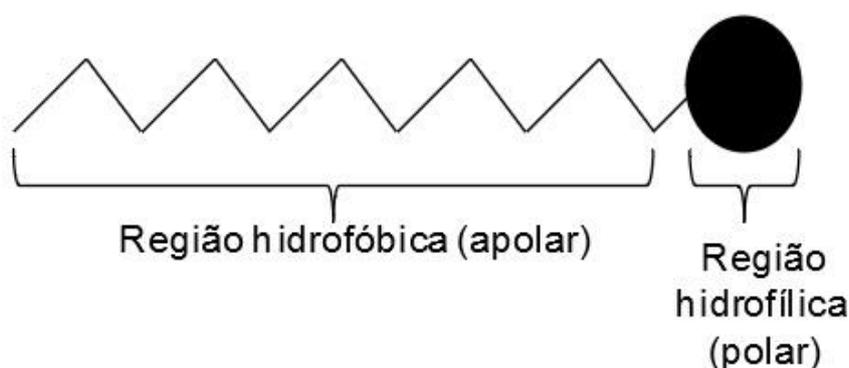
utilizaram os fungos filamentosos na produção de biossurfactantes, mostraram que seus metabólitos são estáveis às condições extremas, como pH, temperatura, sal, entre outros (LUNA-VELASCO et al., 2007). Alguns dos fungos filamentosos que já foram estudados na obtenção de biossurfactantes: a *Curvularia luneta* (PARASZKIEICZ et al., 2002); *Penicillium citrinum* (CAMARGO DE MORAIS et al, 2003); *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium sp* (MARTINS et al, 2008) e *Aspergillus fumigatus* (CASTIGLIONI et al., 2009). Os estudos envolvendo fungos ressaltam a importância de uma maior busca de fungos filamentosos que tenham capacidade de produzir biossurfactantes (KIRAN et al, 2009).

2.5 Tipos de Biossurfactantes

Com base em sua composição química, peso molecular, propriedades físico-químicas, modo de ação e origem microbiana, os biossurfactantes podem ser classificados em: glicolipídeos, fosfolipídeos, lipopolissacarídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos e lipídios neutros, como também, surfactantes particulados e poliméricos (CHEN et al., 2015).

A parte apolar dos biossurfactantes normalmente é composta por um hidrocarboneto contendo um ou mais ácidos graxos, podendo ser saturados ou insaturados, e a parte polar pode ser simples como uma carboxila ou função hidroxila ou complexa com fosfatos, carboidratos, aminoácidos entre outros (COOPER et al., 1981) (Figura 3).

Figura 3. Representação da estrutura orgânica de um biossurfactante.



Fonte: COOPER et al., 1981.

Na tabela 1, estão apresentados os microrganismos segundo o tipo de biossurfactantes produzidos. Os glicolipídeos são hidróxi-ácidos graxos ligados a uma molécula de açúcar através de uma ligação glicosídica, envolvendo nessa classe os sofrólipídeos e os raminolipídeos (HOLMBERG, 2001).

Os fosfolipídeos encontram-se presente em vários microrganismos e são compostos pelo grupo fosfato (polar) ligado a uma cauda constituída por cadeias de ácidos graxos (apolares). Os lipopolissacarídeos são moléculas de alto peso molecular solúveis em água (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os principais ácidos graxos e lipídeos neutros encontrados nas estruturas celulares dos biossurfactantes e que possuem atividade superficial são, o ácido ustilágico, ácido lipoteicóico e proteínas hidrofóbicas. Na classe dos biossurfactantes poliméricos, os mais intensamente estudados são emulsan, alasan e liposan (SATPUTE et al., 2010).

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.

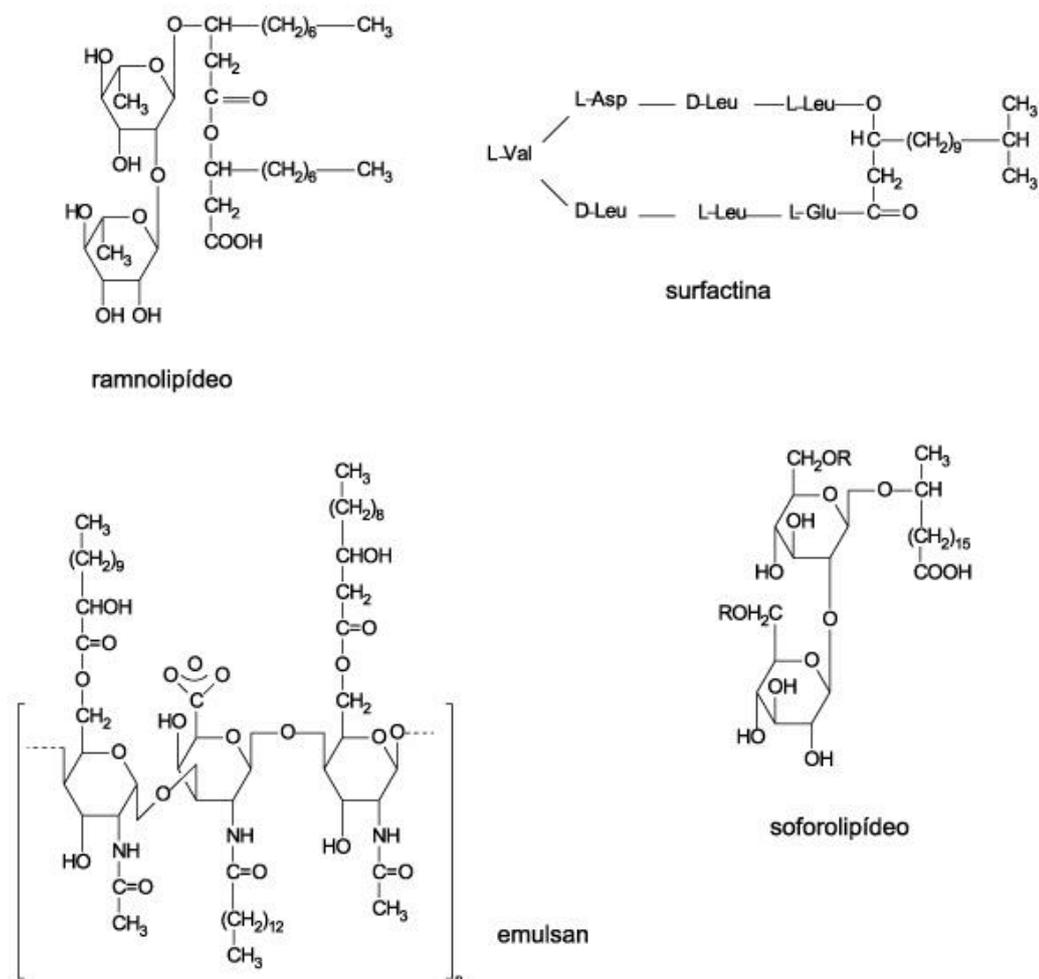
Tipo de biossurfactante	Microrganismo
GLICOLIPÍDEOS	
<ul style="list-style-type: none"> • Ramnolipídeos • Soforolipídeos • Trealolipídeos 	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudozyma rugulosa</i> <i>Mycobacterium sp</i>
LIPOPEPTÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS	
<ul style="list-style-type: none"> • Peptídeo-lipídeo • Viscosina • Serrawetina • Surfactina • Subtilisina • Gramicidina • Polimixina 	<i>Candida glabrata</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDEOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDEOS	
<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos graxos • Lipídeos neutros • Fosfolipídeos 	<i>Aureobasidium thailandense</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Aspergillus sp.</i>
SURFACTANTES POLIMÉRICOS	
<ul style="list-style-type: none"> • Emulsan • Biodispersan • liposan • carboidrato-lipídeo-proteína • manana-lipídeo-proteína 	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Cândida lipolytica</i> <i>Yarrowia lipolytica NCIM 3589</i> <i>Cândida tropicalis</i>
SURFACTANTES PARTICULADOS	
<ul style="list-style-type: none"> • vesículas • células 	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Várias bactérias

Fonte: NITSCHKE & PASTORE, 2002.

Os lipopeptídeos são constituídos por um peptídeo (porção hidrofílica) ligado a um ácido graxo (porção hidrofóbica), tendo a surfactina como o biossurfactante mais eficaz e conhecido (SEYDLOVÁ & SVOBODOVÁ, 2008). A surfactina é muito utilizada em indústrias petrolíferas nos processos de recuperação microbiana de petróleo e na biorremediação, e em indústrias biomédicas como agentes terapêuticos (RODRIGUES et al., 2006; SINGH et al., 2007).

De modo geral, os biossurfactantes apresentam estrutura semelhante, podendo ser neutros, ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até grandes cadeias poliméricas. Na figura abaixo (Figura 4) está apresentada a estrutura química de alguns biossurfactantes relatados na literatura (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Figura 4. Estrutura química de alguns biossurfactantes.

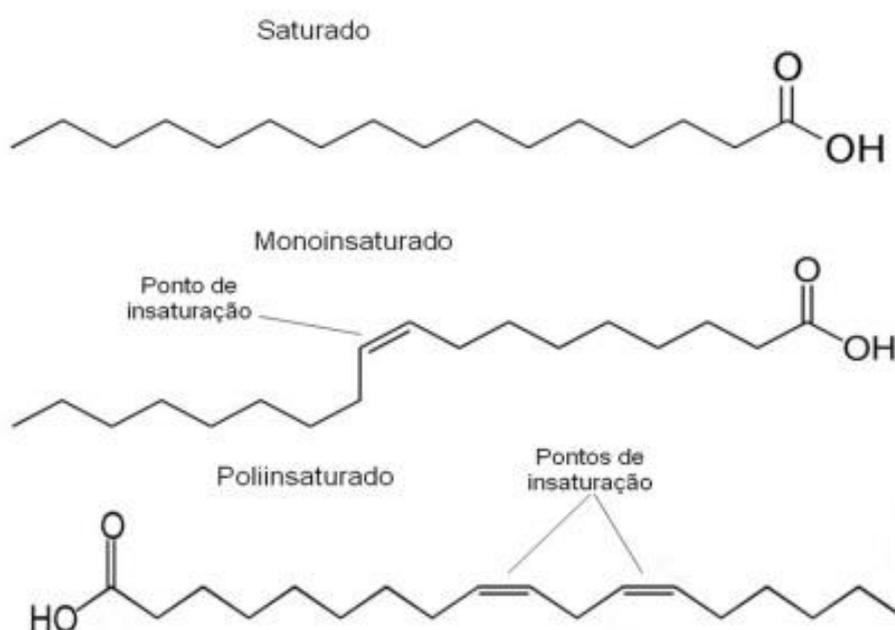


Fonte: NITSCHKE & PASTORE, 2002.

2.6 Ácidos graxos presentes na estrutura dos Biossurfactantes

Os principais ácidos graxos produzidos por microrganismos são o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) (FEI et al., 2011). Os ácidos graxos são constituídos por cadeias de átomos de carbono que se ligam a átomos de hidrogênio com um radical ácido em uma de suas extremidades (Figura 5). Podem se apresentar na forma saturada (ligações simples) ou insaturada (com uma ou mais ligações duplas) (MELO et al., 2015).

Figura 5. Exemplos de ácidos graxos.

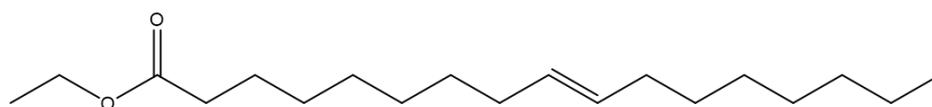


Fonte: SANTOS, 2016.

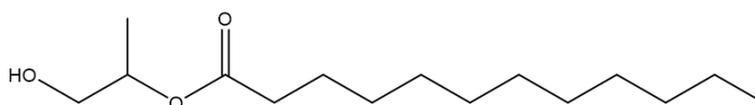
A maioria dos biossurfactantes relatados na literatura, apresentam em sua estrutura os ácidos graxos ligados a um outro componente, por exemplo açúcares, proteínas, grupos fosfato. Os ácidos ustilágico e lipoteicóico foram citados em estudos envolvendo os tipos de biossurfactantes, como sendo a estrutura principal (SATPUTE et al., 2010).

Alguns ésteres de ácidos graxos são aprovados como aditivos ou ingredientes na indústria de alimentos (Figura 6) permitidos por órgãos regulamentadores de referência mundial como Food and Drug Administration (FDA) e Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESAs), bem como pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (SILVA et al., 2015).

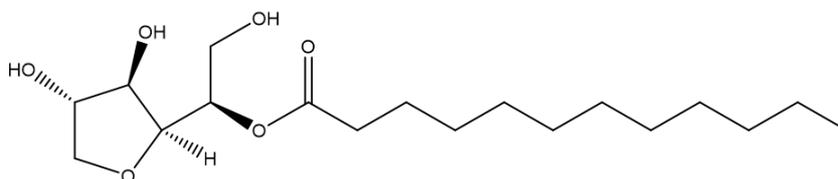
Figura 6. Principais ésteres de ácidos graxos aprovados para uso alimentar como surfactantes e suas estruturas químicas.



Oleato de etila



Monolaurato de propilenoglicol



Monolaurato de sorbitano

Fonte: SILVA et al., 2015.

Como os biossurfactantes possuem uma estrutura comum, que é uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos e uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato, a maioria deles possuem variados tipos de ácidos graxos em sua estrutura (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Ao avaliar a constituição de ácidos graxos do biossurfactante produzido por *P. spinulosom*, após 96 horas de fermentação, Santos (2016) verificou que o ácido oleico foi o ácido graxo encontrado em maior percentual (71%), seguido do ácido esteárico, ácido linoleico e o ácido palmítico. Almataawah (2017) avaliou biossurfactantes produzidos pela bactéria *Burkholderia cepacia* que continham ácidos graxos C18 insaturados em maior abundância (94,9%), seguido por C17 (5%), C16 (0,32%) e C14 (0,12%).

Por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e pela Ressonância magnética nuclear (RMN), Maheshwari e colaboradores (2017) identificaram a presença de peptídeos e de ácidos graxos de cadeia longa no biossurfactante produzido por *Bacillus* sp. Éster metílico de ácido graxo juntamente com quatro resíduos de aminoácidos (serina, treonina, tirosina e valina) foi relatado por Balan e colaboradores (2017) na estrutura do biossurfactante por *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11. Vecino e colaboradores (2017)

verificaram um alto percentual de ácidos graxos C16 e C18 foram verificados no biossurfactante produzido *Lactobacillus paracasei*, sendo o ácido palmítico o mais abundante (36,8-43,9%), seguido pelo ácido esteárico (26,1-35,9%).

De forma geral, a grande parte dos estudos publicados na literatura relatam que os biossurfactantes são compostos por ácidos graxos de cadeia longa, como linoleico, ácido oleico e ácido palmítico (VECINO et al., 2014).

2.7 Propriedades dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes exibem diversas propriedades que os tornam adequados para serem utilizados como agente umectante, emulsificante, detergente, dispersante e solubilizante para aplicações industriais (MISHARA et al., 2009).

Os tensoativos microbianos apresentam tolerância à temperatura, força iônica e pH, tornando-se uma alternativa para aqueles processos em que se utilizam condições extremas dessas variáveis. São facilmente degradáveis no solo e na água, por isso muito utilizados em tratamento de resíduos e biorremediação. A baixa toxicidade permite o uso principalmente na área de alimentos, e podem ser produzidos a partir de matérias primas renováveis e de baixo custo (MARCHANT & BANAT, 2012; MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes também podem exibir propriedades antimicrobianas e anti-adesivas, sendo importantes no controle de microrganismos patogênicos em superfícies que estão em contato com alimentos, impedindo a formação de biofilmes (NITSCHKE & COSTA, 2007).

A propriedade do biossurfactante de formar emulsão ocorre quando um componente imiscível como um hidrocarboneto é colocado em uma solução aquosa contendo o biossurfactante, e as porções hidrofílicas e hidrofóbicas deste composto se ligam a água e ao hidrocarboneto, respectivamente, provocando a dispersão de um líquido em outro (SOUZA et al., 2014). A emulsão é uma propriedade muito útil na indústria de alimentos, especialmente na produção de queijos macios e sorvetes, pois a adição de emulsificantes contribui com a textura e cremosidade destes produtos (NITSCHKE & COSTA, 2007).

Outra propriedade interessante é a capacidade desses compostos em reduzir a tensão superficial e interfacial entre sólidos, líquidos e gás (CHANDANKERE et al., 2013), e conseguir dispersar substrato insolúveis em solução aquosa (BENINCASA et al., 2004). Quanto menor a força de atração que existe entre as moléculas do líquido, menor será a tensão superficial, possibilitando, menor viscosidade e maior tendência à difusão (CERQUEIRA & COSTA, 2009).

A redução da tensão superficial depende da concentração micelar crítica (CMC), ou seja, a concentração mínima necessária para formar micelas. O valor da CMC pode variar de acordo com a forma e o tamanho da micela, que por sua vez depende dos tipos dos grupos “cabeças” e das partes hidrofóbicas “caudas”, que realmente participam na formação de micelas. Biossurfactantes aumentam a área superficial de substâncias hidrofóbicas insolúveis em água e a biodisponibilidade da água dessas substâncias, e também altera as propriedades da superfície da célula bacteriana (VARJANI et al., 2014).

A capacidade de alterar a tensão superficial e a interfacial, bem como a estabilização de emulsões são propriedades que determinam a eficácia do biossurfactante (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; SOUZA et al., 2014). De acordo com Christofi e Ivshina 2002, as propriedades dos biossurfactantes estão relacionadas de acordo com o seu peso molecular. Os biossurfactantes com baixo peso molecular são mais efetivos na redução das tensões superficiais e interfaciais, enquanto que os biossurfactantes com alto peso molecular têm melhor desempenho em processos de emulsão.

2.7.1 Concentração micelar crítica (CMC)

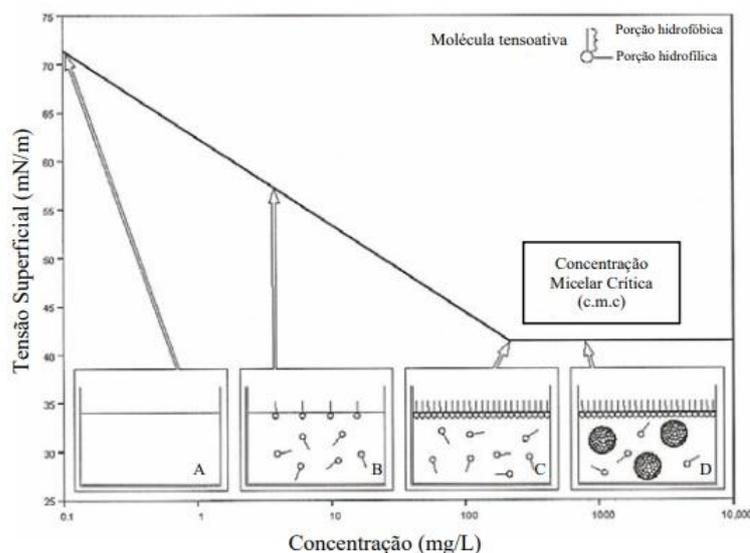
A CMC pode ser usada como um indicador da eficiência de qualquer surfactante/biossurfactante (DESAI & BANAT, 1997). Esta determina a concentração do biossurfactante necessária para a saturação do meio e formação de micelas, que representam a configuração das moléculas do tensoativo com melhor estabilidade na solução, com a parte hidrofílica das moléculas voltada para a água e as cadeias hidrofóbicas agrupadas. Devido a formação de micelas a partir dessa concentração (CMC), a tensão superficial entre a fase aquosa/oleosa muda muito pouco (SANTOS et al, 2007).

A concentração micelar crítica (CMC) dos tensoativos pode ser determinada por meio de mudanças no comportamento de suas propriedades físicas em solução, por exemplo, viscosidade, espalhamento de luz, condutividade elétrica, tensão superficial, pressão osmótica e capacidade de solubilização de solutos (AKHTER, 1997; BENITO et al., 1997; YSAMBERTT et al., 1998). Geralmente uma das técnicas mais empregada na determinação do CMC é a medida da tensão superficial.

A figura 7 apresenta o comportamento do tensoativo através de mudanças na tensão superficial, para diferentes concentrações do tensoativos. Ao adicionar tensoativos na água, o meio tende a saturar todas as interfaces (situação B e C) de maneira que a partir de uma determinada CMC, ocorre a saturação do meio e a formação de micelas (situação D). A formação de micelas diminui a área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante

e da água, resultando na solubilização de substâncias hidrofóbicas em água, dando origem a emulsão (OLIVEIRA, 2010).

Figura 7. Comportamento do tensoativo entre as fases fluida e superficial, em função da tensão superficial, indicando a CMC.



Fonte: SANTOS et al., 2007.

Estudos envolvendo a produção de biossurfactantes demonstraram que os valores da CMC determinada por meio da medida da tensão superficial, variaram entre 50 e 2500 mg.L⁻¹ (DEEPIKA et al., 2016; KAYA et al., 2014; MARIN et al., 2015; MENESES et al., 2017; OLIVEIRA & GARCIA-CRUZ, 2013). Geralmente os biossurfactantes apresentam mais baixas concentrações de micelas críticas (CMCs) do que os surfactantes químicos tradicionais (VAN HAMME et al., 2006) e quanto menor a CMC, mais eficiente é o biossurfactante produzido (BOGNOLO, 1999).

Outra técnica que pode ser uma alternativa na determinação da CMC é a calorimetria por titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry* - ITC). Com esta técnica é possível à determinação direta de valores de entalpia, além de outros parâmetros como constante de equilíbrio, constantes de ligação e outros. Esta técnica tem como objetivo o estudo do calor gerado ou absorvido pelo sistema durante o processo. Se o processo libera calor, o fluxo de calor que vai para a célula de amostra deverá diminuir (processo exotérmico). Se absorve calor, o fluxo deverá aumentar (processo endotérmico). Quando o fluxo se mantém constante, ou seja, não acontece a absorção ou liberação do calor, corresponde à linha de base. É neste momento

que a concentração micelar crítica do biossurfactante é determinada. É o ponto em que concentrações maiores do composto não vão interferir na energia do sistema (REIS et al., 2012). Essa CMC depende de vários fatores, tanto intrínseco ao tipo de molécula do biossurfactante, grupo iônico/não iônico na cabeça, quanto extrínsecos, relacionados ao ambiente, como temperatura, adição de eletrólitos e adição de co-surfactantes (ATTWOOD & FLORENCE, 1983).

Assim, a concentração micelar crítica (CMC), a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e a formação de emulsões e estabilidade, são propriedades importantes avaliadas na busca de novos biossurfactantes para aplicação na indústria (MUTHUSAMY et al., 2008).

2.8 Aplicação dos biossurfactantes nas indústrias

Por apresentar essas propriedades, os biossurfactantes podem substituir os surfactantes químicos em muitas aplicações industriais. Dada a grande preocupação com o risco ambiental desses surfactantes químicos, a busca por alternativas “verdes” de acordo com Grand View Research (2015) deverá aumentar até USD 2800 milhões até 2023, com uma produção mundial de cerca de 462 quilos por ano.

Os biossurfactantes foram utilizados inicialmente para processos de biorremediação (MARCHANT & BANAT, 2012), porém com avanços das pesquisas, outras áreas de utilização surgiram, tais como petrolífera, cosméticos, produtos químicos especiais, alimentos, farmacêutica, agricultura e produtos de limpeza (DAOSHAN et al., 2004; JOSHI et al., 2008; LOTFABADA et al., 2009).

A biorremediação é uma técnica utilizada para tratamento de solos e águas contaminados com hidrocarbonetos. Os biossurfactantes são eficientes no tratamento de regiões contaminadas pela presença de petróleo e seus derivados, e atuam aumentando a área interfacial óleo/água e acelerando a degradação de óleos por microrganismos (ZHU et al., 2004).

Na indústria petrolífera, a área de potencial aplicação do biossurfactante é o campo da recuperação melhorada do óleo por microrganismos (*Microbial Enhanced Oil Recovery - MEOR*). É um método utilizado para recuperar óleo remanescente em reservatório e que utiliza microrganismos e/ou seus metabólitos para a recuperação do óleo residual (BANAT et al., 2000).

Na área farmacêutica, os biossurfactantes lipopetídeos podem atuar como antivirais, antibióticos e agentes antitumorais (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004). Entre eles, a surfactina, é utilizada para inibir a formação de coágulos, atividade antifúngica e antitumoral (BANAT et

al., 2000). Na área da agricultura, são empregados em formulações de herbicidas e pesticidas (ROSENBERG & RON, 1999). Podem ser utilizados também em produtos de higiene e cosméticos devido a boa compatibilidade com a pele (DESAI & BANAT, 1997).

A seleção de um biossurfactante para um processo industrial vai depender da estrutura, estabilidade e compatibilidade com as condições de utilização. A aplicação dos biossurfactantes na indústria de alimentos é de grande interesse, devido as suas propriedades físico-químicas e biológicas. A propriedade de formação e estabilização de emulsões é a característica principal desses compostos (CARRILLO et al., 2003; NITSCHKE et al., 2004), por isso são utilizados para melhorar a cremosidade e textura dos produtos lácteos (BANAT et al, 2010). Os biossurfactantes são empregados em produtos de panificação e derivados cárneos, na estabilização de sistemas aerados, nas modificações de propriedades reológicas e na melhoria da textura e consistência de produtos contendo amido e gordura. Utilizados também para solubilizar óleos aromatizantes e melhorar propriedades organolépticas em formulações de sorvetes (NITSCHKE & COSTA, 2007). O bioemulsificante produzido por *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos de saladas (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

Outras áreas de aplicação dos biossurfactantes estão apresentadas na Tabela 2, com um resumo das funções e aplicações industriais dos biossurfactantes.

Tabela 2. Principais aplicações dos biossurfactantes.

Funções	Áreas de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Dispersantes	Misturas carvão-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação de petróleo

Fonte: NITSCHKE & PASTORE, 2002; SANTOS et al., 2016.

O interesse em identificar e isolar microrganismos produtores de moléculas tensoativas que apresentem características como baixa toxicidade e alta atividade de emulsificação tem expandido atualmente. Para aplicação em alimentos o produto não tóxico é de importância

básica. A toxicidade de substâncias químicas pode ser avaliada por bioensaios de ecotoxicidade que usam organismo vivo como ferramenta de bioindicador para caracterizar o nível de toxicidade e prever a sua utilização dentro de um ecossistema específico (NALINI & PARTHASARATHI, 2014).

Além de ser um procedimento simples e barato, a aplicação dos biossurfactantes em alimentos contribui para o aproveitamento de novos surfactantes com aplicações específicas, a combinação de várias propriedades em um mesmo composto e a sua utilização como ingrediente com propriedades funcionais potencializadas (HAFENBURG et al., 2003).

2.9 Produção do biossurfactante e métodos de triagem

Uma ampla variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são utilizados na produção dos biossurfactantes que geralmente são liberados no meio de cultura na fase estacionária ou na fase exponencial (MAKKAR et al., 2011).

A produção desses compostos é induzida por hidrocarbonetos ou substratos solúveis em água, especialmente carboidratos. As vias desses compostos nos microrganismos abrangem a formação das moléculas que irão compor as porções hidrofóbicas e hidrofílicas, envolvendo mecanismos de biossíntese de ácidos graxos, carboidratos e derivados (KARANTH et al., 1999; MULLIGAN, 2005).

Para a produção biotecnológica dos biossurfactantes podem ser empregados dois tipos de fermentação, a fermentação submersa (FS) ou a fermentação em estado sólido (FES). Na FES, os microrganismos se desenvolvem na superfície de partículas sólidas úmidas, enquanto que na FS, os microrganismos são suspensos em meio líquido contendo os nutrientes dissolvidos (PANDEY, 2003). Com relação as vantagens do processo, a FES utiliza substratos de baixo custo, equipamentos mais simples e baixa demanda de energia. Por outro lado, a FS apresenta as vantagens de grande homogeneidade do meio de cultura e manutenção de parâmetros como pH e temperatura, além de que é um bioprocessamento com maior aplicação em todo o mundo. Dessa forma, as informações sobre sua engenharia de processo e controle estão mais disponíveis (PANDEY et al., 2000).

O meio de cultura utilizado pode influenciar na composição do biossurfactante mesmo usando a mesma cepa de microrganismo. É preciso que haja disposição de fontes de carbono e concentração de íons como fósforo, nitrogênio, magnésio e ferro para que os microrganismos cresçam e se multipliquem (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

Vários estudos têm investigado a produção de biossurfactantes utilizando diferentes substratos de baixo custo, como soro de leite, melão, glicerol, licor de milho, óleos vegetais e

águas residuais das fábricas de azeite (GUDINA et al., 2016; LUNA et al., 2013; RAMÍREZ et al., 2015).

As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio de fermentação são fundamentais para a produção do biossurfactante, pois a primeira, determina o tipo e as propriedades do biossurfactantes e a segunda influencia diretamente no crescimento celular (FONTES et al., 2008). Divididas em três grupos, as fontes de carbono podem ser: hidrocarbonetos, óleos vegetais e carboidratos (KIM et al., 1997). Fontes de carbono como, a frutose, glicose, glicerol, lactose, sacarose, óleo de soja, azeite e hidrocarbonetos, e fontes de nitrogênio como, o citrato de amônio, sulfato de amônio, nitrato de sódio, ureia, extrato de levedura, dentre outras já foram testadas na produção do biossurfactante (PEREIRA et al., 2013).

A glicose e a sacarose foram relatadas como as melhores fontes de carbono usando diferentes isolados de *Bacillus* (ABDEL-MAWGOUD et al., 2008; PEREIRA et al., 2013), enquanto que Joshi e colaboradores (2008) conseguiram melhores resultados com frutose para a produção dos biossurfactantes. Outro estudo relatou que o glicerol, pode ser usado como uma boa fonte de carbono de baixo custo para a produção de biossurfactantes (SOUSA, et al., 2012). A presença de fontes hidrofóbicas, por exemplo, óleo de oliva, óleo de coco e óleo de soja no meio de cultura, também são eficientes para a obtenção de biossurfactantes. Isso sugere que dependendo das fontes de carbono utilizadas, os diferentes tipos de biossurfactantes com propriedades diferentes podem ser sintetizadas (LUNA et al., 2009; SAMAD et al., 2015; SOUZA et al., 2018).

Primeiramente, os microrganismos consomem os substratos hidrofílicos para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula, e posteriormente são consumidos os substratos hidrofóbicos para produzir a porção hidrocarbônica do biossurfactante (WEBER et al., 1992).

As fontes de nitrogênio nitrato de sódio e nitrato de amônio foram destacadas na produção do biossurfactante surfactina (ABDEL-MAWGOUD et al., 2008). Já para outro autor, a produção de biossurfactantes foi melhor utilizando ureia (GHRIBI & ELLOUZE, 2011). Fontes de nitrogênio mais complexas fornecem bons resultados na produção dos biossurfactantes, no entanto, seu custo também é maior, o que torna economicamente inviável (PEREIRA et al., 2013).

Os efeitos de outros nutrientes também já foram investigados na produção do biossurfactante. A fonte de fosfato, suprida por K_2HPO_4 e NaH_2PO_4 teve efeito positivo na produção do biossurfactante, bem como também a adição de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (KIM et al., 1997).

Vários métodos de triagem são utilizados para avaliar a eficiência de microrganismos na produção de biossurfactantes. O método do espalhamento do óleo é um deles. Este método

mede a atividade superficial de uma solução de surfactante testada contra o óleo. Se o biossurfactante estiver presente, o óleo será deslocado com uma zona de limpeza livre de óleo e o diâmetro desta zona indica a atividade de espalhamento de óleo do biossurfactante (SATPUTE et al., 2010). Avaliando esta técnica na produção de um biossurfactante, Derguine-Mecheri e colaboradores (2018), mostraram que de 44 cepas testadas, 23 cepas apresentaram diâmetro de deslocamento de 0,5 cm e 21 cepas apresentaram diâmetro maior que 0,5, resultados semelhantes também foram encontrados por Youssef e colaboradores (2004). Esta análise é considerada um método sensível para o rastreamento rápido de biossurfactantes (MORIKAWA et al. 2000)

A medida da tensão superficial é de fundamental importância quando se avalia microrganismos produtores de biossurfactantes com potencial aplicação industrial. São considerados critérios para selecionar os produtores de biossurfactantes, a habilidade de reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN.m^{-1} e a capacidade de formar emulsões estáveis em pelo menos 50% do volume da emulsão após 24 h de formação (BATISTA et al., 2006). As excelentes capacidades de redução da tensão superficial foram apresentadas por alguns biossurfactantes, redução de 49 mN.m^{-1} até 29 mN.m^{-1} (SOUZA et al., 2018).

A capacidade de formar emulsões estáveis é determinada pelo índice de emulsificação, que mede a capacidade de emulsionar hidrocarbonetos (IBRAHIM, 2018). Resultados dessa análise em um estudo realizado por Derguine-Mecheri e colaboradores (2018), indicaram que 6 cepas produtoras de biossurfactantes conseguiram um percentual acima de 50% para o índice de emulsificação.

O teste hemolítico também é empregado em alguns estudos como método de triagem na produção do biossurfactante. Porém, alguns autores afirmaram que este teste exclui cepas que são boas produtoras de biossurfactantes, já que resultados falsos positivos e negativos podem ocorrer (YOUSSEF et al., 2004). Em alguns casos, cepas com atividade hemolítica positiva foram consideradas negativas em testes posteriores para a produção do biossurfactante, isso pode ser explicado pelo fato de que outros compostos além do biossurfactante podem causar hemólise, como enzimas líticas e fatores de virulência. Assim, o teste hemolítico não é um método totalmente confiável para o rastreamento de microrganismos produtores de biossurfactantes quando comparado a outros métodos como espalhamento do óleo, índice de emulsificação e tensão superficial (DERGUINE-MECHERI et al., 2018; SCHULZ et al., 1991).

A combinação desses métodos de triagem é necessária para a detecção eficiente e simultânea de potentes produtores de biossurfactantes (SATPUTE et al., 2010).

2.10 Planejamento experimental e otimização de processos

O alto custo de produção em grande escala é ainda um obstáculo para disponibilidade comercial do biossurfactante. Espera-se que o uso industrial do biossurfactante cresça bastante na próxima década, pois pesquisas já estão sendo realizadas para explorar os meios com intuito de reduzir os custos de produção dos biossurfactantes através da melhoria do rendimento e da maximização do processo (SILVA et al., 2017). Para isso, a otimização tem sido empregada para melhorar o desempenho de um sistema ou de um processo por meio da investigação de variáveis que influenciam, bem como os seus níveis (BEZERRA et al., 2008).

Os processos de otimização podem ocorrer em dois tipos. Quando há o acompanhamento de um fator por vez e observada a influência sobre uma resposta experimental é chamado de otimização univariada. Nos últimos anos tem aumentado a utilização de ferramentas estatísticas multivariadas, que baseiam-se no desenvolvimento de modelos matemáticos que permitem avaliar a significância estatística dos efeitos dos fatores e os efeitos da interação entre os mesmos, o que com a técnica univariada isso não é possível (FERREIRA et al., 2007).

A otimização de diferentes parâmetros para a produção de biossurfactante utilizando ferramentas estatísticas produzem aproximadamente 1,65 a 4 vezes maior quantidade de biossurfactante em comparação com meios não otimizados (MNIF et al., 2012; SILVA et al., 2013).

Uma das ferramentas estatísticas que é muito aplicada devido a sua alta eficiência, é a metodologia de superfícies de respostas (MSR). Esta metodologia pode ser explicada como uma combinação de técnicas de planejamento de experimentos, métodos de otimização e análise de regressão, e fundamenta-se em ajustar os modelos matemáticos empíricos aos dados experimentais de acordo uma determinada matriz experimental (ORLANDINI et al., 2014). A MSR tem como objetivo, detalhar o comportamento destes dados experimentais e fazer previsões estatisticamente válidas, sendo assim, muito utilizada para quantificar e interpretar o comportamento entre as respostas e os efeitos dos fatores (BEZERRA et al., 2008).

A modelagem da superfície de resposta é realizada por meio de planejamentos experimentais, definidos como uma matriz composta por diferentes combinações de níveis das variáveis estudadas. Os planejamentos experimentais têm como objetivo fornecer boas estimativas aos ajustes das funções, menor números de experimentos e condições de avaliação do modelo estatístico e dos seus coeficientes (BEZERRA et al., 2008).

Entre essas ferramentas estatísticas, tem-se o planejamento composto central rotacional (CCR) que combina um planejamento fatorial completo ou fracionário de dois níveis com pontos e pelo menos um ponto no centro da região experimental, selecionado para obter

propriedades como rotabilidade ou ortogonalidade, a fim de ajustar polinômios. Requer um número experimental de acordo com $N = k^2 + 2k + pc$, onde k é o número de variáveis e pc é o número de réplicas do ponto central (TARLEY et al., 2009).

O planejamento Doehlert é outra ferramenta que vem se tornando uma alternativa prática e econômica em comparação aos outros planejamentos de segunda ordem. Descreve um domínio circular para duas variáveis, esférico para três e hipersférico para mais de três variáveis, promovendo a uniformidade no espaço envolvido (HIBBERT, 2012). As suas matrizes não são rotáveis, mas possui a vantagem de necessitar de poucos ensaios experimentais para sua aplicação (NOVAES et al., 2017). O número de experimentos (N) empregados na aplicação do planejamento é dado por $N = k^2 + k + pc$, onde k é o número de variáveis e pc é o número de replicatas do ponto central. Uma característica importante deste planejamento é que cada variável pode ser estudada em diferentes números de níveis, o que faz com que alguns fatores sejam estudados em quantidades maiores ou de menores níveis (HANRAHAN & LU, 2006; HIBBERT, 2012).

A otimização simultânea de várias respostas pode ser realizada pelo uso da técnica de Repostas Múltiplas (RM), que permite que a resposta seja obtida como um resultado da combinação das respostas individuais (CAMINO et al., 2001). Quando os resultados de cada variável resposta estão localizados em regiões diferentes, há uma dificuldade de encontrar a melhor condição para todas as respostas ao mesmo tempo. Por isso a utilização da RM facilita a avaliação dos resultados, pois é possível determinar os principais fatores que interferem no processo e definir os valores ótimos (BEZERRA et al., 2008).

A aplicação desses planejamentos experimentais juntamente com a metodologia de superfície de resposta (MSR) na otimização de variáveis é amplamente utilizada devido às suas vantagens em relação à clássica otimização univariada, como a geração de informações relevantes utilizando menores números de experimentos e a avaliação dos efeitos de interação entre as variáveis e a resposta (BEZERRA et al., 2008; NOVAES et al., 2017).

2.11 Extração, purificação e caracterização dos biossurfactantes

Vários métodos analíticos são utilizados para extrair, purificar e caracterizar diferentes biossurfactantes. Esses métodos variam desde uma medida colorimétrica simples até uma análise sofisticada por espectrometria de massa (EM) (HEYD et al., 2008; HOSKOVA et al., 2013).

Os métodos para extração de biossurfactantes dependem da sua estrutura e composição química (MUTHUSAMY et al., 2008). Os métodos mais empregados são a extração com

solventes orgânicos (metanol, clorofórmio, etanol e suas associações) e precipitação (ácida, sulfato de amônio) (CHEN et al., 2012; LIMA et al., 2017; LUNA et al., 2013).

A precipitação é o método muito citado na literatura, por apresentar fácil recuperação dos compostos. A precipitação ácida com ácido clorídrico consiste em acidificar o biossurfactante bruto para um valor de pH 2-3, já a precipitação por sulfato de amônio, há a necessidade de diálise da amostra para remover o sal no processo final (ANTUNES et al., 2013). Esses dois métodos já foram utilizados na recuperação de Ramnolípídeo obtido por *Pseudomonas sp.* (DEZIEL et al., 1999; VARJANI & UPASANI, 2016). Geralmente a precipitação por sulfato de amônio é utilizada para a precipitação de biossurfactantes de alto peso molecular (BANAT et al., 2010).

A extração por solventes orgânicos favorece o alto rendimento dos biossurfactantes, porém é um processo lento e caro (ANDRADE et al., 2015). Etanol e acetona são os solventes orgânicos comumente utilizados para extrair biossurfactantes, podendo ser reutilizados (SILVA et al., 2014). Outros solventes como acetato de etila, clorofórmio e metanol são empregados em processos de extração dos biossurfactantes (BANAT et al., 2010; SATPUTE et al., 2010; VARJANI & UPASANI, 2016). Os autores Cooper e Goldenberg (1987) ao utilizarem o método de extração com clorofórmio no caldo de cultura de *Bacillus cereus* foi obtido um polímero contendo D-glicosamina com boa atividade emulsificante.

A combinação dos métodos acima também é aplicada para aumentar a eficiência do processo de extração. Após a precipitação ácida, para a extração de soforolípídeos e trealolípídeos foi preferível utilizar o n-hexano e a mistura de clorofórmio e metanol, respectivamente (BANAT et al., 2010). Os lipopeptídeos são geralmente precipitados por ácido e extraídos utilizando metanol.

Além dos métodos acima, algumas técnicas aprimoradas tais como permuta iônica e adsorção-dessorção também podem ser utilizadas para purificação de biossurfactantes (SATPUTE et al., 2010).

Os principais métodos para caracterizar biossurfactantes envolvem, a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), cromatografia gasosa- espectrometria de massa (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida-espectrometria de massa (CL-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) (VARJANI & UPASANI, 2017).

Ao caracterizarem o biossurfactante, Moussa e colaboradores (2014) utilizaram a precipitação ácida, seguida da extração com acetato de etila e aplicaram as técnicas FTIR, RMN e EM para caracterização, concluindo que o composto é um Ramnolípídeo. Esse mesmo

composto foi avaliado por Varjani e Upasani (2016), que utilizaram o FTIR, CCD, EM e CL-EM e técnicas de RMN para caracterizar o biossurfactante produzido.

Por meio da espectrometria de massas com Ionização por Eletrospray (*electrospray ionization* –ESI) (+), ESI (-), bombardeamento com átomos rápidos (*fast atom bombardment*-FAB) (+) e pela RMN, Bodour e colaboradores (2004) identificaram um novo biossurfactante produzido por *Flavobacterium sp.* e verificaram que este composto é uma mistura de flavolípídeo com peso molecular de 584 a 686.

Todas essas técnicas utilizadas na caracterização química e estrutural de moléculas, contribuem na identificação e diferenciação de compostos ou classe de compostos já descritos na literatura que tenha atividade idêntica ou similar àquela observada na amostra de interesse (NIESSEN, 2003).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWABA, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.150, n.3, p.305–325, 2008.

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, D, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, n.5, p.1323-36, 2010.

AKHTER, M. S. Effect of acetamide on the critical micelle concentration of aqueous solutions of some surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 121, p.103–109, 1997.

ALMATAWAH, Q. A. An Indigenous Biosurfactant Producing *Burkholderia cepacia* with High Emulsification Potential towards Crude Oil. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v.7, n.6, 2017.

ALMEIDA, D.G.; DA SILVA, R.C.F.F.; LUNA, J.M.; RUFINO, D.R.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.157, p.1–13, 2017.

AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.S.; MARRUCH, I.M.; COUTINHO, J.A.P. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. In: Ramkrishna, S., Li (Eds.), Biosurfactants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p.236–249, 2010.

ANDRADE, R.F.S.; ANTUNES, A.A.; LIMA, R.A.; ARAÚJO, H.W.C.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; FRANCO, L.O.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Enhanced Production of a Glycolipid Biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP/WFCC1556 for Application in Dispersion and Removal of Petroderivatives. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.4, n.7, p.563-576, 2015.

ANTUNES, A.A.; ARAÚJO, H.W.C.; ALVES DA SILVA, C.A.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 using corn steep liquor and corn post-frying oil as nutrients. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.3, p.334-341, 2013.

ARCHER, D.B.; CONNERTON, I.F.; MACKENZIE, D.A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.111, p.99-147, 2008.

ASHITHA, A.; RADHAKRISHNAN, E.K.; JYOTHIS, M. Characterization of biosurfactant produced by the endophyte *Burkholderia sp.* WYAT7 and evaluation of its antibacterial and antibiofilm potentials. **Journal of Biotechnology**, 2020.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Surfactant systems: Their chemistry, pharmacy and biology**. London: Chapman & Hall, 1983.

AZARMI, R. Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.31, p.5850-5855, 2011.

BALAN, S.S.; KUMAR, C.G.; JAVALAKSHMI, S. Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: Purification, characterization and its biological evaluation. **Microbiological Research**, v.194, p.1–9, 2017.

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

BANAT, I.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; Marchant, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, n.2, p.427–444, 2010.

BANAT, I.M.; SATPUTE, S.K.; CAMEOTRA, S.S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N.V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v.5, 697, 2014.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, v.26, n.5-6, p.413-416, 2001.

BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v.97, n.6, p.868–875, 2006.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.85, n.1, p.1-8, 2004.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, n.4, p.249-260, 2004.

BENITO, I.; GARCÍA, M.A.; MONGE, C.; SAZ, J. M.; MARINA, M. L. Spectrophotometer and conductimetric determination of the critical micellar concentration of sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide micellar systems modified by alcohols and salts. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 125, n.2-3, p. 221 – 224, 1997.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v.76, n.5, p. 965-977, 2008.

BHANGE, K.; CHATURVEDI, V.; BHATT, R. Simultaneous production of detergentstable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. **Biotechnology Reports**, v.10, p.94–104, 2016.

BHARALI, P.; DAS, S.; KONWAR, B.K.; THAKUR, A.J. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: feasibility in petro-spill bioremediation. **International Biodeterioration Biodegradation**, v.65, n.5, p.682–690, 2011.

BISSETT, J.; GAMS, W.; JAKLITSCH, W.; SAMUELS, G.J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **International Mycological Association**, v.6, n.2, p.263-295, 2015.

- BODOUR, A. A.; GUERRERO-BARAJAS, C.; JORLE, B. V.; MALCOMSON, M. E.; PAULL, A. K.; SOMOGYI, A.; TRINH, L. N.; BATES, R. B.; MAIER, R. M. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium sp.* strain MTN11. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.1, p.114-120, 2004.
- BOGAERT, I.N.A.V.; BUYST, D.; MARTINS, J.C.; ROELANTS, S.L.K.W.; SOETAERT, W.K. Synthesis of bolaform biosurfactants by an engineered *Starmerella bombicola* yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v.113, n.12, p.2644-2651, 2016.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.152, n.1-2, p.41-52, 1999.
- BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, n.1, p.1-8, 2011.
- BRAKHAGE, A.A.; BRUNS, S.; THYWISEN, A.; ZIPFEL, P.F.; AND BEHNSEN, J. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, n.4, p.409–415, 2010.
- BRUMANO, L.P.; ANTUNES, F.A.F.; SOUTO, S.G.; SANTOS, J.C.; VENUS, J.; SCHNEIDER, R.; SILVA, S.S. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. **Bioresource Technology**, v.243, p.264–272, 2017.
- BUBICI, G.; KAUSHAL, M.; PRIGIGALLO, M.I.; CABANÁS, C.G.L.; MERCADO-BLANCO, J. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. **Frontiers in Microbiology** v. 10, p. 616, 2019.
- CAMARGO-DE-MORAIS, M.M.; RAMOS, S.A.F.; PIMENTEL, M.C.B.; MORAIS JR, M.A.; LIMA FILHO, J.L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.2, p.191- 194, 2003.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, n.5, p.520-529, 1998.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, n.3, p.262-266, 2004.
- CAMINO, M.; BAGUR, M.G.; SÁNCHEZ-VIÑAS, M.; GÁZQUEZ, D.; ROMERO, R. Multivariate optimization of solvent extraction of Cd(II), Co(II), Cr(VI), Cu(II), Ni(II), Pb(II), and Zn(II) as dibenzylthiocarbamates and detection by AAS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 16 p. 638 – 642, 2001.
- CARRILLO, C.; TERUEL, J. A.; ARANDA, F. J.; ORTIZ, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes**, v.1611, n.1-2, p.91-97, 2003.
- CARNEIRO, W. M. A.; COELHO, M. C. S. G. Vitivinicultura nordestina: características e perspectivas. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, p. 135, 2007.

- CASTIGLIONI, G.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v.32, n.2, p.292-295, 2009.
- CERQUEIRA, V.S.; COSTA, J.A.V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química Nova**, v.32, n.2, p.395-400, 2009.
- CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, n. 2, p. 569-574, 1995.
- CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CHOI, M.M.F.; MASAKORALA, K.; CHAN, Y. An efficient biosurfactant- producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. **Biochemical Engineering Journal**, v.74, p.46–53, 2013.
- CHEN, S.Y.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n.1, p. 67-74, 2007.
- CHEN, J.; HUANG, P.T.; ZHANG, K.Y.; DING, F.R. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter sp.* from petroleum-contaminated soil. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, n.4, p.660-671, 2012.
- CHEN, W.C.; JUANG, R.S.; WEIC, Y.H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v.103, p.158–169, 2015.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.915–929, 2002.
- COLLA, L.M.; HEMKEMEIER, M.; GIL, A.S.L. Biossorção de cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. **Revista CIATEC – UPF**, v.4, n.1, p.1-10, 2012.
- COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.S.; DUFF, J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. **Applied Environmental Microbiology**, v.42, n.3, p.408–412, 1981.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.2, p.224-229, 1987.
- DALL'ASTA, C.; LINDNER, J.D.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; NEVIANI, E.; MARCHELLI, R. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. **Food Chemistry**, v. 106, n.2, p. 729-734, 2008.
- DAOSHAN, L.; SHOULIANG, L.; YI, L.; DEMIN, W. The effect of biosurfactant on the interfacial tension and adsorption loss of surfactant in ASP flooding. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 244, N.1-3, p.53–60, 2004.

DARYAEI, A.; JONES, E.E.; GHAZALIBIGLAR, H. GLARE, T.R.; FALLON, R.E. Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. **Journal of Applied Microbiology**, v.120, n.4, p.999-1009, 2016.

DEEPIKA, K.; KALAM, S.; SRIDHAR, P.R.; PODILE, A.R.; BRAMHACHARI, P. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.5, p.38–47, 2016.

DE OLIVEIRA, M.R.; MAGRI, A.; BALDO, C.; CAMILIOS-NETO, D.; MINUCELLI, T.; COLABONE CELLIGOI, M.A.P. Review: Sophorolipids a Promising Biosurfactant and it's Applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v.6, n.2, p.161–174, 2015.

DERGUINE-MECHERI, L.; KEBBOUCHE-GANA, S.; KHEMILI-TALBI, S.; DJENANE, D. Screening and biosurfactant/bioemulsifier production from a high-salt-tolerant halophilic *Cryptococcus* strain YLF isolated from crude oil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.162, p.712–724, 2018.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, n.1, p.47-64, 1997.

DEZIEL, E.; LEPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D.; MAMER, O.A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1440, n.2-3, p.244-252, 1999.

ELSHIKH, M.; FUNSTON, S.; CHEBBI, A.; AHMED, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New Biotechnology**, v.36, p.26–36, 2017.

FEI, Q.; CHANG, H.N.; SHANG, L.; CHOI, J.; KIM, N.; KANG, J. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.102, n.3, p. 2695-2701, 2011.

FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Fungos endofíticos: potencial como controladores biológicos e estudos em videiras. **Revista Uningá Review**, v. 14, n. 1, p. 2, 2013.

FERREIRA, S.L.C.; SANTOS, W.N.L.; QUINTELLA, C.M.; NETO, B.B.; BOSQUESENDRA, M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry- review. **Talanta**, v.63, n.4, p.1061–1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v.597, n.2, p.179-186, 2007.

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

- GEOFFRY, K.; ACHUR, R.N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.14, p.241-253, 2018.
- GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. **Biotechnology Research International**, v.2011, p.6, 2011.
- GRAND VIEW RESEARCH, Biosurfactants market by product (rhamnolipids, sophorolipids, MES, APG, sorbitan esters, sucrose esters) expected to reach USD 2308.8 Million by 2020. <http://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/biosurfactants-industry>, 2015 (accessed 25.07.2014).
- GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D.C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n.4, p. 375-384, 2005.
- GUDINA, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. **Marine Drugs**, v.14, n.2, 2016.
- GUIMARÃES, I.C.O.; PEREIRA, J.; CORNÉLIO, V.M.O.; BATISTA, L.R.; EVANGELISTA, R.M.; FERREIRA, E.B. Comparação de metodologias para detecção de fungos em arroz irradiado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p.194-200, 2010.
- HAFENBURG, D.; HOMMEL, R.; KLEBER, H. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advanced Biochemistry Engenier, Bioproducts**, v. 33, p.53-93, 2003.
- HANRAHAN, G.; LU, K. Application of Factorial and Response Surface Methodology in Modern Experimental Design and Optimization. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.36, n.3-4, p. 141-151, 2006.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Natural Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.
- HARTLEY S.E.; GANGE A.C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. **Annual Review of Entomology**, v.54, p.323-342, 2009.
- HARMAN, G. E. Myths and Dogmas of Biocontrol. **Plant Disease**, v.84, n.4, p.377-393, 2002.
- HE, A.; LIU, J.; WANG, X.; ZHANG, Q.; SONG, W.; CHEN, J. Soil application of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 granules promotes growth and resistance to *Fusarium graminearum* in maize. **Journal of Integrative Agriculture**, v.18, n.3, p.599-606, 2019.
- HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes, **Microbiology**, v.158, p.17-25, 2012.
- HEYD, M.; KOHNERT, A.; TAN, T.H.; NUSSER, M.; KIRSCHHOFER, F.; BRENNER-WEISS, G.; FRANZREB, M.; BERENSMEIE, S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.391, p.1579-1590, 2008.
- HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: a tutorial review. **Journal of Chromatography B**, v.910, p.2-13, 2012.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.6, n.2, p. 148-159, 2001.

HOSKOVA, M., SCHREIBEROVA, O., JEZDIK, R., CHUDOBA, J., MASAK, J., SIGLER, K., REZANKA, T. Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. **Bioresource Technology**, v.130, p.510–516, 2013.

IBRAHIM, H.M.M. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. **Egyptian Journal of Petroleum**, v.27, n.1, p.21–29, 2018.

IWASHITA, K. Recent Studies of Protein Secretion by Filamentous Fungi. **Journal Bioscience Bioengineering**, v.94, n.6, p.530-535, 2002.

JASIM, B. ; JOHN JIMTHA, C.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E.K. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. **Plant Growth Regulation**, v.71, p.1–11, 2013.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI A.J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**, v.99, n.11, p.4603–4608, 2008.

KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G.; VEENANADIG, N.K. Microbial production of biosurfactant and their importance. **Current Science**, v.77, n1, p.116-126, 1999.

KARLSHØJ, K.; LARSEN, T.O. Differentiation of species from *Penicillium roqueforti* group by volatile metabolite profiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.3, p.708-715, 2005.

KAYA, T.; ASLIM, B.; KARIPTAS, E. Production of biosurfactant by *Pseudomonas spp.* isolated from industrial waste in Turkey. **Turkish Journal of Biology**, v.38, n.3, p.307–317, 2014.

KIM, S.H.; YONN, B.D.; LEE, C.H.; SUH, H.H.; OH, H.M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.84, n.1, p.41-46, 1997.

KIRAN, G. S.; HEMA, T. A.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN, J.; THOMAS, T. A. 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.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v.19, n.7, p. 792-798, 2012.

ŁAWNICZAK, Ł.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, n.6, p.2327–2339, 2013.

LEA, A.; SABINE, G.; ALEXANDER, L.; THERESA, R.; LEONI, A.; MARTIN, M.N.T.; NANCY, S.P.; KREIL, D.P.; SUSANNE, Z. The Gpr1-regulated Sur7 family protein Sfp2 is

required for hyphal growth and cell wall stability in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. **Scientific Reports**, v.8, n.1, p.12064, 2018.

LEATHERS, T.D.; PRICE, N.P.J.; BISCHOFF, K.M.; MANITCHOTPISIT, P.; SKORY, C.D. Production of novel types of antibacterial liamocins by diverse strains of *Aureobasidium pullulans* grown on different culture media. **Biotechnology Letters**, v.37, n.10, p.2075–2081, 2015.

LEE, J.; HUH, N.; HONG, J.H.; KIM, B.S.; KIM, G.H.; KIM, J.J. The antagonistic properties of *Trichoderma spp.* inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. **Holzforschung**, v.66, n.7, p.883–887, 2012.

LIMA, A. L. **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma spp* isolados de solo do cerrado brasileiro**. 73p. (Tese de Doutorado). Departamento de Fitopatologia. Imprensa Universitária. Brasília – DF. UnB. ICB, 2002.

LIMA, R.A.; RODRIGUEZ, D.M.; ANDRADE, R.F.S.; TAKAI, G.C. Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. **African Journal of Microbiology Research**, v.11, n.6, p.237-244, 2017.

LIU, J.; YUAN, X.; ZENG, G.; SHI, J.; CHEN, S. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v.41, n.11, p.2347- 2351, 2006.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; ZHOU, J. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria sp.* YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78, n.2, p.241-247, 2008.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELÁGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia horticultrae (Amsterdam)**, v.196, p. 109–123, 2015.

LOTFABADA, T.B.; SHOURIANC, M.; ROOSTAAZAD, R.; NAJAFABADI, A.R.; ADELZADEH, M.R.; NOGHABI, K.A. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.69, n.2, p.183-193, 2009.

LUNA-VELASCO, M. A.; ESPARZA-GARCIA, F.; CANIZARES-VILLANUEVA, O.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium sp.* **Process Biochemistry**, v.42, n.3, p.310–314, 2007.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**, v.6, n.2, p.209-215, 2008.

LUNA, J.M.; SARUBBO, G.M.; CAMPOS-TAKAI, G.M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.4, p.785–793, 2009.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBOA, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from

- industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.102, p.202–209, 2013.
- MAHESHWARI, N.; KUMAR, M.; THAKUR, I.S.; SRIVASTAVA, S. Recycling of carbon dioxide by free air CO₂ enriched (FACE) *Bacillus sp.* SS105 for enhanced production and optimization of biosurfactant. **Bioresource Technology** v.242, p.2–6, 2017.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, n.4, p.428-434, 2002.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v.1, p.1–19, 2011.
- MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends Biotechnology**, v.30, n.11, p.558-565, 2012.
- MARTINS, V G.; KALIL, S.J.; COSTA, J.A.V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1942-1947, 2008.
- MARIN, C.P.; KASCHUK, J.J.; FROLLINI, E.; NITSCHKE, M. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. **Industrial Crops and Products**, v.66, p.239–245, 2015.
- MBARGA, J.B.; BEGOUDE, B.A.; AMBANG, Z.; MEBOMA, M.; KUATE, J.; SCHIFFERS, B.; EWBANK, W.; HOOPEN, G.M.T. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. **Biological Control**, v.77, p.15-22, 2014.
- MELO, A.R.; ALVES, K.F.; ALVES, S.N.; ALVES, L.A.R.S. Suscetibilidade de *Culex quinquefasciatus* após exposição a ácidos graxos e ésteres metílicos. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 90-90, 2015.
- MENESES, D.P.; GUDIÑA, E.J.; FERNANDES, F.; GONÇALVES, L.R.B.; RODRIGUES, L.R.; RODRIGUES, S. 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.
- MENOZZI, C. A.; CASTELO-BRANCO, F. S.; FRANÇA, R. R. F.; DOMINGOS, J. L. O.; BOECHAT, N. Otimização da Síntese do Fluconazol: um Importante Fármaco Antifúngico da Classe dos Azóis. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 3, p. 1216 - 1234, 2017.
- MISHARA, M.; MUTHUPRASANNA, P.; PRABHA, K. S.; RANI, P. S.; BABU, I. A. S.; CHADIRAN, S.; ARUNACHALAM, G.; SHALINI, S. Basics and potential applications of surfactants - A review. **International Journal of Pharmtech Research**, v.1, n.4, p.1354-1365, 2009.
- MNIF, I.; CHAABOUNI-ELLOUZE, S.; GHRIBI, D. Optimization of the nutritional parameters for enhanced production of *B. subtilis* SPB1 biosurfactant in submerged culture using response surface methodology. **Biotechnology Research International**, v.2012, p.8, 2012.

MONTEIRO, A.S.; BONFIM, M.R.Q.; DOMINGUES, V.S.; CORRÊA JR., A.; SIQUEIRA, E.P.; ZANI, C.L.; SANTOS, V.L. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource Technology**, v.101, p.5186–5193, 2010.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T.A. Study on the structure–function relationship of lipopeptides biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, p.211–218, 2000.

MOUAFI, F.E.; ELSOUDA, M.M.A.; MOHARAMB, M.E. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnology Reports**, v.9, p.31–37, 2016.

MOUSSA, T.A.A.; MOHAMED, M.S.; SAMAK, N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.31, n.4, p.867–880, 2014.

MUELLER G.M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v.16, n.1, p.1–5, 2007.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v.60, n.1-4, p.371–380, 2001.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, n.2, p.183-198, 2005.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; KOCHUPAPPY RAVI, T.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v.94, n.6, p.736-746, 2008.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v.173, p.231–238, 2014.

NIESSEN, W.M.A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**, v.1000, n.1-2, p.413-436, 2003.

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

NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; COSTA, G. A.; GILIOLI, R.; MEURER, E. C.; GATTI, M. S.; EBERLIN, M. N.; HÖEHS, N. F.; PASTORE, G. M. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Science and Biotechnology**, v.13, n.5, p.591-596, 2004.

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

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de Métodos Analíticos

Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.3, p.32, 2017.

OLIVEIRA, J. G. **Produção de biosurfactante por *Bacillus pumilus* e avaliação da biorremediação de solo e água contaminados com óleo**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

OLIVEIRA, J.G.; GARCIA-CRUZ, C.H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, p.155–160, 2013.

ORLANDINI, S.; GOTTI, R.; FURLANETTO, S. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.87, p.290-307, 2014.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; SINGH, S.C. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, n.1, p.633–654, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, n.10, p.1153–1169, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2-3, p.81–84, 2003.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n.3, p.287-294, 2002.

PATEL, J.; TELI, B.; BAJPAL, R.; MEHER, J.; RASHID, M.M.; MUKHERJEE, A.; YADAV, S.K. 13 - *Trichoderma*-mediated biocontrol and growth promotion in plants: an endophytic approach. **Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology**, p. 219-239, 2019.

PATIL, R.H.; PATIL, M.P.; MAHESHWARI, V.L. Chapter 5 - Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic Fungi: A Review of Biotechnological Production and Their Potential Applications. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.49, p.189-205, 2016.

PAUL, P.E.V.; SANGEETHA, V.; DEEPIKA, R.G. Chapter 9 - Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. **Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, p.107-125, 2019.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v.111, p.259–268. 2013.

PÊSSOA, M.G.; VESPERMANN, K.A.C.; PAULINO, B.N.; BARCELOS, M.C.S.; PASTORE, G.M.; MOLINA, G. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.37, p.319-339, 2019.

- PHILIPPOUSSIS, A.N. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues. In: **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**, Nigam, P.S. and A. Pandey (Eds.). Springer, New York, ISBN: 9781402099410, pp: 163-196, 2009.
- PINTO, M.H.; MARTINS, R.G.; COSTA, J.A.V. Bacteria biosurfactants production kinetic evaluation. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104–2108, 2009.
- PUNT, P. J.; BIEZEN, N.V.; CONESA, A.; ALWIN, A.; MANGNUS, J.; HONDEL, C.V.D. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends in Biotechnology**, v.20, n.5, p.200-206, 2002.
- QIAO, M.; DU, X.; ZHANG, Z.; XU, J.P.; YU, Z.F. Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. **MycologyKeys**, v.44, p.63-80, 2018.
- RAHMAN, P.K.S.M.; GAKPE, E. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants- Review. **Biotechnology**, v.7, n.2, p.360-370, 2008.
- RAMÍREZ, M.; VELÁZQUEZ, R.; MAQUEDA, M.; LÓPEZ-PIÑEIRO, A.; RIBAS, J.C. A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxinencoding double-stranded RNA virus. **Frontiers Microbiology**, v.6, n.983, 2015.
- REIS, M.F.T.; BONOMO, R.C.F.; SOUZA, A.O.; SILVA, L.H.M.; VELOSO, C.M.; MINIM, L.A.; FONTAN, R.C.I. Calorimetric studies of microemulsion systems with lecithin, isooctane and butanol. **Food Research International**, v.49, p.672–676, 2012.
- RODRIGUES L.R.; BANAT I.M.; TEIXEIRA J.A.; OLIVEIRA R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, n.4, p.609–618, 2006.
- RODRIGUEZ, P.; GONZALEZ, D.; GIORDANO, S.R. Endophytic microorganisms: a source of potentially useful biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.133, p.569-581, 2016.
- ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and low molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, n.2, p.154–162, 1999.
- SAMAD, A.; ZHANG, J.; CHEN, D.; LIANG, Y. Sophorolipid production from biomass hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.175, n.4, p.2246–2257, 2015.
- SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v.100, n.8, p.923–935, 1996.
- SAMUELS, G.J.; SUAREZ, C.; SOLIS, K.; HOLMES, K.A.; THOMAS, S.E.; ISMAIEL, A.; EVANS, H.C. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. **Mycological Research**, v.110, p.381–392, 2006.
- SANKARAN, S.; KHANAL, S.K.; JASTI, N.; JIN, B.; POMETTO, A.L.; LEEUWEN, J.V. Use of filamentous fungi for wastewater treatment and production of high value fungal byproducts: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.40, n.5, p.400–449, 2010.

SANTOS, F.K.G.; ALVES, J.V.A.; DANTAS, T.N.C.; DANTAS NETO, A.A.; DUTRA JR, T.V.; BARROS NETO, E.L. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. **4º PDPETRO**, Campinas, SP, 2.1.72-2, 2007.

SANTOS, D.K.F.; BRANDÃO, Y.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, n.3, p.48–57, 2014.

SANTOS, A.S.; PEREIRA, N.J.; FREIRE, D.M. Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **PeerJ**, v.4, p.1–16, 2016.

SANTOS, P.N. **Produção simultânea de biosurfactante e lipídeos por *Penicillium spinulosum* (ucp1347) utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado). Universidade Católica de Pernambuco, 2016.

SARTORI, L. R.; LOPES, N. P.; GUARATINI, T. A química no cuidado da pele. Coleção química do cotidiano. **Sociedade Brasileira de Química**, Editora Edit-SBQ, v. 5, n.1, p.92, São Paulo, 2010.

SATPUTE, S.K.; BANPURKAR, A.G.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANAT, I.M.; CHOPADE, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.30, n.2, p.127–144, 2010.

SEGARRA, G.; CASANOVA, E.; AVILES, M.; TRILLAS, I. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. **Microbial Ecology**, v.59, p.141-149, 2010.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v.3, n.2, p.123–133, 2008.

SCHULZ, D.; PASSERI, A.; SCHMIDT, M.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V.; GUNKEL, W. Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude-oil degrading marine microorganisms from the North-Sea. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.46, n.3-4, p.197–203, 1991.

SHARMA, R.; SINGH, J.; VERMA, N. Optimization of rhamnolipid production from *Pseudomonas aeruginosa* PBS towards application for microbial enhanced oil recovery. **3 Biotech**, v.8, n.1, 2018.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnology**, v.22, n.3, p.142-6, 2004.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. **Application aspects. Biotechnology Advances**, v.25, n.1, p.99–121, 2007.

SILVA, R.C.F.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; FARIAS, C.B.B.; FILHO, H.J.B.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Enhancement of biosurfactant production from *Pseudomonas cepacia* CCT6659 through optimisation of nutritional parameters using response surface methodology. **Tenside Surfactants Detergents**, v.50, n.2, p.137–142, 2013.

SILVA, N.R.A.; LUNA, M.A.; SANTIAGO, A.L.; FRANCO, L.O.; SILVA, G.K.; DE SOUZA, P.M.; OKADA, K.; ALBUQUERQUE, C.D.; DA SILVA, C.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.9, p. 15377-15395, 2014.

SILVA, J.D.F.; SILVA, Y.P.; PIATNICKI, C.M.S.; BOCKEL, W.J.; MENDONÇA, C.R.B. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, v.38, n.9, 2015.

SILVA, R.S.F.S.; ALMEIDA, D.G.; MEIRA, H.M.; SILVA, E.J.; FARIAS, C.B.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.12, p.206–215, 2017.

SILVA, A.C.S.; SANTOS, P.N.; SILVA, T.A.L.; ANDRADE, R.F.S.; TAKAKI, G.M.C. Review Article Agricultural Microbiology. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.85, 2018.

SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.410, p.273-286, 2005.

SOUSA, M.; MELO, V.M.M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H.B.; GONÇALVES, L.R.B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.35, n.6, p.897–906, 2012.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 185- 195, 2004.

SOUZA, E.C.; VESSONI-PENNA, T.C., OLIVEIRA, R.P.D.S. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.89, p.88–94, 2014.

SOUZA, K.S.T.; GUDIÑA, E.J.; SCHWAN, R.F.; RODRIGUES, L.R.; DIAS, D.R.; TEIXEIRA, J.A. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v.346, p.152–158, 2018.

SUN, R.; GAO, Y.X.; SHEN, K.Z.; XU, Y.B.; WANG, C.R.; LIU, H.Y.; DONG, J.Y. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. **Phytochemistry Letters**, v.4, n.2, p.101-105, 2011.

TARAN, M.; MOHAMADIAN, E.; ASADI, S.; BAKHTIYARI, S. Surface active agent production from olive oil in high salt conditions and its process optimization. **Polish Journal of Chemical Technology**, v.14, n.4, p.30–34, 2012.

TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; SANTOS, W. N. L.; MATOS, G. D.; SILVA, E. G. P.; BEZERRA, M. A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S. L. C. Chemometric tools in electroanalytical

chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v.92, n.1, p.58-67, 2009.

TEJESVI, M.V.; NALINI, M.S.; MAHESH, B.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SHETTY, H. S.; SUBBIAH, V. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Boletín de la Sociedad Química de México**, Querétaro, v.1, n.1, p.19-26, 2007.

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

VARJANI, S.J.; RANA, D.P.; BATEJA, S.; SHARMA, M.C.; UPASANI, V.N. Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v.3, n.2, p.9205–9213, 2014.

VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: production, characterization and surface active properties of biosurfactant. **Bioresource Technology**, v.221, p.510–516, 2016.

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

VECINO, X.; BARBOSA-PEREIRA, L.; DEVESA-REY, R.; CRUZ, J.M.; MOLDES, A.B. Study of the surfactant properties of aqueous stream from the corn milling industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, n.24, p.5451-5457, 2014.

VECINO, X.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, L.; GUDIÑA, E.J.; CRUZ, J.M.; MOLDES, A.B.; RODRIGUES, L.R. Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.55, p.40–49, 2017.

WEBER, L.; DOGE, C.; HAUFE, G. Oxygenation of Hexadecane in the Biosynthesis of Cyclic Glycolipids in *Torulopsis Apicola*. **Biocatalysis**, v.5, n.4, p.267-272, 1992.

WOO, S.L.; SCALA, F.; RUOCCO, LORITO, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma spp.*, phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, v.96, p.181–185, 2006.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, n.3, p.339–347, 2004.

YSAMBERTT, F.; VEJAR, F.; PAREDE, J.; SALAGER, J. L. The absorbance deviation method: a spectrophotometric estimation of the critical micelle concentration (CMC) of ethoxylated alkylphenol surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 137, n.1-3, p.189-196, 1998.

ZHANG, Z.Y.; JIN, B.; BAI, Z.H.; WANG, X.Y. Production of fungal biomass protein using microfungi from winery wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v.99, p.3871–3876, 2008.

ZHU, X.; VENOSA, A.D.; SUIDAN, M.T. Literature review on the use of commercial bioremediation agents for cleanup of oil-contaminated estuarine environments. **United States Environmental Protection Agency**. EPA, 600, R-04, 075, p.1-5, 2004.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Obtenção de biossurfactante com potencial aplicação como aditivos na indústria de alimentos a partir de fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinífera* L.).

4.2 Objetivos Específicos

- a) Selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes a partir da coleção de fungos endofíticos isolados de videira com potencial para aplicação nas indústrias alimentícias;
- b) Produzir biossurfactante por fermentação submersa;
- c) Identificar por meio morfológico e molecular o isolado fúngico que apresentar maior eficiência na produção do biossurfactante;
- d) Avaliar o índice emulsificante, o espalhamento do óleo e a tensão superficial dos biossurfactantes;
- e) Estudar as fontes de carbono e nitrogênio empregadas na produção do biossurfactante;
- f) Otimizar as condições de produção do biossurfactante;
- g) Determinar a concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante por meio das técnicas, Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) e Tensão Superficial;
- h) Elucidar as estruturas das moléculas dos biossurfactantes aplicando diversos espectrométricos (RMN, CL, FTIR, CG-EM);
- i) Realizar teste inicial da aplicação do biossurfactante em uma matriz alimentícia;
- j) Avaliar a toxicidade do biossurfactante visando observar segurança da sua utilização em alimentos;

CAPÍTULOS

Para fins de organização e práticas didáticas, esta tese foi estruturada em 2 (dois) capítulos, conforme segue descrito. Cada capítulo representa um artigo que estão escritos de acordo com as normas dos respectivos periódicos a serem submetidos.

- O Capítulo 1 apresenta o artigo sobre o biossurfactante produzido pelo fungo filamentoso endofítico *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 isolados de videiras (*Vitis vinífera* L.): seleção e caracterização preliminar, destacando a seleção dos microrganismos produtores dos biossurfactantes e as etapas na obtenção desses compostos.
- O Capítulo 2 apresenta o artigo que relata o uso de ferramentas de otimização no aumento da produção do biossurfactante produzido pelo fungo filamentoso endofítico *Trichoderma asperellum* CBS 433.97. Também é abordado a elucidação da estrutura do biossurfactante, bem como sua aplicação em alimentos e sua toxicidade.

CAPÍTULO I

Artigo 1

Revista: Journal of Surfactants and Detergents

INSS - 1558-9293

**Biossurfactante produzido pelo fungo endofítico *Trichoderma asperellum* CBS 433.97
isolado de videiras (*Vitis vinífera* L.): seleção e caracterização preliminar**

Qualis Capes: A3 (área - Ciência de alimentos)

Fator de impacto: 1,672

**Biossurfactante produzido pelo fungo endofítico *Trichoderma asperellum* CBS 433.97
isolado de videiras (*Vitis vinífera* L.): seleção e caracterização preliminar**

**Biosurfactant produced by the endophytic fungus *Trichoderma asperellum* CBS 433.97
isolated from vines (*Vitis vinífera* L.): selection and preliminary characterization**

Mariana Ferreira Alves^a, Luciana Amaral de Faria Silva^a, Daniel Florêncio Filho^a, Leandro Soares Santos^b, Renata Cristina Ferreira Bonomo^b, Silmara Almeida de Carvalho^{c*}

^aLaboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia, Centro de Pesquisa em Química, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Brasil.

^bDepartamento de Tecnologia Rural e Animal, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Brasil.

^cDepartamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Brasil.

*Autor correspondente

Silmara Almeida de Carvalho

Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, BR 415, CEP: 45700-000, Itapetinga, Brasil.

Tel.: +55 77 3261-8687

E-mail address: scarvalho@uesb.edu.br

Resumo:

Foi realizado um screening de fungos filamentosos endofíticos isolados de videira a fim de selecionar novos isolados produtores de biossurfactantes. Dos 49 isolados fúngicos avaliados previamente quanto à formação de emulsão na seleção primária, 26 isolados foram pré-selecionados. Na etapa secundária, o isolado fúngico 50 (I50) foi selecionado por apresentar melhores características na produção do biossurfactante através das análises de tensão superficial, índice de emulsificação e estabilidade. Através de dados morfológicos e moleculares o fungo foi identificado como sendo da espécie *Trichoderma asperellum* CBS 433.97. Das cinco fontes de carbono e nitrogênio testadas através do delineamento composto central rotacional (DCCR), o óleo vegetal de milho e a ureia foram as melhores fontes de carbono e nitrogênio, sendo que concentrações maiores de fonte de nitrogênio e menores de fonte de carbono se destacaram na produção do biossurfactante, respectivamente em 3 dias de fermentação. O biossurfactante apresentou poder ativo na ação antibacteriana contra alguns microrganismos contaminantes. Após a análise da concentração micelar crítica (CMC) pela determinação da titulação microcalorimétrica isotérmica (ITC) obtivemos a CMC de 1488

mg.L⁻¹ do biossurfactante caracterizado, pelo FTIR, como sendo uma mistura de ésteres graxos. Esses resultados demonstram que o fungo isolado de videira *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 tem potencial para a produção eficiente de biossurfactante.

Palavras-chave: biossurfactante; éster; fungo endofítico; metabólito secundário; *Trichoderma asperellum* CBS 433.97

Abstract

A screening of endophytic filamentous fungi isolated from grapevine was carried out in order to select new isolates producing biosurfactants. Of the 49 fungal isolates previously evaluated for emulsion formation in the primary selection, 26 isolates were pre-selected. In the secondary stage, the fungal isolate 50 (I50) was selected for presenting better characteristics in the production of the biosurfactant through the analysis of surface tension, emulsification index and stability. Through morphological and molecular data the fungus was identified as being of the species *Trichoderma asperellum* CBS 433.97. Of the five carbon and nitrogen sources tested through the central rotational composite design (CRCD), corn vegetable oil and urea were the best sources of carbon and nitrogen, with higher concentrations of nitrogen source and lower concentrations of carbon source if stood out in the production of the biosurfactant, respectively in 3 days of fermentation. The biosurfactant showed an active power in the antibacterial action against some contaminating microorganisms. After analyzing the critical micellar concentration (CMC) by determining the isothermal microcalorimetric titration (ITC), we obtained the CMC of 1488 mg.L⁻¹ of the biosurfactant characterized, by FTIR, as being a mixture of fatty esters. These results demonstrate that the isolated fungus of the vine *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 has the potential for efficient production of biosurfactant.

Keywords: biosurfactant; endophytic fungus; ester; secondary metabolite; *Trichoderma asperellum* CBS 433.97

1. Introdução

Os biossurfactantes são moléculas tensoativas e com diversidade estrutural que podem ser produzidos por diferentes microrganismos incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Gudina et al., 2013). Essa diversidade estrutural promove propriedades tecnológicas aos surfactantes microbianos como a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial do líquido e, a formação de micelas e microemulsões entre duas fases distintas

(Souza et al., 2014; Zhao et al., 2016). Esses compostos podem ser divididos em dois grupos: (a) compostos de baixo peso molecular conhecidos como glicolípidos, ácidos graxos e alguns lipopéptidos de cadeia curta (Yan et al., 2012), e (b) compostos de alto peso molecular conhecidos como lipopolissacarídeos ou lipoproteínas (Markande et al., 2013; Uad et al., 2010).

Nos últimos anos os biossurfactantes têm sido utilizados como alternativa verde, pois comparados com os surfactantes sintéticos são biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade e são eficazes em condições extremas de pH, temperatura e salinidade (Luna et al., 2013). Possuem aplicação em diversas áreas como agricultura, farmacêutica, cosmética, indústrias alimentícias, recuperação de petróleo e remediação ambiental (Gudina et al., 2013; Sachdev e Cameotra, 2013; Shekhar et al., 2015). A produção e composição dos biossurfactantes são influenciados pelas condições de cultura e composição do meio, podendo ser sintetizados por microrganismos que se desenvolvem em substratos insolúveis em água (hidrocarbonetos, óleos vegetais) e sobre compostos solúveis em água (carboidratos, glicerol) (Faria et al., 2015). Na composição do meio de cultura, a relação entre as fontes carbono e nitrogênio e as condições operacionais (temperatura, pH, agitação e aeração) afetam a produção de biossurfactantes. Esses parâmetros são frequentemente avaliados em processos de otimização para aumentar a produtividade e reduzir custos (Santos et al., 2016; Unás et al., 2018; Varjani e Upasani, 2017).

As bactérias são frequentemente utilizadas na produção de biossurfactantes. No entanto, a natureza patogênica de algumas delas restringe o uso desses compostos (Elshikh et al., 2017). Estudos com fungos filamentosos destacam-se na produção de compostos de importância econômica devido à adaptabilidade em diferentes ambientes (Cortés e Mosqueda, 2013). Alguns gêneros e espécies de fungos filamentosos aplicados na produção de biossurfactantes são: *Aspergillus sp.* (Kiran et al., 2009), *Thricoderma sp.* (Liu et al., 2006), *Penicillium sp.* (Cortés e Mosqueda, 2013), *Polyporus sulphureus* e *Phellinus sp.* (Arun e Eyini, 2011) e *Curvularia luneta* (Paraszkiewicz et al., 2002).

Em plantas a composição de fungos filamentosos endofíticos varia com relação à espécie vegetal e com os tecidos e órgãos, e são influenciadas diretamente de acordo com a variação geográfica, idade e estado fitossanitário das plantas (Moricca et al., 2012; Saikkonen, 2007). A videira (*Vitis vinífera* L.) é uma das espécies frutíferas com espaço consolidado no mercado, cuja exploração atende à demanda no campo farmacêutico e alimentício, e os produtos atendem ao mercado nacional e internacional. Em seu ambiente natural a videira pode possuir muitos fungos e leveduras, sendo os mais frequentemente isolados: *Fusarium spp.*, *Cylindrocarpon spp.*, *Alternaria spp.*, *Penicillium spp.*, *Trichoderma spp.* e *Pestalotiopsis spp.* (Ali et al., 2009).

Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* estão entre os mais estudados e utilizados como agentes de biocontrole de doenças vegetais em todo o mundo. Muitas espécies deste gênero são reconhecidas como produtoras de metabólitos secundários e eficazes na ativação de mecanismos de defesas da planta e na regulação do crescimento vegetal. Entre as espécies, o *Trichoderma asperellum* se destaca pela sua inclusão na lista de biocontrole de microrganismos em países como a Austrália, Canadá, China e EUA (Woo et al., 2014). Entretanto, na literatura não há estudos com o objetivo de avaliar a produção de biossurfactante por *T. asperellum*. Em sua maioria, os relatos desta espécie são sobre a sua eficácia como agente de biocontrole contra vários patógenos vegetais. Assim, o *T. asperellum* apresenta-se como uma nova fonte de fungo endofítico utilizado na produção do biossurfactante. Estudos sobre novas fontes de fungos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinífera* L.) são necessários para o avanço tecnológico dos processos industriais. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi selecionar fungos com potencial para a produção de biossurfactante, bem como avaliar as melhores condições para essa produção e identificar os produtos formados.

2. Materiais e métodos

2.1. Microrganismo

Foram utilizados 49 isolados de fungos filamentosos endofíticos de videiras (*Vitis vinífera* L.) provenientes da coleção de Cultura de Fungos Endofíticos do LPNBio (Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – campus Itapetinga, Bahia, Brasil. Esses microrganismos são mantidos em meio de ágar batata dextrose (Potato Dextrose Agar - PDA) com óleo mineral, a 4°C e renovados a cada 4 meses. Fungos endofíticos da casca de caule, xilema, folhas e raízes da variedade Syrah (*Vitis vinífera* L.) foram isolados de três vinhedos localizados em Diamantina (latitude sul 18,24° e longitude oeste 43,57°), mesorregião de Jequitinhonha, estado de Minas Gerais, Brasil. A coleta e o isolamento das amostras ocorreram em janeiro de 2016 (Silva, 2019).

2.2. Preparação do inóculo e fermentação

A fermentação líquida ocorreu em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio composto por: glicose 20 g.L⁻¹; NaNO₃ 5 g.L⁻¹; NaCl 5 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 1 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,5 g.L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 6,2 ± 0,3. As soluções contendo os meios com os nutrientes foram esterilizadas (121°C por 15 min) e depois resfriadas à temperatura ambiente. Foi adicionada 10 mL da suspensão de esporos em água contendo 10⁷

esporos.mL⁻¹, preparada usando câmara de Neubauer para contagem dos esporos. As fermentações foram realizadas a 25°C de maneira estática por 15 dias (Anexo 1). Após esse tempo, a cultura fermentada foi filtrada e centrifugada a 3000 g por 5 min. O extrato fermentado foi considerado uma fonte de biossurfactante bruto (BSB).

2.3. Seleção primária

A seleção primária consistiu em uma etapa qualitativa. Em um tubo de ensaio foram adicionados 2 mL do BSB com o mesmo volume de óleo vegetal e agitados em vórtex por 2 min. A formação da emulsão foi avaliada visualmente, por um período de uma hora, e foi aplicada a seguinte codificação: baixa emulsão (+), emulsão regular (++) e emulsão estável (+++). As seguintes associações foram estabelecidas: baixa emulsão - sistema de emulsão com menor altura visível ou insuficiente; emulsão regular - sistema com maior altura visível e geralmente estável; emulsão estável - sistema firme e estável por uma hora.

2.4. Seleção secundária

Os isolados fúngicos selecionados na etapa primária foram utilizados na etapa de seleção secundária e uma nova fermentação foi realizada. A produção de BSB foi avaliada usando dois métodos, o índice de emulsificação e estabilidade (IE) e a tensão superficial (TS). Foram utilizados como critérios de seleção, valores de redução da tensão superficial menor que 40 mN.m⁻¹ e índice de emulsificação acima de 50%.

2.4.1 Índice de emulsificação e estabilidade

Este ensaio baseou-se na capacidade de emulsificação dos biossurfactantes pelo método desenvolvido por Cooper et al. (1981). Foram adicionados 2 mL de um composto hidrofóbico líquido a igual volume do BSB e homogeneizados num vórtex durante 2 min. A estabilidade da emulsificação foi medida após 24 h e o índice de emulsificação foi calculado dividindo a altura medida da camada de emulsão pela altura total da camada líquida e multiplicando por 100 (Equação 1).

$$IE(\%) = \frac{\text{altura total da camada emulsionada}}{\text{altura total da camada líquida}} \times 100 \quad (1)$$

2.4.2 Medida da tensão superficial

A tensão superficial do BSB foi medida por meio de um tensiômetro, pelo método do deslocamento do anel de Du Nouy (Bodour e Miller-Maier, 1998). Foi medida a força máxima necessária para separar o anel da superfície líquida em análise. Neste instante, o valor da força F foi lida na escala diretamente como sendo a tensão superficial, em $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Todas as medições de tensão superficial foram realizadas em triplicata a 25°C . A tensão superficial da água pura foi medida para avaliar a redução da tensão superficial de cada amostra em relação a da água pura.

2.5. Caracterização morfológica

O isolado fúngico 50 (I50), selecionado como o melhor produtor de biossurfactante, foi identificado pela técnica de microcultura, utilizando as características morfológicas, como padrão de crescimento, formações de hifas, pigmentações e estruturas de esporos no PDA (Koneman et al., 2001). O exame de conidióforos e conídios foi realizado sob um microscópio óptico (Bioval CE) de preparações de lâminas coradas com azul de metileno.

2.6. Identificação molecular

O I50 foi submetido à identificação genética pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil. A extração do DNA genômico ocorreu utilizando o protocolo de extração de DNA com fenol pela metodologia de Aamir et al. (2015). Para amplificação do gene do fator de alongação foi empregada a técnica de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído da amostra. Os primers (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR e para o sequenciamento foram EF 728F e Teflr, complementares às extremidades do gene do fator de alongação. O produto da amplificação foi purificado em coluna (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e submetido diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador automático ABI 3500XL Series (Applied Biosystems). A sequência consenso foi gerada a partir das sequências obtidas pelos primers citados e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) e do CBS (www.westerdijkinstitute.nl/). As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) dentro do BioEdit 7.2.6 (Hall, T.A. 1999) e as análises de distância genética foram

conduzidas utilizando o programa MEGA versão 6.0 (Tamura et al., 2013). A matriz de distância foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção do dendograma a partir das distâncias genéticas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), com valores de bootstrap calculados a partir de 1000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 6.0.

2.7. Avaliação dos tipos de fontes de carbono e nitrogênio e do tempo no processo de fermentação

Para avaliação das fontes, a concentração dos componentes do meio de cultura e as condições de fermentação foram iguais às do item – Preparação do inóculo e fermentação. Dois experimentos foram conduzidos com o I50 selecionado na etapa de seleção secundária para avaliar a melhor fonte de carbono e de nitrogênio na produção do BSB. Variou-se a fonte de carbono (glicose, glicerol, sacarose, óleo vegetal e lactose) com nitrato de sódio sendo a fonte de nitrogênio padrão e, variou-se a fonte de nitrogênio (nitrato de sódio, ureia, extrato de levedura, extrato de malte e sulfato de amônio) com a glicose sendo a fonte de carbono padrão. Para cada conjunto experimental foi analisado também o tempo de fermentação (0, 3, 9 e 15 dias). As respostas foram as medidas da tensão superficial e o espalhamento do óleo.

2.7.1 Ensaio de espalhamento do óleo

O ensaio de espalhamento de óleo foi realizado conforme metodologia de Morikawa et al. (2000). Em uma placa de petri foram adicionadas 20 mL de água destilada, 20 µL de óleo vegetal e 10 µL do biossurfactante bruto (BSB). Foi medido o diâmetro (cm) da zona limpa na superfície do óleo (Anexo 2).

2.8. Determinação de biomassa a partir da melhor fonte de carbono e nitrogênio

A concentração de biomassa foi determinada pela medida do peso seco. Uma amostra de 10 mL da cultura fermentada foi retirada dos frascos e centrifugada a 10 000 g a 4 °C durante 20 min. O sedimento foi seco até peso constante em uma estufa a 70°C e o peso seco das células foi medido em uma balança analítica com repetibilidade 0,0001g. A massa celular foi expressa em g.L⁻¹ (Bordoloi e Konwar, 2008; Makkar e Cameotra, 1997).

2.9. Efeito da concentração da melhor fonte de carbono e nitrogênio

Um experimento foi conduzido em um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para avaliar a influência dos fatores concentração da melhor fonte de carbono (X_1) e nitrogênio (X_2) (fatores independentes), com 3 repetições no ponto central, na produção do BSB. As variáveis independentes e sua faixa de valores experimentais estão apresentados na Tabela 1. Os efeitos dessas variáveis foram determinados considerando a tensoatividade do biossurfactante (expressa como a porcentagem de redução da tensão superficial do meio – Equação 2), índice de emulsificação e espalhamento do óleo como variáveis respostas.

$$\%TS = \frac{\Delta TS}{TS_{ini}} \times 100 \quad (2)$$

Onde TS é a porcentagem de redução da tensão superficial (%); ΔTS é a diferença entre a tensão superficial final e inicial (mN.m^{-1}); TS_{ini} é a tensão da amostra inicial - tempo 0 (mN.m^{-1}).

Tabela 1. Fatores do delineamento composto central rotacional e as faixas de variação de acordo com os níveis experimentais

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Óleo vegetal de milho (X_1) (g.L^{-1})	5,85	10,00	20,00	30,00	34,14
Ureia (X_2) (g.L^{-1})	0,75	2,00	5,00	8,00	9,24

2.10. Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana do BSB foi realizada com as seguintes cepas de bactérias, gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 11229 (*E. coli*) e *Salmonella choleraesuis* ATCC 6539 (*S. choleraesuis*), gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 (*S. aureus*) e *Listeria monocytogenes* ATCC 17535 (*L. monocytogenes*). O efeito inibitório dos biossurfactantes brutos foi determinado utilizando-se a metodologia de difusão cavidade em Ágar (Pereira et al., 2008). A partir dos halos formados pela ação dos biossurfactantes, que evidenciaram a sensibilidade do microrganismo, pode-se avaliar o perfil de sensibilidade das bactérias em diferentes concentrações (500; 250; 125; 62,5; 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A concentração mínima inibitória (Minimum Inhibitory Concentrations - MIC) foi definida como a menor concentração do caldo fermentando contendo o BSB em que ocorreu a presença de halo de inibição.

2.11. Extração do Biossurfactante

O biossurfactante foi extraído pelo método de Folch (Folch et al., 1957). Uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1) foi adicionada à amostra de BSB. Após a homogeneização da mistura por 30 min, a fase orgânica foi recuperada usando um funil de separação após repouso por 15 min. Em seguida as amostras foram evaporadas usando um evaporador rotativo a 40°C por 40 min. O biossurfactante parcialmente purificado (BSPP) foi armazenado no congelador para análises posteriores.

2.12. Estudo microcalorimétrico do biossurfactante e determinação da CMC

A micelização de moléculas anfifílicas ocorre na concentração micelar crítica (CMC). A CMC pode ser determinada por meio dos seus parâmetros termodinâmicos pela Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). Neste estudo, a CMC foi determinada por meio da variação de entalpia, $\Delta_{\text{mix}}H$, utilizando um microcalorímetro de titulação isotérmica (TAM III, TA Instruments, New Castle, DE, USA). O microcalorímetro é composto por um par de células com capacidade de aproximadamente 1,8 mL de solução. Foram adicionadas 1,8 mL de água destilada na célula de referência e na célula da amostra do calorímetro. Trinta injeções de 1 μL de solução de extrato do biossurfactante (BSPP) foram tituladas na célula da amostra utilizando uma seringa Hamilton (100 μL) e controlada por um instrumento para as injeções. Uma hélice com agitação de 60 rpm foi utilizada durante todo o experimento. O intervalo entre as injeções foi de 30 minutos. A medida foi realizada na temperatura de 25°C. Cada medição do fluxo de energia gera um pico que representa a variação de energia associada à injeção de um pequeno volume de extrato (BSPP) no sistema analisado (Fig. 1). À medida que o sistema analisado atinge a saturação, o sinal de energia liberado diminui até atingir a saturação completa. Ao integrar a área de cada pico (energia liberada por um período de tempo) obtém-se a medida de ΔH (em unidade de joules por g de extrato) do sistema analisado. Os dados foram avaliados com o software NanoAnalyze versão 2.2.0 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). As titulações foram realizadas duas vezes, garantindo a reprodutibilidade.

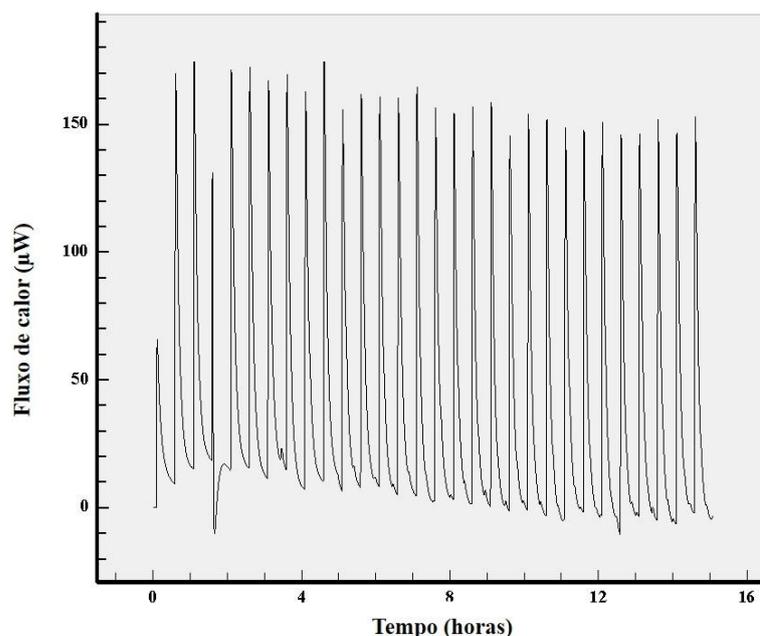


Fig. 1 Deflexões que correspondem à variação de potência ao se fazer injeções consecutivas do extrato (biossurfactante)

2.13. Caracterização estrutural do biossurfactante - Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

A caracterização dos grupos funcionais do BSPP foi avaliada utilizando espectrômetro FTIR- Infravermelho médio Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), equipado com célula de reflectância total atenuada (Attenuated Total Reflectance - ATR) e detector de sulfato de triglicina deuterado (Deuterated Triglycine Sulfate - DTGS). Antes de cada coleta foi realizada uma leitura do espectro de fundo (*background*), em condições padronizadas. Em seguida, a amostra foi colocada sobre o compartimento do acessório onde incidem os raios na faixa do infravermelho (cristal de diamante), sendo obtidos os espectros no modo de transmitância. As amostras foram avaliadas na região espectral com comprimento de onda de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} , apodização triangular e 64 varreduras para cada espectro. Todos os espectros foram recolhidos com uma resolução de 4 cm^{-1} a temperatura ambiente e analisados pelo software Agilent MicroLab PC.

2.14. Análise estatística

Todos os dados experimentais foram expressos em termos de médias aritméticas com pelo menos três repetições independentes com desvio padrão (\pm). Todos os testes estatísticos

foram realizados com um nível de significância de 10%, usando o programa estatístico SAS Edition University.

3. Resultados e Discussão

3.1. Seleção primária: Formação de emulsão

Foram avaliadas os 49 isolados pertencentes ao banco de coleção de cultura de fungos. Na Tabela 2 estão apresentados os isolados fúngicos que formaram emulsão. O potencial emulsificante foi codificado em baixa emulsão (+), emulsão regular (++) e emulsão estável (+++).

Tabela 2. Isolados fúngicos selecionados na seleção primária para produção de biossurfactante - formação de emulsões

Isolados	Formação de emulsão
2	++
3	++
4	++
7	+
9	+
11	+++
13	+++
17	+
21	+
22	++
23	++
25	++
26	+++
28	++
29	++
30	+++
31	+
32	++
33	+
42	++
43	++
45	++
50	++
51	++
52	+
53	++

(+) baixa emulsão, (++) emulsão regular, (+++) emulsão estável.

Na análise de formação de emulsão, verificou-se que para alguns isolados fúngicos, a emulsão formada a partir do BSB foi mais estável e firme quando comparada com outros

isolados. Dessa forma, análises complementares foram executadas para melhor entender as particularidades de cada isolado em estudo. Foram então selecionadas um total de 26 isolados para a etapa de seleção secundária. A emulsão proveniente do processo de emulsificação, é formada pela presença de um líquido contendo gotículas de gordura ou óleo suspensos em um fluido, como a água (Das e Mukherjee, 2007; Pacwa-Plociniczak et al., 2011). Geralmente, os biossurfactantes de alto peso molecular destacam-se por serem emulsionantes eficientes (Markande et al., 2013).

A avaliação da propriedade da emulsão é interessante, pois é útil na indústria de cosméticos e alimentos para formar emulsão de óleo/água. Alimentos como sorvetes e queijos macios são produzidos com cremosidade e textura pela adição de emulsionantes, que atuam melhorando a estabilidade da massa, a textura e o volume (Nitschke e Costa, 2007).

3.2. Seleção secundária: Tensão superficial e índice de emulsificação

A propriedade importante de um biossurfactante é o seu potencial para reduzir a tensão superficial do líquido (Anjum et al., 2016). Para cada isolado fúngico, a presença do BSB foi avaliada quanto à sua capacidade de reduzir a tensão superficial da água ($TS_{\text{água}} = 71,2 \text{ mN.m}^{-1}$) Fig. 2. Alguns isolados aumentaram a tensão superficial a ponto de exceder o valor da tensão superficial da água, como os isolados 2, 13 e 33. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que o fungo pode ter utilizado o biossurfactante para consumo como forma de nutrição ou adveio de alguma degradação do biossurfactante influenciada por outros compostos. Vários autores relataram a eficiência de um biossurfactante na redução da tensão da água para 30 a 39 mN.m^{-1} (Gudiña et al., 2010; Meneses et al., 2017).

Dos isolados fúngicos analisados, destacaram-se os isolados 3 e 50, pois a queda de tensão foi maior, reduzindo a tensão superficial da água de $71,2 \text{ mN.m}^{-1}$ para $41,13 \pm 1,41$ e $37,71 \pm 0,44 \text{ mN.m}^{-1}$, respectivamente. Assim, na mesma ordem, o percentual de redução foi de 42,23% e 47,04%. Portanto, o isolado 50 (I50) foi selecionado por fornecer uma porcentagem maior de redução da tensão superficial.

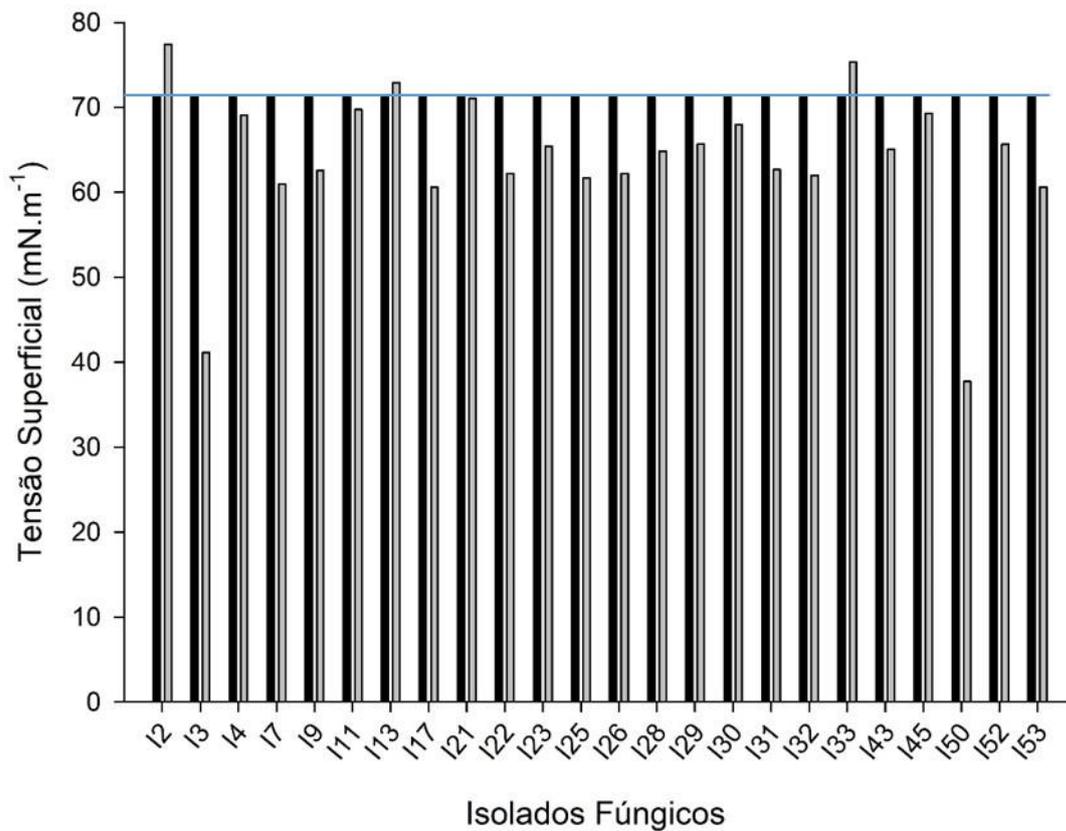


Fig. 2 Tensão superficial inicial (TS ini = água) e final (TS fin) dos biosurfactantes produzidos pelos isolados fúngicos

Legenda: ■ TS ini; ■ TS fin

Para complementar a seleção secundária, foi realizada análise do índice de emulsificação. O que ocorre nesta análise é que, quando um composto imiscível, como um hidrocarboneto não polar, é colocado em uma solução aquosa contendo surfactante, as porções hidrofílicas e hidrofóbicas do surfactante são direcionadas para a água e para o hidrocarboneto, respectivamente, promovendo a dispersão de hidrocarbonetos em solução aquosa de fase, formando a emulsão (Markande et al., 2013; Souza et al., 2014). Verificou-se que para os isolados 03 e 50 os índices foram de 52% e 50%, respectivamente (Fig. 3). Esses resultados foram satisfatórios, uma vez que a emulsão formada apresentava índices acima de 50% após o período de 24 horas. Os resultados encontrados no estudo corroboram os resultados de Batista et al. (2006), que relatam que a eficácia de um biosurfactante ocorre quando ele tem a capacidade de estabilizar as emulsões em pelo menos 50% do volume total por 24 h.

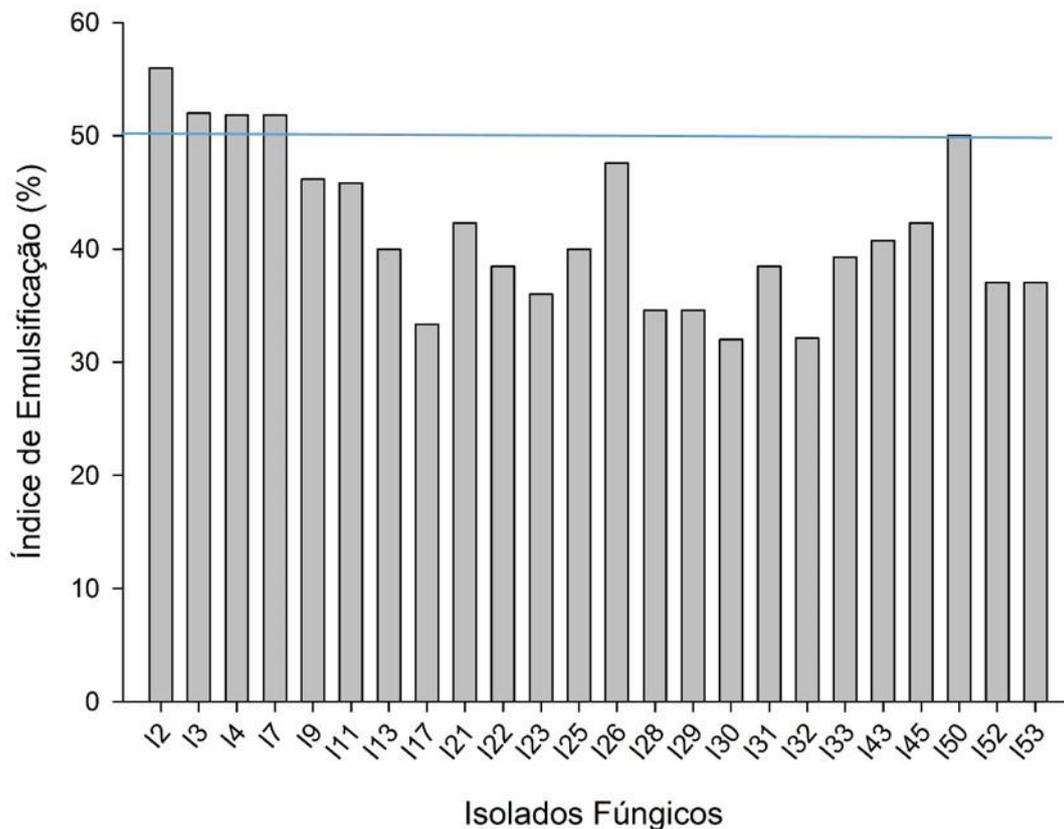


Fig. 3 Índice de emulsificação dos biossurfactantes produzidos por isolados fúngicos em fermentação líquida por 15 dias

Mesmo com taxas de emulsificação superiores a 50%, os isolados I2, I4 e I7 não apresentaram redução expressiva da tensão superficial (Fig. 2) da água. Portanto, considerando os resultados dessas duas análises, foi possível confirmar a eficiência dos isolados fúngicos I3 e I50. Por se tratar de um processo biológico em que é difícil trabalhar com um grande número de amostras, apenas o isolado 50 (I50) foi selecionado por atender a dois critérios de seleção (TS menor que 40 mN.m^{-1} e IE acima de 50%).

3.3. Caracterização morfológica do I50

As colônias cresceram rapidamente, com preenchimento total da placa no dia 5. A coloração das colônias variou de branco a verde claro e depois a verde mais escuro com zonas brancas (Anexo 3). A avaliação microscópica revelou um conidióforo em uma pirâmide com ramos de ângulo reto, ápice curto e um pouco maior na base. As hifas são hialinas e septadas. Os conídios são na maioria verdes, subsféricos, com paredes lisas ou ásperas. Este I50 foi

isolado da raiz de videira da cultivar Syrah de Diamantina, Minas Gerais, Brasil. Todas essas características indicam que o I50 pertence ao gênero *Trichoderma*.

3.4. Identificação molecular do I50

Os fragmentos da região do fator de alongação foram aplicados e sequenciados com sucesso a partir do DNA genômico extraído do I50. A sequência parcial do gene do fator de alongação obtida para I50 está apresentada no Anexo 4. A sequência parcial do gene do fator de alongação obtida apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região do operon ribossomal da espécie *Trichoderma asperellum*, depositadas no banco de dados GenBank e no banco de dados do CBS-Knaw (atual Westerdijk Fungal Biodiversity Institute). A análise de distância genética (Fig. 4) recuperou a amostra I50 em um agrupamento robusto, com um valor de re-amostragem de 99% com a linhagem tipo de *Trichoderma asperellum* CBS 433.97. Assim, os resultados das análises realizadas nas bases de dados e da filogenia sugerem a identificação final da amostra I50 como *Trichoderma asperellum* (Samuel, Lieckf & Nirenberg 1999).

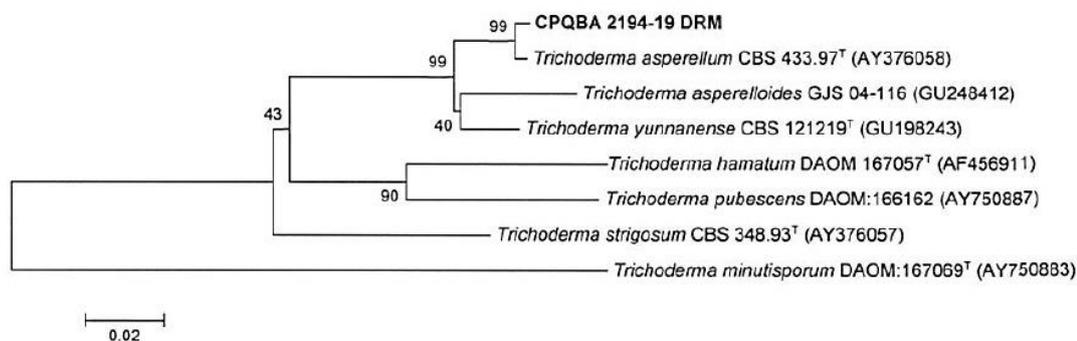


Fig. 4 Dendrograma baseado em distância genética utilizando o método Neighbor-joining, demonstrando relação entre a sequência parcial do gene do fator de alongação do I50 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados CBS (atual Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) e Genbank

CPQBA 2194-19 DRM = I50

3.5. Avaliação das fontes de nitrogênio e carbono e efeito do tempo de fermentação na produção do biosurfactante

As fontes utilizadas no meio de cultura desempenham um papel importante na produção de biossurfactantes. Avaliando a tensão superficial observou-se que para as fontes de nitrogênio no período de 3 dias de fermentação houve uma queda brusca na tensão superficial para quase todas as amostras, com predominância do sulfato de amônio, da ureia e do extrato de malte. As fontes sulfato de amônio e ureia apresentaram porcentagem de redução na tensão superficial de 31% e 33%, respectivamente. A redução da tensão superficial é indicativa de que biossurfactantes foram produzidos no meio de cultivo. Após esse período a queda foi mais lenta, pois a carga de nutrientes diminuiu e pode acarretar na inibição dos produtores (Fig. 5a).

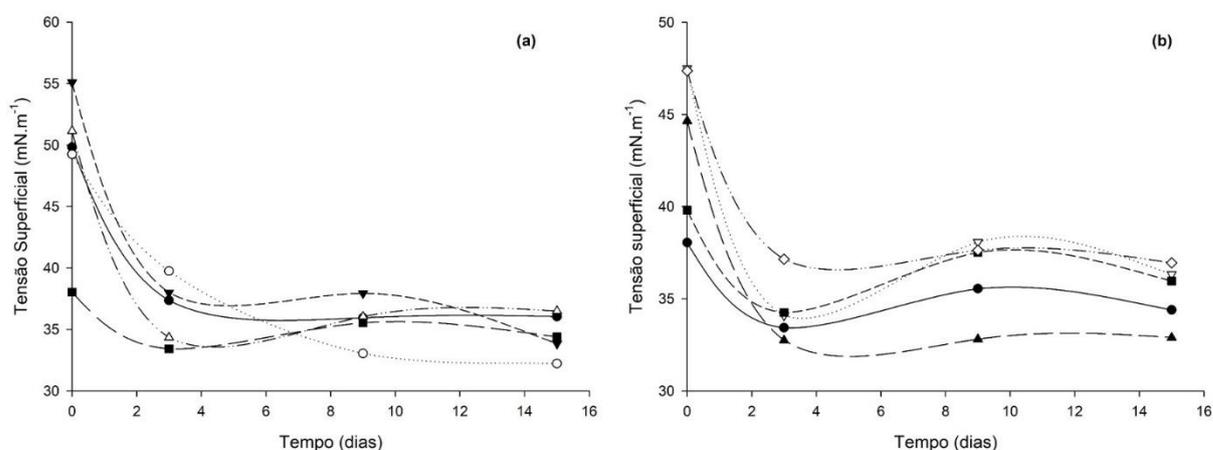


Fig. 5 Influência das fontes de nitrogênio (a) e carbono (b) na produção de biossurfactante por *T. asperellum* em termos de tensão superficial

(a) —●— Extrato de malte;○..... Extrato de levedura; ---▼--- Sulfato de amônio; ---△--- Ureia; ---■--- Nitrato de sódio
 (b) —●— Glicose;▽..... Lactose; ---■--- Sacarose; ---◇--- Glicerol; ---▲--- Óleo vegetal de milho

Para as fontes de carbono avaliadas (Fig. 5b), observou-se uma maior redução da tensão superficial para lactose, óleo de milho e glicerol, pois houve uma redução de 28%, 27% e 22%, respectivamente, em um período de 3 dias de fermentação. O experimento contendo óleo de milho foi apenas 1% menor quando a fonte de lactose (28%) foi usada.

Considerando os custos de produção, o óleo vegetal de milho como fonte de carbono foi selecionado neste experimento por favorecer uma economia no processo, por ser uma fonte mais barata quando comparado à lactose. Wei et al. (2005) em um estudo relataram que a melhor fonte de carbono entre as sete diferentes fontes testadas foi o óleo de oliva, reforçando assim a eficiência do uso de óleos vegetais como fontes de carbono na produção de biossurfactantes.

Observou-se uma oscilação durante os períodos analisados, com um aumento na medida da tensão superficial para as demais fontes até o período de 9 dias de fermentação. Em seguida ocorreu uma queda de tensão, mas com valores ainda maiores em relação à tensão medida no tempo 3. Colla et al. (2010) ao realizar um estudo sobre a produção simultânea de lipases e biossurfactantes utilizando *Aspergillus spp*, verificaram uma redução significativa da tensão superficial do produto obtido pelo fungo nos primeiros dias de fermentação e posteriormente houve um aumento de tensão. Isso pode ter ocorrido devido à possível degradação das moléculas tensoativas causadas por fungos ou mesmo ao consumo dessas moléculas pelo microrganismo. Desta forma, as fontes glicose, lactose, sacarose e glicerol foram descartadas como fontes de carbono devido à instabilidade dos valores de tensão superficial.

Na técnica de espalhamento de óleo, o extrato de levedura como fonte de nitrogênio mostrou um comportamento linear durante o período de fermentação (Fig. 6a).

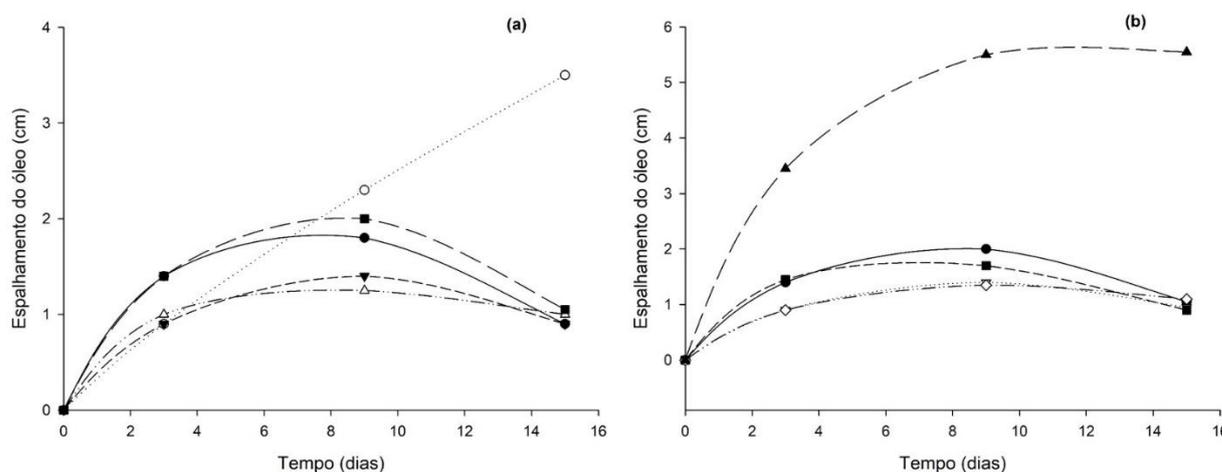


Fig. 6 Influência das fontes de nitrogênio (a) e carbono (b) na produção de biossurfactante por *T. asperellum* em termos de espalhamento do óleo

(a) —●— Extrato de malte;○..... Extrato de levedura; ---▼--- Sulfato de amônio; - - -△- - - Ureia; —■— Nitrato de sódio
 (b) —●— Glicose;▽..... Lactose; ---■--- Sacarose; - - -◇- - - Glicerol;
 —▲— Óleo vegetal de milho

Para as demais fontes, a zona de limpeza do óleo passou a ser medida a partir do 3º dia de cultivo, mostrando uma diminuição no diâmetro dessa zona no final do período, ou seja, redução da atividade da superfície. Para as fontes de carbono (Fig. 6b), o uso de óleo vegetal de milho na produção do biossurfactante apresentou altos valores de espalhamento de óleo, resultando em maior atividade superficial. Os valores crescentes da propagação do óleo nos períodos 3 e 9 dias de fermentação são indicativos da produção de biossurfactante. Com o

tempo, há uma tendência do biossurfactante espalhar o óleo cada vez mais até atingir o ponto de estabilidade, onde o composto não pode expandir essa zona de limpeza.

Comparando as duas técnicas utilizadas na avaliação das fontes do estudo, verificou-se que ambas apresentaram resultados determinantes em apenas 3 dias de cultivo. Isso mostra que é possível obter biossurfactantes a partir do fungo endofítico *T. asperellum* com menor tempo de fermentação, economizando tempo e custos de produção. A aplicação de fontes mais baratas, como a ureia e o óleo vegetal de milho, permitiu a produção desses compostos com potencial.

O crescimento celular foi avaliado pela produção de biomassa. A maior concentração de células foi obtida no cultivo com óleo de milho ($4,8300 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,12$), seguido de cultura com ureia ($1,0633 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,62$) em 3 dias de fermentação. A fonte de carbono contendo óleo vegetal teve maior impacto no aumento da biomassa. Valores próximos foram encontrados por Wu et al. (2008) que descreveram a produção de 3,7 e 2,6 g.L^{-1} de biomassa do biossurfactante para o azeite e o óleo de soja, respectivamente, produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* EM1.

3.6. Determinação da concentração de ureia e óleo vegetal de milho na produção de biossurfactante

A partir dos resultados da análise de regressão, foi possível avaliar a significância dos parâmetros através dos modelos estatísticos (quadrático e linear). Os resultados para as variáveis respostas, porcentagem de redução da tensão superficial, espalhamento de óleo e índice de emulsificação são apresentados na Tabela 3. O DCCR foi utilizado para estudar o efeito da concentração de fontes de carbono (X1) e nitrogênio (X2) na produção de biossurfactante. Outros estudos também investigaram o efeito das concentrações de fontes de carbono e nitrogênio na produção do biossurfactante (Kiran et al., 2010; Unás et al., 2018). A maior porcentagem de redução da tensão superficial foi obtida quando foram utilizadas concentrações mais altas para a fonte de nitrogênio (X2) e inversa para a fonte de carbono (X1), observada no teste 8, em que a porcentagem atingiu aproximadamente 38% de redução de TS.

Tabela 3. Planejamento experimental obtido para o DCCR e os valores experimentais das respostas. Os valores previstos foram apresentados apenas para a variável significativa (% de Tensão Superficial)

Ensaio	X ₁ (g.L ⁻¹)	X ₂ (g.L ⁻¹)	Tensão superficial (%)	Tensão superficial \hat{Y}	Espalhamento do óleo (cm)	Índice de emulsificação (%)
1	10,00 (-1)	2,00 (-1)	37,26	35,04	4,87	50,00
2	10,00 (-1)	8,00 (1)	36,44	38,29	4,27	46,12
3	30,00 (1)	2,00 (-1)	26,73	27,82	3,07	41,63
4	30,00 (1)	8,00 (1)	29,60	31,07	5,20	45,19
5	5,85 (-1,41)	5,00 (0)	36,43	38,17	6,13	43,90
6	34,14 (1,41)	5,00 (0)	28,28	27,95	5,27	42,84
7	20,00 (0)	0,75 (-1,41)	30,26	30,76	5,20	47,61
8	20,00 (0)	9,24 (1,41)	37,99	35,35	7,13	48,88
9	20,00 (0)	5,00 (0)	35,60	33,06	6,33	46,14
10	20,00 (0)	5,00 (0)	31,18	33,06	5,57	48,78
11	20,00 (0)	5,00 (0)	33,86	33,06	6,33	43,90

De acordo com o gráfico de Pareto (Fig. 7), para a redução variável dependente da porcentagem de tensão superficial, o efeito das concentrações de carbono (X1) e da fonte de nitrogênio (X2) foi significativo a um nível de confiança de 90%, apresentando-se mais ajustável ao modelo linear.

O modelo de regressão obtido para esta variável dependente é dado na equação 3:

$$TS = 37,57529 - 0,36115Conc_{oleo} + 0,54091Conc_{ure} \quad (3)$$

Onde TS é a porcentagem de redução da tensão superficial (%); Conc_{oleo} é a concentração da fonte de carbono (óleo vegetal de milho em g.L⁻¹); Conc_{ure} é a concentração da fonte de nitrogênio (ureia em g.L⁻¹). O coeficiente de determinação (Rsqr = 0,84) obtido da análise de regressão mostrou boa semelhança entre os dados experimentais e os valores previstos pela equação ajustada.

Não houve significância dos modelos testados para as variáveis índice de emulsificação e espalhamento de óleo. Assim, as concentrações estudadas para fontes de carbono e nitrogênio não tiveram efeito para essas variáveis. Não há problemas em seguir as mesmas condições obtidas para a variável tensão superficial. Mesmo em baixas concentrações de fontes de carbono, os biossurfactantes produzidos por esses testes foram capazes de disseminar compostos hidrofóbicos com eficiência. Os surfactantes presentes nas emulsões causam alterações na tensão interfacial (Ramírez et al., 2015; Rabiei et al., 2013; Varjani et al., 2014).

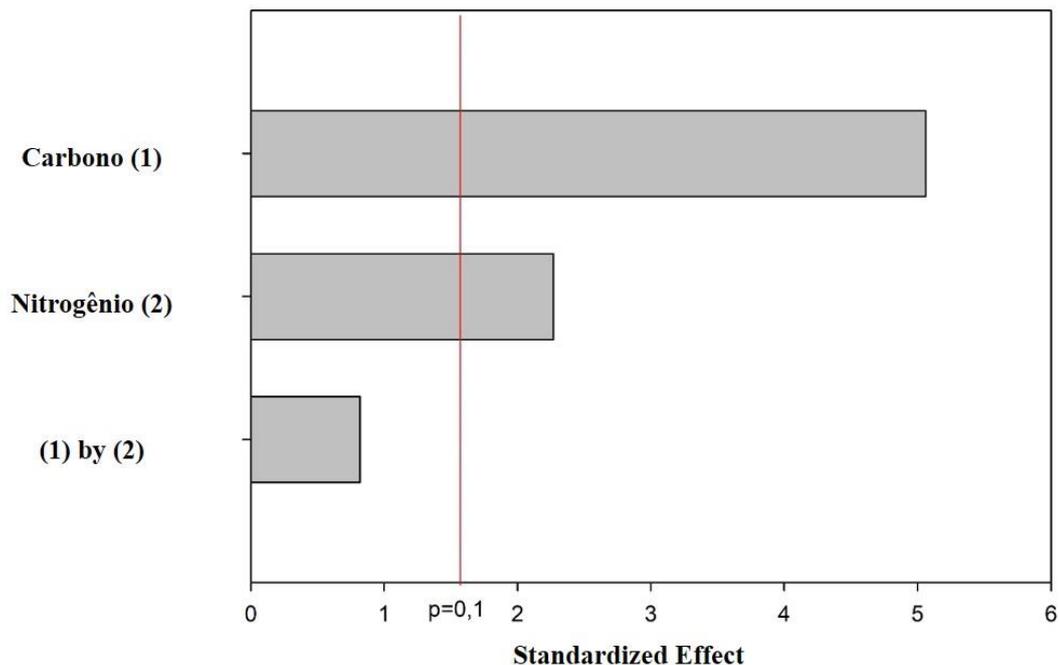


Fig. 7 Gráfico de Pareto para modelos significativos para a variável resposta, tensão superficial - TS (%) em função das variáveis estudadas, concentração da fonte de carbono - óleo vegetal de milho (X1) e concentração da fonte de nitrogênio - ureia (X2) no processo de produção de biossurfactante pelo fungo endofítico *T. asperellum* em fermentação submersa

O uso de projetos experimentais, como a metodologia da superfície de resposta (MSR), foi empregado com sucesso no processo de otimização da composição do meio e das condições da cultura para maximizar a produção de biossurfactantes por vários microrganismos (Bhange et al., 2016; Coronel-León et al., 2015; Santos et al., 2014). A superfície de resposta e os gráficos de contorno são mostrados na Fig. 8. Os resultados demonstraram claramente que concentrações mais baixas da fonte de carbono (óleo vegetal de milho) e concentrações mais altas da fonte de nitrogênio (ureia) produzem um biossurfactante com características muito específicas, com maior eficácia em reduzir a tensão superficial. Quantidades maiores da fonte de nitrogênio também foram requeridas por Kiran et al. (2010) para otimização da produção de um novo biossurfactante lipopeptídico produzido por *Brevibacterium aureum* MSA13. Para a produção dos biossurfactantes, é relevante que o processo seja o mais barato possível e que o uso dessas fontes com um custo mais acessível garanta uma economia na obtenção desses metabólitos secundários.

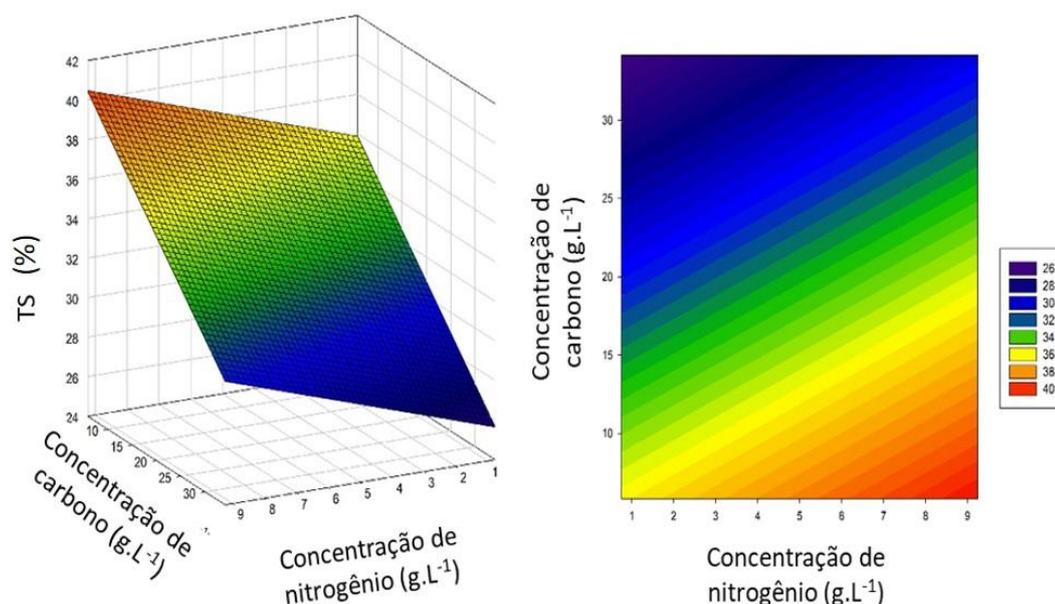


Fig. 8 Superfícies de resposta e linha de contorno para tensão superficial - TS (%) de acordo com a análise estatística do DCCR realizada para avaliar a influência da concentração da fonte de carbono - óleo vegetal de milho e da concentração da fonte de nitrogênio - ureia no processo de produção de biossurfactante pelo fungo endófito *T. asperellum* em fermentação submersa

3.7. Efeito inibitório de biossurfactantes sobre bactérias

O biossurfactante apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Para *S. aureus*, a inibição ocorreu na concentração de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração mínima inibitória do biossurfactante encontrada para as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) e Gram-negativas (*E. coli* e *S. choleraesuis*) e em comparação com a amostra padrão de antibiótico o clorafenicol

Bactéria	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	Biossurfactante	CL
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	125	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 17535	500	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	250	100
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 6539	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol

Segundo Castro et al. (2018) a bactéria *S. aureus* é um microrganismo gram-positivo e está associado a infecções hospitalares, intoxicação alimentar e síndrome de choque. Por esse motivo, é uma das bactérias mais utilizadas na avaliação da capacidade antimicrobiana de biossurfactantes, sendo classificada como patógeno humano oportunista. A inibição da outra gram-positiva, *L. monocytogenes*, ocorreu na concentração mais alta (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Uma quantidade maior de amostra de biossurfactante foi utilizada para promover o poder inibitório, sendo menos ativo na inibição da bactéria *L. monocytogenes*.

Os halos que indicaram atividade antimicrobiana contra *E. coli* foram inibidos na concentração mais alta (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) quando comparados com *S. aureus*. Geralmente caracterizada como um microrganismo que coloniza intestinos humanos e animais, a *E. coli* está associada a doenças conhecidas como diarreogênicas (CDC, 2014). Estudos demonstraram atividade antimicrobiana de biossurfactantes contra *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae*, com uma concentração de inibição de 128 a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Sleiman et al., 2009). Para *S. Choleraesuis* não houve inibição em nenhuma das concentrações estudadas, portanto o biossurfactante não foi ativo para inibir a bactéria em questão.

Em comparação aos grupos de bactérias, as Gram-positivas foram mais inibidas que as Gram-negativas. Bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos biossurfactantes do que as bactérias Gram-negativas, que são inibidas fracamente ou não são inibidas (Kitamoto et al., 2002). O grupo de bactérias gram-negativas apresenta uma membrana lipoproteica que dificulta a inserção dos compostos presentes no biossurfactante. Diferentes das gram-positivas que por não possuir essa membrana, torna-se mais fácil a entrada dos compostos do interior da célula, promovendo a inibição.

Mesmo em diferentes concentrações, os biossurfactantes produzidos a partir do fungo endofítico *T. asperellum* mostraram poder ativo na ação antimicrobiana contra alguns microrganismos contaminantes, o que os torna candidatos promissores para aplicação em vários campos, inclusive na área de alimentos. Entre os tipos de biossurfactantes, lipopeptídeos ou lipoproteínas, que são peptídeos simples de ocorrência natural, apresentam maior ação antimicrobiana (Kanmani et al., 2013).

3.8. Medida da entalpia do biossurfactante parcialmente purificado (BSPP) e CMC

Com o objetivo de analisar a contribuição entálpica na determinação da CMC da mistura do extrato (biossurfactante - BSPP) com H_2O , foram obtidas medidas de ITC (Microcalorimetria de Titulação Isotérmica) correspondentes as consecutivas adições de

pequenas quantidades do extrato (1 μL) referentes às diferentes concentrações (de 5 a 1800 mg.L^{-1}) do BSPP em água destilada.

A variação na entalpia do sistema é mostrada na Fig. 9. Observou-se que quando 1 μL do extrato é adicionado a 1,8 ml de água, a variação de entalpia do sistema é um processo exotérmico que libera aproximadamente -0,0008 KJ/g extrato. Ao aumentar a quantidade de extrato, a energia também aumentou e favoreceu a ocorrência de um comportamento termodinâmico endotérmico no sistema. Após adição de 10 μL do extrato, a variação de entalpia do sistema aproximou-se de 0,00 KJ/g extrato, correspondente à concentração de 1488 mg.L^{-1} (CMC) do BSPP. Com esses resultados, foi possível atribuir que a variação na entalpia do extrato está relacionada à formação de micelas e que este ponto refere-se à concentração micelar crítica do biossurfactante analisado. Quantidades maiores do extrato, ou seja, maiores concentrações do biossurfactante, não alteraram a energia do sistema. A CMC obtida para o biossurfactante está de acordo com os valores gerais encontrados na literatura, entre 64 mg.L^{-1} e 2500 mg.L^{-1} (Marin et al., 2015; Meneses et al., 2017; Oliveira e Garcia-Cruz, 2013).

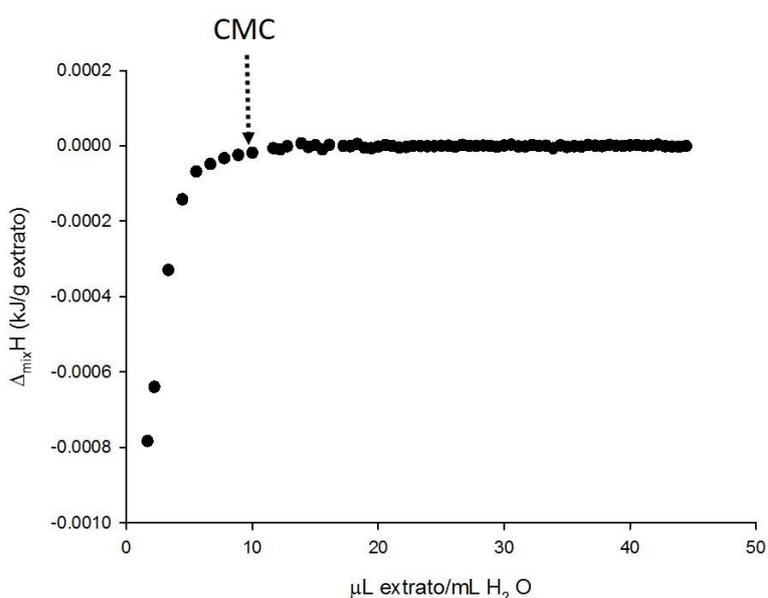


Fig 9. Variação da entalpia do sistema BSPP com água

3.9. Espectroscopia FTIR do biossurfactante parcialmente purificado (BSPP)

A amostra foi submetida à leitura infravermelho com transformada de Fourier, em modo ATR – reflectância total atenuada. Ao comparar as bandas presentes no espectro da amostra às bandas presentes na literatura, foi possível deduzir possíveis grupos presentes na estrutura, porém essa análise ainda não foi suficiente para elucidação estrutural.

Na região de 750 cm^{-1} foi possível observar um sinal de solvente de diluição, referente ao trecho C-Cl (Fig. 10). Três bandas fortes foram encontradas em 1090 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} , que se referem ao alongamento da ligação C-O de ésteres insaturados. A 1470 cm^{-1} foi encontrada uma banda correspondente à deformação angular simétrica da ligação CH_2 da cadeia carbônica saturada. Foi encontrada uma banda intensa a 1750 cm^{-1} , que corresponde ao alongamento da ligação $\text{C}=\text{O}$ dos ésteres, reafirmando a presença do grupo éster a partir das bandas encontradas na região de 1090 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} . Existe um grupo de três bandas fortes em 2850 cm^{-1} , 2910 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} , as quais estão relacionadas ao alongamento simétrico e assimétrico das ligações C-H dos grupos CH_2 e CH_3 de cadeia carbônica saturada. Com esses sinais, foi possível sugerir que o composto produzido poderia ser uma mistura de ésteres graxos.

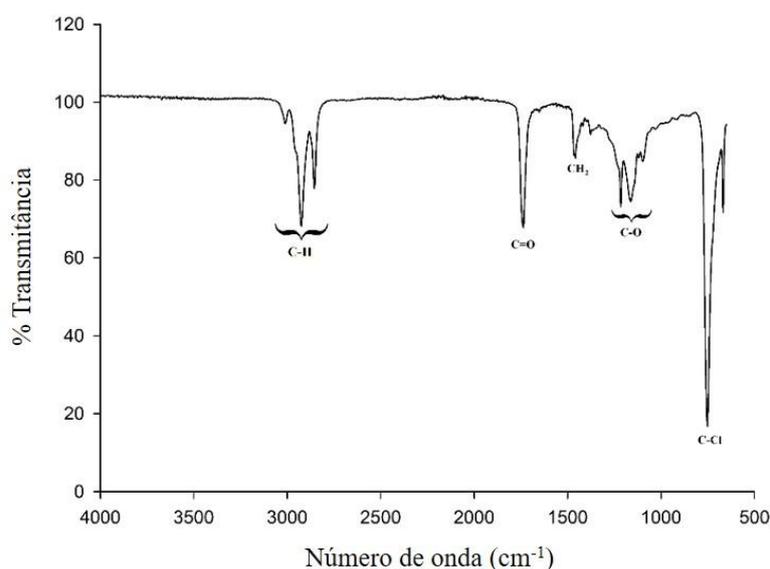


Fig. 10 Espectro de FTIR obtido para o BSPP produzido pelo fungo endofítico *T. asperellum*

4. Conclusão

A produção em meio de cultivo submerso de biossurfactantes pelo fungo *T. asperellum* CBS 433.97 isolado de videiras (*Vitis vinifera* L.) foi alcançada em três dias de cultivo. O uso de fontes mais baratas, como a ureia e o óleo vegetal de milho, bem como a concentração dessas fontes testadas, desempenhou um papel importante na produção de biossurfactantes por microrganismos. O biossurfactante bruto (BSB) apresentou efetiva ação antibacteriana frente *S. aureus* ATCC 13565. O biossurfactante parcialmente purificado (BSPP) foi caracterizado como uma mistura de ésteres graxos. Por fim, o *T. asperellum* CBS 433.97 apresentou-se como um

potencial fungo endofítico na produção de biossurfactantes, o que pode ser uma alternativa aos surfactantes sintéticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia- UESB, pelo suporte das análises.

Conflito de interesse

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

Referências

Aamir, S., Sutar, S., Singh, S.K., & Baghela, A. (2015) A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine*, **5**:74–81. <https://doi.org/10.5943/ppq/5/2/6>

Ali, K., Maltese, F., Zyprian, E., Rex, M., Choi, Y.H., & Verpoorte, R. (2009) NMR metabolic fingerprinting based identification of grapevine metabolites associated with downy mildew resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**:9599–9606. <https://doi.org/10.1021/jf902069f>

Anjum, F., Gautam, G., Edgard, G., & Negi, S. (2016) Biosurfactant production through *Bacillus sp.* MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource Technology*, **213**:262–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.091>

Arun, A., & Eyini, M. (2011) Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. *Bioresource Technology*, **102**:8063-8070. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.077>

Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R., & Tótola, M.R. (2006) Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, **97**:868–875. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.020>

Bhange, K., Chaturvedi, V., & Bhatt, R. (2016) Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. *Biotechnology Reports*, **10**:94–104. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.007>

Bodour, A.A., & Miller-Maier, R.M. (1998) Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, **32**: 273–280. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00031-1)

Bordoloi, N.K., & Konwar, B.K. (2008) Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **63**:73–82. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.11.006>

Castro, A., Silva, J., & Teixeira, P. (2018) Chapter 8 - Staphylococcus aureus, a Food Pathogen: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. Handbook of Food Bioengineering. *Foodborne Diseases*, **15**:213-238.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention, 2014. E.coli Homepage. <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>. (accessed 10 January 2020).

Colla, L.M., Rizzardi, J., Pinto, M.H., Reinehr, C.O., Bertolin, T.E., & Costa, J.A.V. (2010) Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, **101**:8308–8314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.086>

Cooper, D.G., MacDonald, C.R.S., Duff, J.B., & Kosaric, N. (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. *Applied and Environmental Microbiology*, **42**:408–412.

Coronel-León, J., Marqués, A.M., Bastida, J., & Manresa, A. (2015) Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *Journal of Applied Microbiology*, **120**:99–111. <https://doi.org/10.1111/jam.12992>

Cortés, S. A. D. J., & Mosqueda, O. T. (2013) Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Revista Química Viva*, 64- 90.

Das, K., & Mukherjee, A.K. (2007) Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, **98**:1339–1345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.032>

Elshikh, M., Funston, S., Chebbi, A., Ahmed, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2017) Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. *New Biotechnology*, **36**:26-36. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.009>

Faria, N.T., Marques, S., Fonseca, C., & Ferreira, F.C. (2015) Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048. *Enzyme and Microbial Technology*, **71**:58-65. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.10.008>

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**:497-509.

Gudiña, E.J., Teixeira, J.A., & Rodrigues, L.R. (2010) Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **76**:298–304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.008>

Gudiña, E.J., Rangarajan, V., Sem, R., & Rodrigues, L.R. (2013) Review: Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends in Pharmacological Sciences*, **34**:667-675. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.002>

Hall, T.A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**:95-98.

Kanmani, P., Kumar, R.S., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2013) Probiotics and Its Functionally Valuable Products-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **53**:641-658. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.553752>

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**:111–120.

Kiran, G.S., Hema, T.A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T.A., Ravji, R.T., & Natarajaseenivasan, K. (2009) Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **73**:250–256. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.05.025>

Kiran, S.G., Thomas, A.T., Selvin, J., Sabarathnam, B., & Lipton, A.P. (2010) Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresource Technology*, **101**:2389–2396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.023>

Kitamoto, D., Isoda, H., Nakahara, T. (2002) Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94**:187-201.

Koneman, E.W., et al. (2001) A função do laboratório de microbiologia no diagnóstico de doenças infecciosas: indicações para prática e manejo. In: KONEMAN, E.W. et al. *Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido*. 5 ed. São Paulo: Medsi, cap.2, p.69-176.

Liu, J., Yuan, X., Zeng, G., Shi, J., & Chen, S. (2006) Effect of biosurfactant on cellulose and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, **41**:2347- 2351. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.014>

Luna, J.M.D., Rufino, R.; Sarubbo, L.A., & Campos-Takaki, G.B. (2013) Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **102**:202–209. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.008>

Makkar, R.S., & Cameotra, S.S. (1997) Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74**:887–889. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0233-7>

Marin, C.P., Kaschuk, J.J., Frollini, E., & Nitschke, M. (2015) Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. *Industrial Crops and Products*, **66**:239–245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.001>

Markande, A.R., Acharya, S.R., & Nerurkar, A.S. (2013) Physicochemical characterization of thermostable glycoprotein bioemulsifier from *Solibacillus silvestris* AM1. *Process Biochemistry*, **48**:1800–1808. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.017>

Meneses, D.P., Gudiña, E.J., Fernandes, F., Gonçalves, L.R.B., Rodrigues, L.R., & Rodrigues, S. (2017) The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. *Microbiological Research*, **204**:40–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.07.004>

Moricca, S., Ginetti, B., & Ragazzi A. (2012) Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. *Phytopathologia Mediterranea*, **51**:587–598. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-11705

Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000) A Study on the structure–function relationship of lipopeptides biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1488**:211–218. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00124-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00124-4)

Nitschke, M., & Costa, S.G.V.A.O. (2007) Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, **18**:252–259. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>

Oliveira, J.G., & Garcia-Cruz, C.H. (2013) Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56**:155–160. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100020>

Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., & Singh, S.C. (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**:633-654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>

Paraszkiewicz, K., Kanwal, A., & Dlugonski, J. (2002) Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology*, **92**:287-294. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00376-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00376-5)

Pereira, A. A., Cardoso, M.G., Abreu, L.R., Morais, A.R., Guimarães, L.G.L., & Salgado, A.P.S.P. (2008) Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, *Ciência e Agrotecnologia*, **32**:887-893. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000300028>

Rabiei, A., Sharifinik, M., Niazi, A., Hashemi, A., & Ayatollahi, S. (2013) Core flooding tests to investigate the effects of IFT reduction and wettability alteration on oil recovery during MEOR process in an Iranian oil reservoir. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**:5979–5991. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4863-4>

Ramírez, I.M., Tsaousi, K., Rudden, M., Marchant, R., Alameda, E.J., Román, M. G., & Banat, I. M. (2015) Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresource Technology*, **198**:231–236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.012>

Sachdev, D.P., & Cameotra, S.S. (2013) Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**:1005-1016. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>

Saikkonen, K. (2007) Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*, **21**:67–74. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.001>

Saitou, N., & Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**:406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Samuels, G.J., Lieckfeldt, E., & Nirenberg, H.I. (1999) *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*, **51**:71–88.

Santos, D.K.F., Brandão, Y.B., Rufino, R.D., Luna, J.M., Salgueiro, A.A., Santos, V.A., & Sarubbo, L.A. (2014) Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **3**:48–57. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.004>

Santos, A.S., Pereira, N.J., & Freire, D.M. (2016) Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *PeerJ*, **4**:1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.2078>

Shekhar, S., Sundaramanickam, A., & Balasubramanian, T. (2015) Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **45**:1522–1544. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955631>

Silva, L.A.F. (2019) Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinífera*) com potencial para produção de pigmentos. Tese Doutorado, UESB.

Sleiman, J.N., Kohlhoff, S.A., Roblin, P.M., Wallner, S., Gross, R., Hammerschlag, M.R., Zenilman, M.E., & Bluth, M.H. (2009) Sophorolipids as antibacterial agents. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, **39**:60–63.

Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C., & Oliveira, R.P.D.S. (2014) Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **89**:88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D.G. (1997) The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**:4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

Uad, I., Silva-Castro, G.A., Pozo, C., Gonzalez-Lopez, J., & Calvo, C. (2010) Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediment and fuel extracted at 4000 m of depth Prestige wreck. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **64**:511–518. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.005>

Unás, J.H., Santos, D.A., Azevedo, E.B., & Nitschke, M. (2018) *Brevibacterium luteolum* biosurfactant: Production and structural characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **13**:160–167. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.005>

Varjani, S.J., Rana, D.P., Bateja, S., Sharma, M.C., & Upasani, V.N. (2014) Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, **3**:9205–9213.

Varjani, S.J., & Upasani, V.N. (2017) Review: Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*, **232**:389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>

Wei, Y., Chou, C., & Chang, J. (2005) Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, **27**:46–154. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.028>

Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, M., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M. (2014) *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, **8**:71-126. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010071>

Wu, J.-Y., Yeh, K.-L., Lu, W.-B., Lin, C.-L., & Chang, J.-S. (2008) Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Technology*, **99**:1157–1164. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.026>

Yan, P., Lu, M., Yang, Q., Zhang, H., Zhang, Z., & Chen, R. (2012) Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*. *Bioresource Technology*, **116**: 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.024>

Zhao, F., Zhou, J.-D., Ma, F., Shi, R.-J., Han, S.-Q., Zhang, J., & Zhang, Y. (2016) Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H₂S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl: applications for microbial enhanced oil recovery. *Bioresource Technology*, **207**:24–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.126>

CAPÍTULO II

Artigo 2

Revista: Bioresource Technology

INSS: 0960-8524

Otimização da produção e caracterização química e estrutural do biossurfactante produzido por *Trichoderma asperellum* CBS 433.97

Qualis Capes: A1 (área- Ciência de alimentos)

Fator de impacto: 6,669

Otimização da produção e caracterização química e estrutural do biossurfactante produzido por *Trichoderma asperellum* CBS 433.97

Production optimization and chemical and structural characterization of the biosurfactant produced by *Trichoderma asperellum* CBS 433.97

Mariana Ferreira Alves^a, Daniel Florêncio Filho^a, Leandro Soares Santos^b, Renata Cristina Ferreira Bonomo^b, Djalma Menezes Oliveira^c, Danilo Junqueira Leão^d, Silmara Almeida de Carvalho^d

^aLaboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia, Centro de Pesquisa em Química, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Brasil.

^bDepartamento de Tecnologia Rural e Animal, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Brasil.

^cDepartamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, Brasil.

^dDepartamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Brasil.

*Autor correspondente

Silmara Almeida de Carvalho

Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, BR 415, CEP: 45700-000, Itapetinga, Brasil.

Tel.: +55 77 3261-8687

E-mail address: scarvalho@uesb.edu.br

Resumo:

Os compostos microbianos que apresentam atividade superficial são denominados como agentes tensoativos microbianos ou biossurfactantes. Neste estudo, o fungo endofítico *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 foi utilizado na produção do biossurfactante. Foram avaliados os efeitos das fontes de carbono (C) e nitrogênio (N) sobre as variáveis respostas: porcentagem da redução da tensão superficial, índice de emulsificação e estabilidade e espalhamento do óleo, aplicando planejamento experimental de Doehlert, expressos por Resposta Múltipla (RM). A concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante (BSPP) foi determinada por meio da medida da tensão superficial. Com o intuito de elucidar a estrutura desse tensoativo foi realizada a caracterização química e estrutural. Foi avaliada a toxicidade

do BSPP e sua aplicação em uma matriz alimentícia. Como resultados, a utilização da matriz Doehlert e da MSR foram ótimas ferramentas estatísticas na otimização da produção do BSPP. O modelo encontrado foi bem ajustado, pois o R-sqr (0,99) foi próximo de 1 e foi também validado, confirmando a sua autenticidade e confiabilidade. O valor da CMC foi 1400 mg.L⁻¹. O BSPP foi caracterizado e identificado como sendo uma mistura complexa formada por ácidos graxos saturados e insaturados. Apresentou baixa toxicidade e foi eficiente na emulsificação de uma matriz alimentícia. Portanto, o biossurfactante produzido pelo fungo *T. asperellum* CBS 433.97 apresenta-se como promissor para uma possível aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: ácidos graxos, biossurfactante, emulsificação, matriz Doehlert, *Trichoderma asperellum*.

Abstract:

Microbial compounds which exhibit surface activity are referred to as microbial surfactants or biosurfactants. In this study, the endophytic fungus *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 was used in the production of the biosurfactant. The effects of carbon (C) and nitrogen (N) sources on the response variables were evaluated: percentage of reduction in surface tension, emulsification index and oil spreading and stability, using Doehlert experimental planning, expressed as Multiple Response (MR). The critical micellar concentration (CMC) of biosurfactant (PPBS) was determined by measuring the surface tension. In order to elucidate the structure of this surfactant, chemical and structural characterization was carried out. PPBS toxicity and its application in a food matrix were evaluated. As a result, the use of the Doehlert matrix and the MSR were great statistical tools in the optimization of the PPBS production. The model found was well adjusted, as the R-sqr (0.99) was close to 1 and validated, confirming its authenticity and reliability. The CMC value was 1400 mg.L⁻¹. PPBS was characterized and identified as a complex mixture formed by saturated and unsaturated fatty acids. It presented low toxicity and was efficient in the emulsification of a food matrix. Therefore, the biosurfactant produced by the fungus *T. asperellum* CBS 433.97 presents itself as promising for a possible application in the food industry.

Key-words: biosurfactant, Doehlert matrix, emulsification, fatty acids, *Trichoderma asperellum*.

1. Introdução

Os surfactantes de origem microbiana, conhecidos como biossurfactantes, são eficientes em processos de detergência, emulsificação, formação de espuma e umectação (Banat et al., 2010), além de apresentarem capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre sólidos e líquidos.

Os biossurfactantes podem ser classificados em glicolípidos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolípidos, poliméricos e ácidos graxos. No grupo dos ácidos graxos, a sua estrutura é formada por grupo carboxila ($-\text{COOH}$), conhecido como grupo cabeça-polar, porção hidrofílica, ligado a uma longa cadeia alquílica, saturada ou insaturada, correspondente à porção hidrofóbica, conhecida como cauda. As combinações de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na sua estrutura promovem a função surfactante da molécula. Os biossurfactantes têm propriedades estruturais específicas que são importantes para a sua aplicação em diversas áreas industriais, como na agricultura, indústria de alimentos, produtos cosméticos, produtos farmacêuticos e biorremediação. (Souza et al., 2014; Zhao et al., 2016). Por ter uma vasta aplicação, é importante avaliar o nível de toxicidade dessas substâncias para prever sua utilização (Nalini e Parthasarathi, 2014). Algumas técnicas de purificação e análise estão disponíveis para a sua caracterização estrutural. Métodos analíticos cromatográficos e/ou espectrométricos de simples a sofisticados são empregados nesta caracterização, por exemplo, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), CG acoplada com espectrômetro de massa, cromatografia líquida (CL) acoplada com espectrômetro de massa, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN).

Pelas suas propriedades, os biossurfactantes poderiam substituir os surfactantes químicos em muitas aplicações industriais, principalmente por serem menos tóxicos (Pereira et al., 2013). No entanto, a sua produção industrial e comercialização em grande escala são limitadas pelo alto preço dos meios de cultura utilizados para sua síntese e pela baixa eficiência de seus processos (Varjani e Upsani, 2017). A composição do meio de cultura influencia diretamente na produção do biossurfactante, principalmente as fontes de carbono e nitrogênio (Santos et al., 2016). A etapa de otimização na produção desses compostos merece ser explorada para que se tenha um custo mais baixo no final do processo. Para isso, a aplicação de ferramentas estatísticas, como a metodologia de superfície de resposta (MSR) e planejamentos experimentais como, planejamento composto central rotacional (CCR), matriz Doehlert e planejamento Box-Behnken são muito utilizados na otimização de processos (Novaes et al., 2017).

A MSR é bem aplicada, devido a sua alta eficiência, poder de modelagem e a capacidade de quantificar e interpretar as relações entre as respostas e os efeitos dos fatores. Tem sido empregada com sucesso na otimização da composição e condições do meio de cultura para maximizar a produção do biossurfactante (Santos et al., 2014; Coronel-Leon et al., 2015; Bhangue et al., 2016)

Entre os planejamentos experimentais, o planejamento CCR é o mais frequentemente utilizado quando se estuda a produção do biossurfactante (Souza et al., 2018). No entanto, no artigo 1, foi possível observar que o planejamento CCR não foi suficiente para identificar o ponto ótimo das variáveis estudadas. Na tentativa de otimizar os parâmetros que influenciam na produção do tensoativo produzido por fungo endofítico, foi empregada a matriz Doehlert, que não é rotacional como em outros planejamentos, por exemplo, no CCR, porém é altamente eficiente e não há necessidade de vários pontos experimentais (Novaes et al., 2017). Uma abordagem para resolver o problema da otimização de várias respostas é o uso da técnica de Resposta Múltipla (RM). Esta técnica é aplicada quando os valores de cada resposta estiverem localizados em regiões diferentes o que dificulta encontrar as condições que satisfaçam simultaneamente todas as respostas (Bezerra et al., 2008). Por isso, a RM torna-se essencial na otimização da produção do biossurfactante produzido por *T. asperellum* CBS 433.97.

O gênero *Trichoderma* tem sido amplamente estudado, devido às propriedades que suas espécies apresentam, por exemplo, resistência a alguns patógenos vegetais, promove crescimento das plantas, como também contribui para atividade fotossintética das plantas (Shoresh et al., 2010). Entre estas espécies, o *T. asperellum* se destaca por ser um potencial agente utilizado no biocontrole de vários patógenos (Wu et al., 2017). A utilização desse microrganismo na produção de biossurfactante contribui para aprimorar a obtenção desses compostos provenientes de novas fontes de fungos endofíticos.

Assim, o presente trabalho visou estudar a caracterização estrutural do biossurfactante produzido fungo endofítico *T. asperellum* CBS 433.97, seguida da otimização das condições do processo para atingir a máxima produção e sua aplicação.

2. Materiais e métodos

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentosso endofítico *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 isolado a partir de videiras (*Vitis vinifera* L.) provenientes da coleção de Cultura de Fungos Endofíticos do LPNBio, (Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Esse microrganismo foi preservado em sílica

estéril e utilizado para inoculação em tubos slant com ágar batata dextrose (PDA). Os tubos foram incubados por 7 dias à 25°C.

2.2. Preparação do inóculo e fermentação submersa para a produção do biossurfactante

Foi preparada uma suspensão de esporos contendo 10^7 esporos.mL⁻¹, preparada usando câmara de Neubauer para contagem dos esporos, para ser utilizada na fermentação submersa estacionária. Para a produção do biossurfactante, um volume de 10 mL de suspensão de esporos foi inoculado em frascos Erlenmeyers (125 mL), contendo 50 mL de meio previamente esterilizados e pH ajustado para $6,2 \pm 0,3$, composto por: óleo vegetal de milho 10 g.L⁻¹; CH₄N₂O 20 g.L⁻¹; NaCl 5 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 1,0 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,5 g.L⁻¹. As fermentações foram realizadas à temperatura de 25°C, de forma estática, durante 3 dias. Após esse período, a cultura fermentada foi filtrada e centrifugado a 3000 g por 5 min. O extrato fermentado foi considerado uma fonte de biossurfactante bruto (BSB).

2.3. Otimização das fontes de carbono e nitrogênio utilizando a metodologia de superfície de resposta e matriz Doehlert

Uma matriz Doehlert de 9 corridas experimentais com 3 repetições no ponto central foi aplicada para otimizar a produção do biossurfactante. As concentrações da fonte de carbono (óleo vegetal de milho) e da fonte de nitrogênio (ureia) no meio de produção foram selecionadas como as variáveis independentes e foi avaliado a tensão superficial pelo método do deslocamento do anel de Du Nouy (tensiômetro) (Bodour e Miller-Maier, 1998), seguida do cálculo da porcentagem de redução da tensão superficial (%TS) (Equação 1), índice de espalhamento do óleo (EO) (Morikawa et al., 2000) e índice de emulsificação e estabilidade (IE%) (Equação 2) (Cooper et al., 1981) como respostas.

$$\%TS = \frac{\Delta TS}{TS_{ini}} \times 100 \quad (1)$$

Onde TS é a porcentagem de redução da tensão superficial (%); ΔTS é a diferença entre a tensão superficial final e inicial (mN.m⁻¹); TS_{ini} é a tensão da amostra inicial (mN.m⁻¹).

$$IE(\%) = \frac{\textit{altura total da camada emulsionada}}{\textit{altura total da camada líquida}} \times 100 \quad (2)$$

As variáveis independentes e seus níveis são apresentados na Tabela 1. Os experimentos foram conduzidos para fermentação submersa conforme descrito no tópico 2.2. O meio de cultura fermentado foi considerado uma fonte de biossurfactante bruto (BSB) e empregado na análise das variáveis respostas.

Tabela 1 Fatores da matriz Doehlert e as faixas de variação de acordo com os níveis experimentais.

Fatores	Níveis				
	-1	-0,5	0	0,5	1
Óleo vegetal de milho (C) (g.L ⁻¹)	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0
	Níveis				
		- 0,866	0	+ 0,866	
Ureia (N) (g.L ⁻¹)		10	20	30	

Os dados experimentais foram analisados utilizando o pacote de software estatístico *Statistical Analysis System*® versão 9.0. Os resultados foram avaliados pela metodologia de superfície de resposta (MSR), construindo modelos estatísticos para definir as respostas previstas em termos dos fatores independentes. A significância estatística dos efeitos das variáveis estudadas foram avaliadas por gráficos de Pareto, onde a linha vertical (vermelha) indica a magnitude mínima dos efeitos estatisticamente significativos (nível de significância de 10%). Superfícies de resposta e linhas de contorno foram geradas para ilustrar o efeito individual e combinatório dos fatores avaliados nas respostas. A etapa de otimização foi utilizada com o propósito de prever a concentração ótima de cada fonte para uma resposta máxima. Os modelos foram validados por meio de novas corridas experimentais sugerida durante a otimização do modelo.

2.4. Extração e purificação parcial do Biossurfactante

Após 3 dias de fermentação, o biossurfactante foi extraído de acordo com a metodologia de Folch (Folch et al., 1957). Uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1) foi adicionada à amostra de BSB. Após a homogeneização da mistura por 30 min, a fase orgânica foi recuperada usando um funil de separação após repouso por 15 min. Posteriormente as amostras foram evaporadas usando um evaporador rotativo a 40°C por 40 min. O biossurfactante então parcialmente purificado (BSPP) foi armazenado no congelador para posterior caracterização.

2.5. Análise de pureza por HPLC

Uma amostra do BSPP foi diluído em 1 mL da fase móvel metanol e filtrado através de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (marca MN, Alemanha) com diâmetro do poro de 0,45 μm e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD). Para análise das amostras, foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com um sistema quaternário de bombas, degaseificador, válvula de injeção com alça de mostragem de 20 μL , forno de coluna e detector de arranjo de diodos.

A coluna utilizada foi uma coluna analítica de fase reversa C18 (15 cm x 4,6 mm di x 5m), marca Shimadzu. Os parâmetros de funcionamento do cromatógrafo foram estabelecidos após verificação da condição de melhor resolução, sendo o fluxo ajustado para 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a temperatura do forno de 35°C e o tempo de corrida de 42 minutos. A fase móvel foi composta por um gradiente de água acidificada com ácido acético 5% (v/v) denominado solvente A e, metanol denominado solvente B, onde variou-se de 5% do solvente A atingindo 100% de solvente B aos 30 minutos, permanecendo nessa condição por 5 minutos, e finalizando a corrida, com a mesma condição inicial, aos 42 minutos.

As injeções foram realizadas em duplicata e as áreas dos picos dos biossurfactantes foram determinadas através do software LCSolution®.

A purificação do biossurfactante foi realizada por meio da análise dos picos apresentados no cromatograma, decompondo-os em 3 grupos para que pudesse ser feita a coleta das frações a fim de conhecer a concentração real do BSPP. Assim, outras corridas para a coleta das frações foram executadas para posterior análise da tensão superficial e verificado em qual grupo o BSPP estava presente. Foi feito cálculo da porcentagem de redução da tensão superficial (TS%) das frações em relação a tensão da amostra controle (fração da corrida sem o BSPP) ($T_{\text{cont}} = 31,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

2.6. Tensão superficial e determinação da concentração crítica de micelas (CMC) do biossurfactante

A CMC foi determinada medindo a tensão superficial pelo método do anel de Du Nuoy (Bodour e Miller-Maier, 1998) a 25°C em triplicata, variando o BSPP em concentrações de 5 a 1800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ até um valor constante. O valor da CMC foi obtido a partir do gráfico da tensão superficial contra a concentração do biossurfactante.

2.7. Caracterização química e estrutural do biossurfactante

2.7.1 Análise FTIR

A análise FTIR foi realizada para identificar as ligações químicas, os grupos funcionais e os componentes do BSPP. Foi utilizado o espectrômetro FTIR- Infravermelho médio Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), equipado com célula de reflectância total atenuada (Attenuated Total Reflectance - ATR) e detector de sulfato de triglicina deuterado (Deuterated Triglycine Sulfate - DTGS). O BSPP foi colocado sobre o compartimento do acessório onde incidem os raios na faixa do infravermelho (cristal de diamante), sendo obtidos os espectros no modo de transmitância, com uma região espectral de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} , apodização triangular e 64 varreduras para cada espectro. Todos os espectros foram recolhidos com uma resolução de 4 cm^{-1} a temperatura ambiente e analisados pelo software Agilent MicroLab PC.

2.7.2 Análise de ésteres por Cromatografia gasosa (CG-DIC) e (CG-EM)

Foi realizada a análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos do BSPP, conforme procedimento descrito por Bannon et al. (1982), com modificações descritas por Simionato et al. (2010), utilizando como padrão interno o ácido tricosanóico (23:0).

Os ésteres de ácidos graxos foram analisados por um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2010 Plus, equipado com Detector de Ionização de Chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida Rt-2560 (100m, 0,25mm d.i). As vazões dos gases (White Martins) foram de $40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o gás de arraste (H_2); $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o gás auxiliar (N_2) e $4.000\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o ar sintético da chama. As áreas dos picos dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinadas através do software LCSolution®. A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (*FAME - Fatty Acids Methyl Esters*) foi realizada por comparação de tempo de retenção dos constituintes da amostra, com uma mistura de 37 padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (189-19 Sigma, EUA) e por comparação com os tempos de retenção com os ésteres metílicos de padrões contendo os isômeros geométricos c9t11 e t10c12 do ácido linoléico (O-5632 Sigma, EUA).

Já a análise de CG-EM foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu modelo QP2010-SE, contendo uma coluna de baixa polaridade SLB5MS (30 m x 0,32 mm diâmetro interno e 0,32 μm de espessura do filme) e carreador de gás hélio com fluxo de $1,80\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o injetor e o detector estavam a $220\text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura inicial da coluna foi programada a 40°C , mantida 2 minutos, chegando a 240°C

a uma taxa de 5min. a 3°C.min⁻¹, modo de injeção Split 1:20, fluxo de purga 3,0 mL.min⁻¹. Foi utilizado o mesmo procedimento de esterificação do CG-DIC e o padrão interno 23:0. A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por comparação em massa com os compostos da biblioteca de equipamentos.

2.7.3 Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C (RMN de ¹H e ¹³C)

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos em Espectrômetro Varian Inova 500 de 11,5 Tesla, operando na frequência de 500 MHz para o hidrogênio e 125MHz para o carbono, a uma temperatura de 25°C. Clorofórmio deuterado (CDCl₃) foi o solvente utilizado na dissolução das amostras para a obtenção dos espectros e o sinal residual do tetrametilsilano (TMS) foi usado na calibração dos espectros. Os deslocamentos químicos (δ) foram dados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Esta análise foi realizada no Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal da Bahia (LABAREM-UFBA).

2.8. Citotoxicidade contra *Artemia salina* como indicador

O bioensaio com *Artemia salina* L. foi realizado baseado na metodologia descrita por Meyer et al. (1982). Cada tubo de ensaio continha 5 mL da solução salina (água do mar 1: 1 e água destilada) mais concentrações variadas do BSPP (0 a 10000 mg.L⁻¹) e dez náuplio. Após 24 horas, a contagem numérica de larvas mortas foi realizada e foi feito o cálculo do LD50 (dose necessária para matar 50% da população *A. salina* L.) pelo método de regressão linear. Os critérios para classificar a citotoxicidade do BSPP contra *Artemia salina* L. com base nos valores encontrados para LD50 foram definidos por Meyer et al. (1982) e Nguta et al. (2012), nos quais os valores de LD50 > 1000 mg.L⁻¹ são considerados não tóxicos, aqueles entre 500 e 1000 mg.L⁻¹ são levemente tóxicos, aqueles entre 100 e 500 mg.L⁻¹ são moderadamente tóxicos e aqueles <100 mg.L⁻¹ como fortemente tóxico. Os testes foram realizados em quintuplicata.

2.9. Ensaio de fitotoxicidade

A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada em um bioensaio com sementes de *Lactuca sativa* (alface) (Dos Reis –Gorny e Durrant, 2003). Soluções do BSPP foram preparadas com água destilada nas concentrações 10000 mg.L⁻¹, 5000, 1500, 100 e 10 mg.L⁻¹. Para cada concentração foram utilizadas 50 sementes, em triplicata, colocadas em placas de Petri sobre discos de papel filtro esterilizados. Foram utilizados 2 mL de cada amostra para

embeber os discos de papel filtro. Após 48 horas de incubação no escuro à temperatura ambiente, foi avaliado o tamanho das raízes germinadas com auxílio de papel milimetrado. A água destilada foi utilizada como controle. A toxicidade foi obtida da seguinte forma (Equação 3):

$$\% \text{ efeito fitotóxico} = \frac{\text{comprimento médio controle} - \text{comprimento médio amostra}}{\text{comprimento médio controle}} \times 100 \quad (3)$$

2.10. Aplicação do Biossurfactante em uma matriz alimentícia emulsionada

Foram realizados ensaios para avaliar o potencial de aplicação do biossurfactante frente a outros emulsificantes, testados em uma matriz alimentícia que simulava um molho de salada do tipo Grego, contendo suco de limão e azeite extra-virgem (1:1 vol). Foram preparadas sete amostras com diferentes concentrações de maltodextrina, goma xantana e do BSPP, conforme resumido na Tabela 2. Os componentes foram homogeneizados em ultra turrax à 9400 g por 1 min para se obter a emulsão. Foi verificada a formação de emulsão para cada amostra e calculado o índice de emulsificação e estabilidade (IE%) (Santana et al., 2015; Silva et al., 2016).

Tabela 2 Emulsificantes utilizados na composição das emulsões azeite de oliva - suco de limão (1:1).

Ensaios	Emulsificantes
A	1,0 % Maltodextrina + 0,6 % Goma Xantana
B	1,0 % Maltodextrina
C	1,0 % Maltodextrina + 0,1 % BSPP
D	0,6 % Goma Xantana
E	0,6 % Goma Xantana + 0,1 % BSPP
F	0,1 % BSPP
G	1,0 % BSPP

3.Resultados e Discussão

3.1. Otimização da produção do biossurfactante

O planejamento por matriz Dohlert e a metodologia de superfície de resposta foram aplicados para investigar a condição otimizada das fontes de carbono (C) e nitrogênio (N)

empregadas na produção do biossurfactante, avaliando a interação entre as variáveis independentes e os resultados ótimos que maximizem a produção. A matriz do projeto (9 experimentos) e os resultados correspondentes dos experimentos da MSR são apresentados na Tabela 3. A resposta dos ensaios foi avaliada em termos da soma de todos os resultados com base no procedimento matemático conhecido como otimização de respostas múltiplas (RM), que permite que a resposta seja obtida como um resultado da combinação das respostas individuais (Camino et al., 2001). Dessa forma ocorre a otimização simultânea das várias respostas, possibilitando encontrar a melhor condição experimental para todas as variáveis.

Tabela 3 Matriz Doehlert da concentração dos fatores, resultados dos ensaios experimentais e somatório dos resultados (resposta múltipla – RM).

Ensaio s	C (g.L ⁻¹)	N (g.L ⁻¹)	Tensão super- ficial (%)	Espalhamento do óleo (cm)	Índice de emulsificação (%)	RM
1	10 (0)	20 (0)	30,75	3,0	30,43	64,18
2	10 (0)	20 (0)	30,75	3,0	29,27	63,02
3	10 (0)	20 (0)	29,06	3,1	30,11	62,27
4	15,0 (1)	20 (0)	3,85	3,6	27,27	34,72
5	12,5 (0,5)	30 (0,866)	2,70	1,5	26,27	30,47
6	5 (-1)	20 (0)	21,30	4,0	26,09	51,39
7	7,5 (-0,5)	10 (-0,866)	25,43	3,5	26,09	55,02
8	12,5 (0,5)	10 (0,866)	25,60	4,5	25,00	55,10
9	7,5 (-0,5)	30 (0,866)	22,33	3,0	27,27	52,60

Com a análise de regressão, verificou-se que a RM para todas as variáveis dependentes % TS, IE e EO foi significativa ($p < 0,1$). O gráfico de Pareto (Fig. 1) apresenta a influência da RM nos modelos testados, no qual foi observado que as fontes estudadas afetaram a produção do biossurfactante. Outros autores também relataram que as concentrações da fonte de carbono e nitrogênio afetam a produção do biossurfactante (Kiran et al., 2010; Liu et al., 2012).

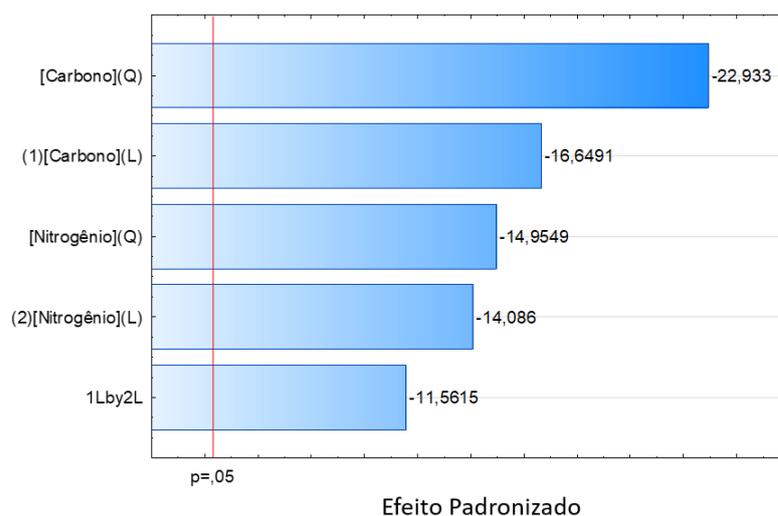


Fig. 1 Gráfico de Pareto dos modelos estatísticos para a RM das variáveis respostas, porcentagem da redução da tensão superficial – % TS, índice de emulsificação – IE e espalhamento do óleo – EO em função das variáveis estudadas, concentração da fonte de carbono - óleo vegetal de milho (Carbono - C) e concentração da fonte de nitrogênio - ureia (Nitrogênio - N).

Abaixo, tem-se a equação polinomial de segunda ordem que descreve a RM com base na concentração dos fatores significativos do meio. Os termos de menor grau foram incluídos quando necessário.

$$RM = -69,0180 + 18,6790C - 0,8042C^2 + 5,4775N - 0,0983N^2 - 0,2221C.N \quad (4)$$

Ao se tratar de microrganismos em que a variação dos dados é bem alta, é possível considerar valores próximos a 0,90 do coeficiente de determinação (R-sqr) como bom resultado. Os resultados encontrados aqui demonstraram uma boa similaridade entre os dados experimentais e os valores preditos pela equação ajustada, pois o coeficiente de determinação obtido da ANOVA para a RM foi 0,9942, valor este acima 0,90, indicando que 99,42% da variabilidade nas respostas foram explicadas pela equação de segunda ordem dada acima (Equação 4).

A Figura 2 apresenta o gráfico de superfície de resposta e de contorno, tendo-se a RM em função das variáveis estudadas (C e N). De acordo os resultados, a melhor condição do experimento ocorreu próximo ao ponto central.

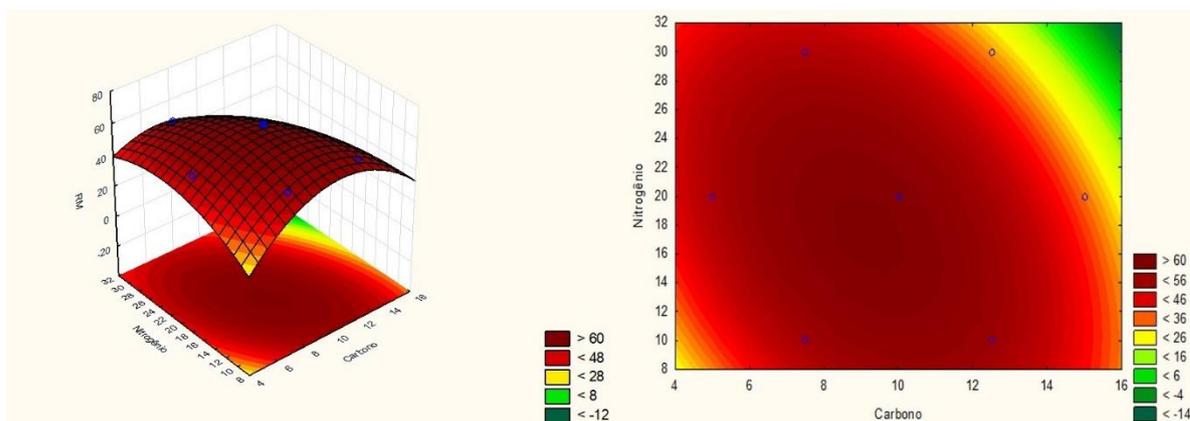


Fig. 2 Superfícies de resposta e as linhas de contorno para a variável resposta RM em função das variáveis estudadas, concentração da fonte de carbono - óleo vegetal de milho (Carbono - C) e concentração da fonte de nitrogênio - ureia (Nitrogênio - N).

A construção das superfícies de respostas permite estabelecer o ponto ótimo de cada fator independente. Mesmo se o comportamento das respostas estudadas apresentarem certa divergência, e ainda apresentarem uma região comum satisfatória para as respostas, as condições ótimas podem ser encontradas por superposição das superfícies geradas (Sivertsen et al., 2007).

Assim, os níveis ótimos da concentração de carbono ($C = 9,20 \text{ g.L}^{-1}$) e nitrogênio ($N = 17,46 \text{ g.L}^{-1}$) foram obtidos para a maximização da produção do biossurfactante. Em processos de otimização na produção de biossurfactantes, alguns autores (Kiran et al., 2010; Unás et al., 2018) relataram que utilizar concentração de nitrogênio superior à concentração de carbono foi melhor na produtividade do biossurfactante, o mesmo encontrado neste estudo. A utilização da matriz Doehlert neste trabalho foi uma ferramenta de otimização adequada e vantajosa, pois foi facilmente aplicada e necessitou de poucos ensaios experimentais para se avaliar os parâmetros que influenciaram na produção do biossurfactante. O modelo estatístico encontrado aqui foi validado nas condições descritas anteriormente, afim de se avaliar se o modelo descreve claramente o efeito das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactante. O valor teórico da RM fornecido pelo modelo foi de 64,69 e o valor experimental foi de 64,11, demonstrando assim que os valores experimentais estão de acordo com os valores preditos pelo modelo. Dessa forma, é possível analisar simultaneamente o efeito das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio na produção do biossurfactante utilizando RM. Juntamente com a matriz Doehlert e MSR, estas ferramentas contribuíram para o aprimoramento de estudos que visem otimizar a produção do biossurfactante.

3.2. Análise de pureza do BSPP

Por meio da cromatografia líquida, foi observado picos presente na amostra em estudo. Numa tentativa de purificar o biossurfactante, dividiu-se em três grupos os picos apresentados no cromatograma (Fig. 3). Foi realizada a coleta das frações de cada grupo e medida a tensão superficial em um tensiômetro, com a finalidade de avaliar a pureza do composto. Observou-se que os picos com maior intensidade apareceram no tempo de retenção de aproximadamente 30 e 37 mim, correspondendo aos grupos 2 e 3 respectivamente.

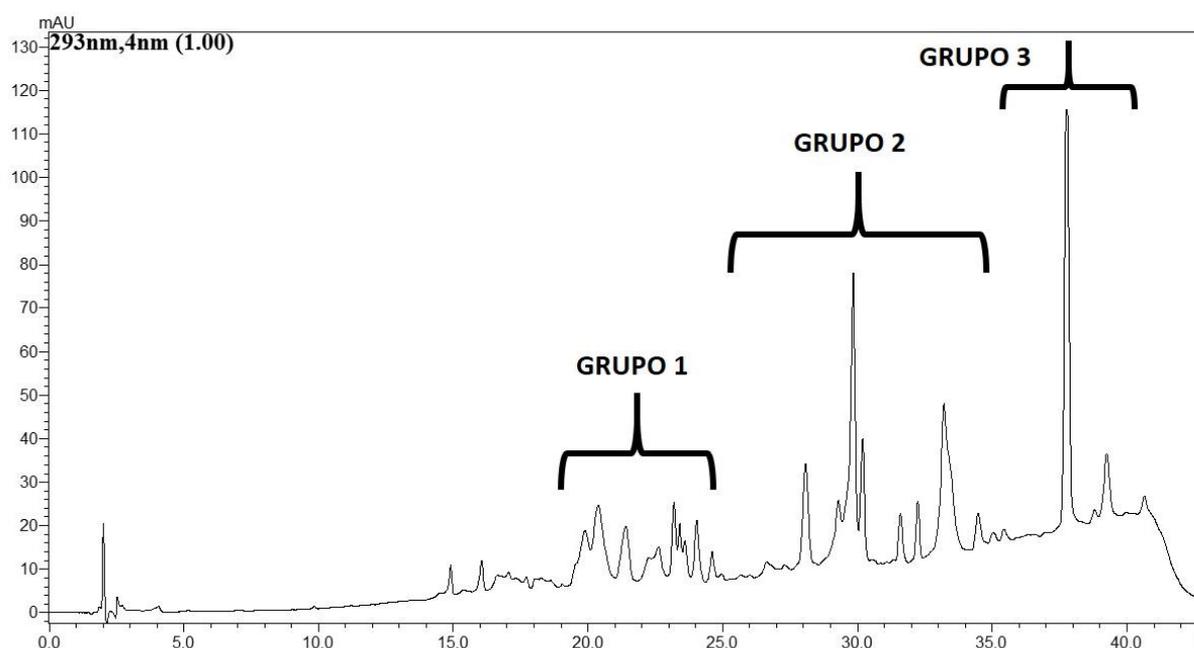


Fig. 3 Cromatograma CLAE obtido do BSPP produzido pelo fungo *Trichoderma asperellum* CBS 433.97.

Os resultados obtidos após a medida da tensão estão apresentados na Tabela 4, na qual foi possível observar que o grupo 2 apresentou maior porcentagem de redução da tensão superficial em relação a amostra controle. O grupo 3, que exibiu um pico com maior intensidade, apresentou redução da TS menor que o grupo 2 e maior do que o grupo 1. A diminuição da TS nas frações coletadas evidenciou a presença dos agentes tensoativos nos três grupos. A presença do biossurfactante reduziu a tensão superficial da amostra controle e apresentou um grau de pureza de 79%.

Tabela 4 Porcentagem de redução da tensão superficial das frações coletadas do BSPP.

Frações	TS (%)
Grupo 1	11,53
Grupo 2	21,79
Grupo 3	17,95

3.3. Concentração micelar crítica (CMC)

A concentração crítica de micelas (CMCs) do biossurfactante foi estabelecido pela relação entre a concentração de biossurfactante e a tensão superficial, mostrada na Fig. 4. Como pode ser visto na figura, há uma diminuição da tensão superficial com o aumento da concentração de biossurfactante, tornando-se estável em concentrações acima de 1400 mg.L⁻¹.

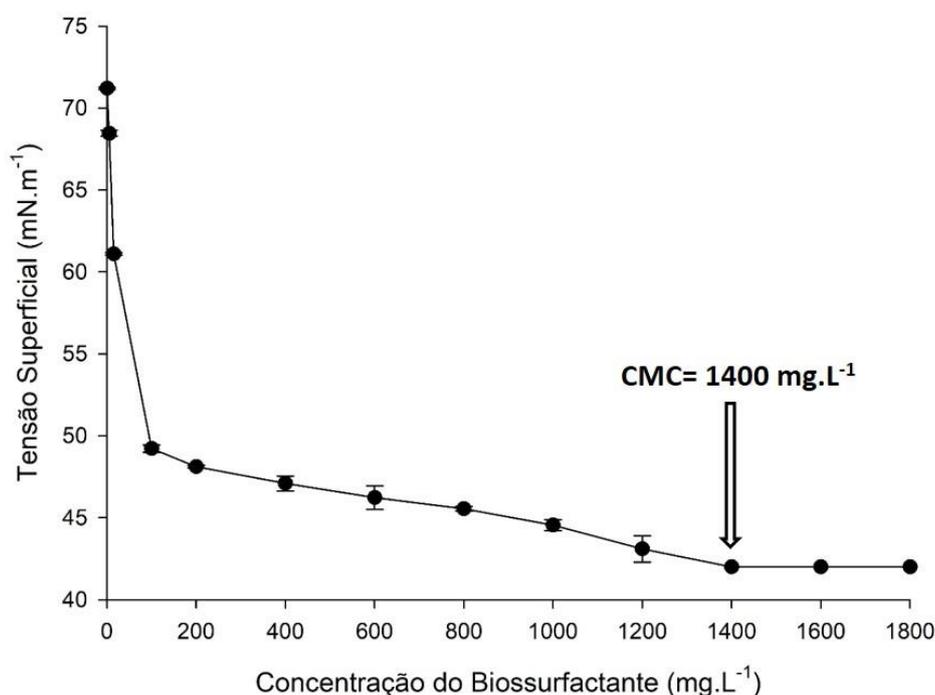


Fig. 4 Concentração micelar crítica (CMC) do BSPP. Os resultados representam a média de três medições independentes e as barras de erro representam desvios padrão dos valores médios.

Assim, esse valor pode ser considerado como o CMC para este biossurfactante. O CMC obtido para o biossurfactante está de acordo com os valores gerais encontrados na literatura, entre 64 mg.L⁻¹ e 2500 mg.L⁻¹ (Marin et al., 2015; Meneses et al., 2017; Oliveira e Garcia-Cruz, 2013). Portanto, com o aumento da concentração do biossurfactante, a tensão superficial foi reduzida até atingir o ponto da CMC. O conhecimento da CMC é importante para aplicação

tecnológica do biossurfactante, principalmente no que envolve a propriedade de emulsificação, pois a mesma é muito útil na indústria de alimentos, contribuindo na produção de queijos e sorvetes, melhorando a textura, cremosidade, consistência e estabilidade destes produtos.

3.4. Caracterização do biossurfactante

3.4.1 Análise FTIR

Uma variedade de técnicas foi empregada para avaliar a estrutura e a composição do BSPP. Por meio da análise FTIR (Fig. 5) foram observadas um sinal do solvente de diluição referente ao trecho C-Cl na região de 750 cm^{-1} e bandas fortes encontradas em 1090 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} , que se referem ao alongamento da ligação C-O de ésteres insaturados. Foi encontrada uma banda em 1470 cm^{-1} correspondente à deformação angular simétrica da ligação CH_2 da cadeia carbônica saturada. Uma banda intensa foi observada a 1750 cm^{-1} que corresponde ao alongamento da ligação C = O dos ésteres, reafirmando a presença do grupo éster a partir das bandas encontradas na região de 1090 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} . O espectro também mostrou um grupo de três bandas fortes em 2850 cm^{-1} , 2910 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} , as quais estão relacionadas ao alongamento simétrico e assimétrico das ligações C-H dos grupos CH_2 e CH_3 de cadeia carbônica saturada. Portanto foi possível sugerir que o composto produzido poderia ser uma mistura de ésteres graxos. Para tal comprovação, análises mais detalhadas foram realizadas a seguir.

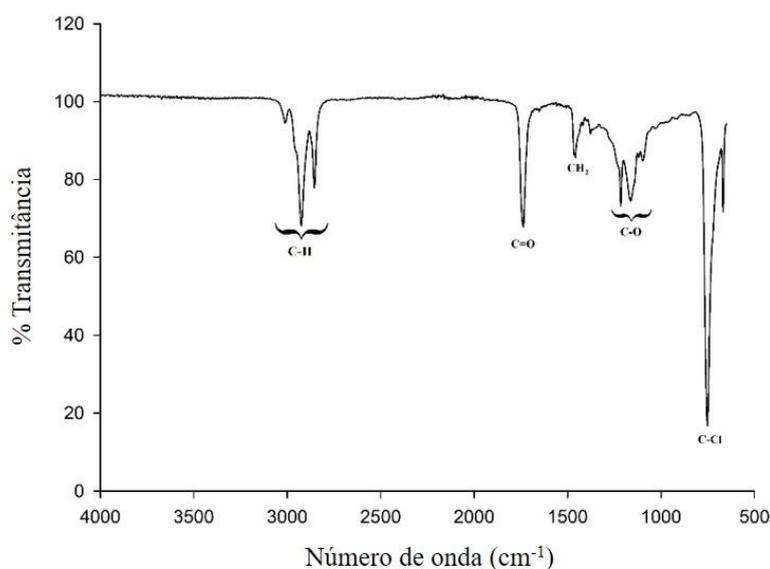


Fig. 5 Espectro de FTIR obtido para o BSPP produzido pelo fungo endofítico *T. asperellum*

3.4.2 Análise FAME obtida por CG-DIC do BSPP

Foram identificados por meio da CG-DIC seis picos atribuídos aos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), correspondendo aos ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1 ω 9; C18:2 ω 6; C18:3 ω 3; C20:3 ω 3 (Fig. 6). Foi observado também mais dois picos, sendo um pico representativo do FAME adicionado como padrão interno (C23:0) e um pico do solvente utilizado em aproximadamente 14 min. Na composição de ácidos graxos encontrados, notou-se que os picos mais intensos ocorreram no tempo de retenção de aproximadamente 31, 37 e 39 min, correspondendo, respectivamente, ao ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1 ω 9) e ácido linoleico (C18:2 ω 6). Semelhante a outros estudos envolvendo bactérias (Kiran et al., 2010; Qiao e Shao, 2010), sugere-se que o BSPP produzido pelo fungo endofítico *T. asperellum* CBS 433.97 é constituído de cadeias alifáticas que variam de 16 a 20 grupos metílicos, em vez de um único composto.

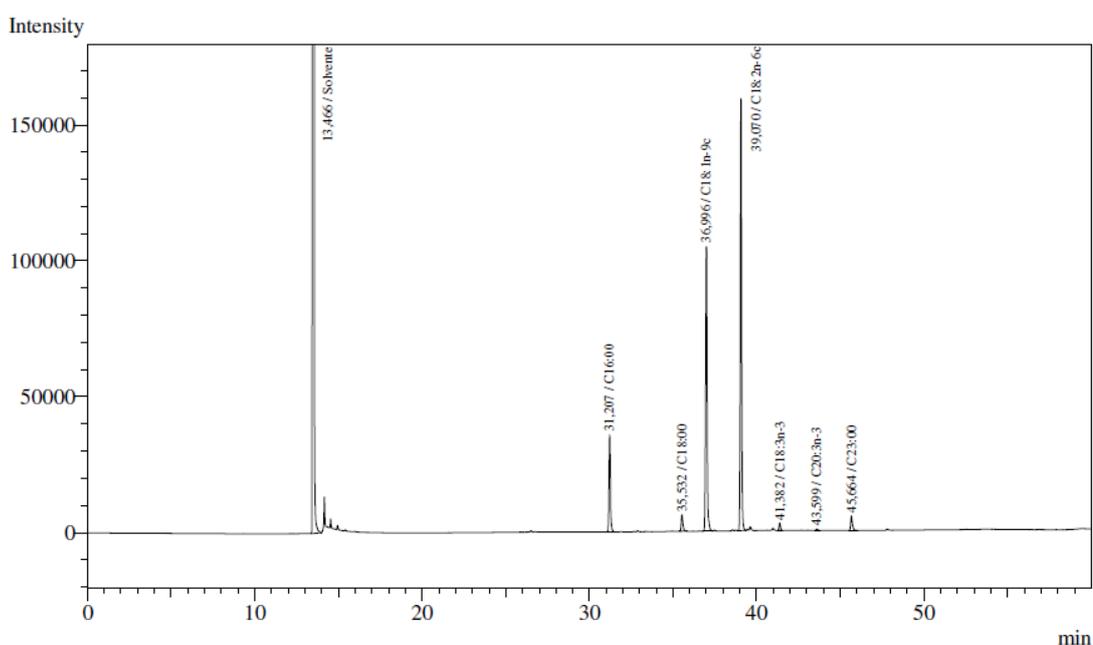


Fig. 6 Cromatograma CG-DIC da composição dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no BSPP produzido pelo fungo filamentosso endofítico *T. asperellum* CBS 433.97.

O BSPP apresentou em sua estrutura elevado conteúdo do ácido linoleico ($170,02 \pm 0,15$ mg.g⁻¹). Este ácido representa a família ômega-6, sendo o componente mais abundante no material graxo dos alimentos, como carnes, óleos vegetais, entre outros (Santos et al., 2013). O ômega-6 é necessário para muitas funções fisiológicas no ser humano. A presença do ácido oleico em quantidades elevadas também merece destaque. Com o conteúdo de $123,11 \pm 0,01$ mg.g⁻¹, o ácido oleico (C18:1), série ômega-9, faz parte do grupo dos monoinsaturados, ou seja,

possuem uma dupla ligação na cadeia carbônica e são encontrados em maior concentração no óleo de oliva (Tabela 5).

Tabela 5 Conteúdo de ácidos graxos obtido por CG do BSPP produzido pelo fungo endofítico *T. asperellum* CBS 433.97.

Tr (min)	FAME	Composto identificado	Fórmula	Conteúdo (mg.g ⁻¹)
31	C16:0	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	43,69 ±0,17
36	C18:0	Ácido esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	7,97±0,02
37	C18:1 Δ9-ω9	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	123,11±0,01
39	C18:2 Δ9,12-ω6	Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	170,02±0,15
41	C18:3 Δ9,12,15-ω3	Ácido linolênico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	2,80±0,04
44	C20:3 Δ11,14,17-ω3	Ácido eicosatrienóico	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	0,57±0,01

Os ácidos graxos saturados, palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) apresentaram conteúdo de 43,69 e 7,97 mg.g⁻¹, respectivamente. Esses mesmos ácidos graxos foram relatados em um estudo sobre a produção e caracterização estrutural de biossurfactantes por bactérias, realizado por Unás et al. (2018). A produção de biossurfactantes por outros microrganismos pode trazer a mesma composição de ácidos graxos. Assim, o meio de cultura utilizado para obtenção desses compostos, principalmente as fontes de nutrientes, fornecem uma composição rica em ácidos graxos.

A fonte de carbono empregada na produção do biossurfactante é relevante, pois a composição e tamanho das cadeias de ácidos graxos variam de acordo com o meio utilizado, de preferência fontes hidrofóbicas, que pode resultar em maiores atividades surfactantes (Araújo et al., 2013). À vista disso, houve relação dos ácidos graxos que compõe o óleo vegetal de milho puro com a composição do biossurfactante produzido neste trabalho. Os óleos vegetais geralmente contêm ácidos graxos saturados e insaturados com cadeias entre 16 e 18 átomos de carbono (Makkar et al., 2011), os mesmos encontrados no presente estudo. A maioria dos ácidos graxos encontrados aqui, são considerados essenciais, que trazem benefícios para a saúde humana. Isto só contribui para uma possível aplicação desse BSPP em alimentos.

3.4.3 Análise FAMES obtida por CG-EM para BSPP

Com base na análise do CG-EM, a amostra do BSPP apresentou 5 picos, revelando a presença de vários ésteres metílicos de ácidos graxos (Fig. 7). Os picos identificados foram: 1- Éster metílico do ácido palmítico (C₁₇H₃₄O₂), [M+]: m/z 270; 2 - Éster metílico do ácido 9E,12E-ácido octadecadienóico (C₁₉H₃₄O₂) (linoleico), [M+]: m/z 294; 3 - Éster metílico do

ácido oleico ($C_{19}H_{36}O_2$), $[M^+]$: m/z 296; 4 - Não identificado, possivelmente um isômero do ácido oleico; 5- Éster metílico do ácido esteárico ($C_{19}H_{38}O_2$), $[M^+]$: m/z 298 (Anexo 5). Os ésteres metílicos de ácidos graxos apresentaram baixos pesos moleculares. Biossurfactantes de baixo peso molecular são glicolípídeos, ácidos graxos, lipopeptídeos cíclicos e acíclicos, enquanto os biossurfactantes de alto peso molecular são polissacarídeos, proteínas, lipoproteínas, lipopolissacarídeos (Ashitha et al., 2020). De acordo com Lima (2012), os biossurfactantes que apresentam baixo peso molecular possuem maior eficiência na redução da tensão superficial. Essa eficiência foi comprovada aqui para o BSPP produzido por *T. asperellum*.

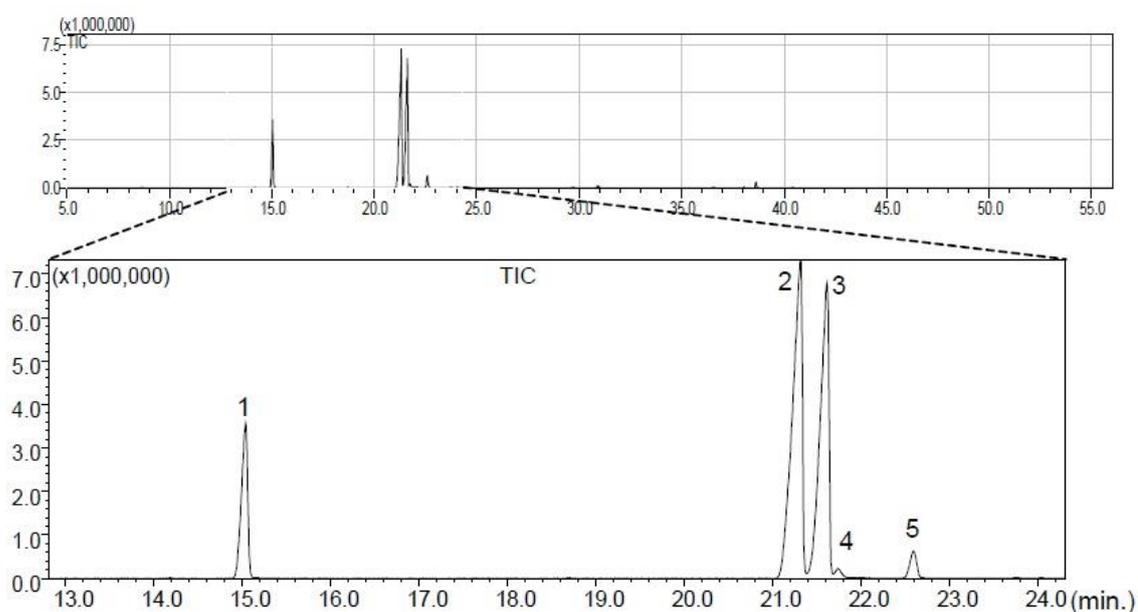


Fig. 7 Cromatograma de íons totais (total ion chromatogram-TIC) (CG-EM) do BSPP. Ampliação do TIC na região entre 13 e 24 min.

Legenda: 1- Éster metílico do ácido palmítico ($C_{17}H_{34}O_2$), $[M^+]$: m/z 270; 2 - Éster metílico do ácido 9E,12E-ácido octadecadienóico (linoleico) ($C_{19}H_{34}O_2$), $[M^+]$: m/z 294; 3 - Éster metílico do ácido oleico ($C_{19}H_{36}O_2$), $[M^+]$: m/z 296; 4 - Não identificado, possivelmente um isômero do ácido oleico; 5- Éster metílico do ácido esteárico ($C_{19}H_{38}O_2$), $[M^+]$: m/z 298.

Os compostos obtidos na análise do CG-MS que apresentaram maior intensidade foram, o pico 2, seguido do pico 3. Esses resultados corroboram com os resultados da composição de ácidos graxos da amostra pelo CG, onde os ácidos graxos, linoleico ($C_{18:2} \Delta^9,12-\omega^6$) e oleico ($C_{18:1} \Delta^9-\omega^9$) foram encontrados com maior conteúdo na amostra.

Foi observada a presença também do ácido esteárico, o mesmo relatado por Anjum et al (2016), que ao avaliar a produção de biossurfactante através de *Bacillus sp.* MTCC 5877 e

suas diversas aplicações na indústria de alimentos, verificaram que o ácido esteárico foi o composto principal presente na estrutura do biossurfactante. Ésteres de ácidos graxos também foram encontrados na estrutura do biossurfactante produzido por *A. thailandense* (Meneses et al., 2017).

McClements et al. (2009) enfatizam a importância desses ácidos graxos, principalmente o ácido linoleico conjugado (CLA) e os ácidos ômega-3 (ω -3) por serem nutracêuticos com benefícios comprovados para a saúde.

Como citado anteriormente, as fontes de nutrientes utilizadas na produção do biossurfactante têm influência diretamente na caracterização química e estrutural. Essa influência das fontes também foi observada por Vecino et al. (2017) que ao avaliarem a produção de biossurfactante por *Lactobacillus paracasei*, observaram que quando a glicose foi utilizada como fonte de carbono o biossurfactante era um glicolipopeptídeo, enquanto que quando foi substituído pela lactose, o biossurfactante produzido foi uma glicoproteína. Na literatura não foi reportada até o presente momento, estudos que utilizaram simultaneamente a ureia como fonte de nitrogênio e o óleo vegetal de milho como fonte de carbono.

A análise espectral acima sugere que a estrutura do BSPP produzido pelo fungo *T. asperellum* compreende uma mistura complexa composta por ácidos graxos saturados e insaturados.

3.4.4 Espectroscopia de RMN

As análises dos espectros de RMN de ^1H (Tabela 6 e Fig. 8) e ^{13}C (Fig. 9) permitiram a identificação de dois triacilgliceróis (TG) em amostras de BSPP obtidas de *T. asperellum*, sendo um TG composto de três unidades de oleíla (3x C18:1) e o outro TG composto de três unidades de linoleíla (3x C18:2). Neste último, as duplas ligações Δ -9,12 apresentaram configuração *trans*. As atribuições das constantes de acoplamento em hertz (Hz) e das identificações dos sinais (duplete duplo, etc.) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) das principais cadeias acila identificadas na amostra de BSPP encontram-se destacadas na Tabela 6.

Frequência (MHz) 499.81
 Solvente CDCl₃
 MA02_1H.ESP

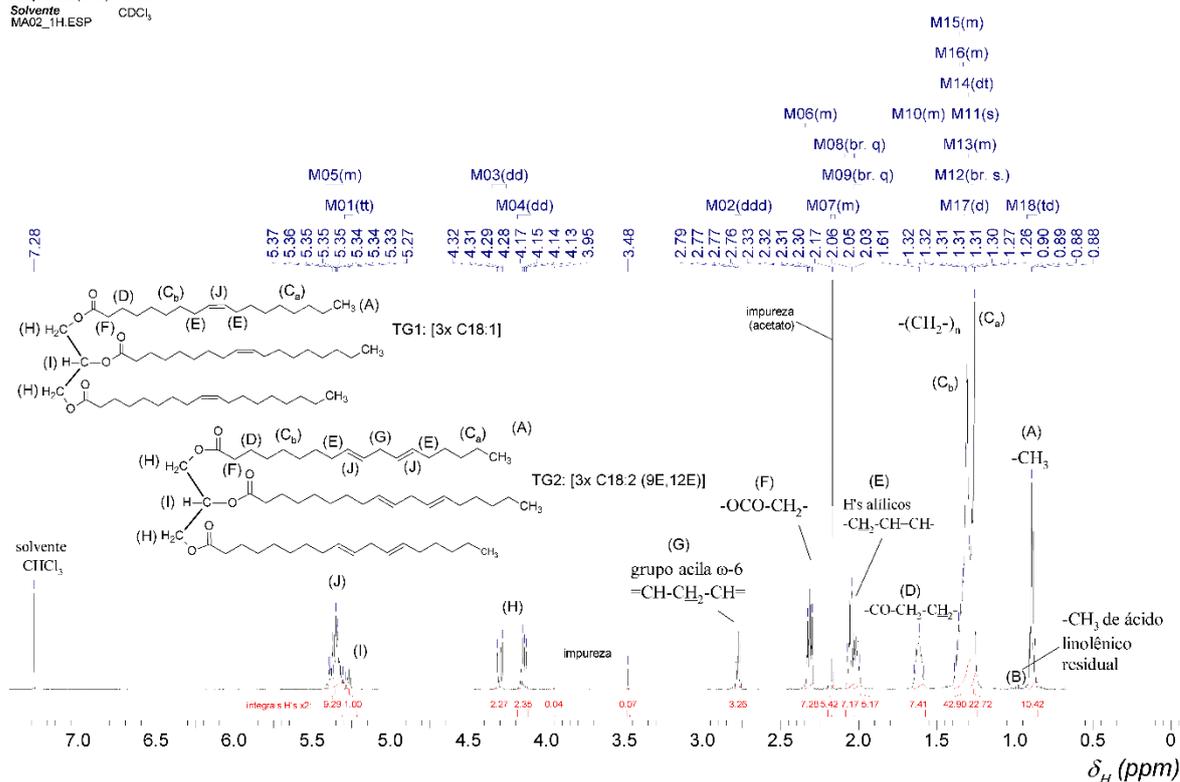


Fig. 8 Espectro de RMN de ¹H de BSPP obtido de *T. asperellum* (CDCl₃, 500 MHz).

Tabela 6 Atribuição dos dados do espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz) das principais cadeias acila identificadas na amostra de BSPP obtida de *T. asperellum*

Tipo de H	C18-1-ω9	C18:2-ω6 (trans-9,trans-12)
CH ₂ COO	2,31 (t, J=7,60 Hz)	2,32 (t, J=7,60 Hz)
CH ₂ CH ₂ COO	1,61 (m)	1,62 (m)
CH=CH	5,31 (m)	5,34 (m), 5,37 (m)
CH=CHCH ₂ CH=CH	-	2,77 (ddd, J=6,60, 1,00 Hz)
CH ₂ CH=CH	2,01 (br, q, J=6,50 Hz)	2,05 (br, q, J=6,70 Hz)
(CH ₂) _n	1,26-1,35 (m)	1,26-1,39 (m)
CH ₃	0,88 (t, J=6,87 Hz)	0,89 (t, J=7,00 Hz)
O-CH ₂ (glicerol)	4,15 (dd, J=11,90, 5,86 Hz) 4,30 (dd, J=11,93, 4,40 Hz)	4,15 (dd, J=11,90, 5,86 Hz) 4,30 (dd, J=11,93, 4,40 Hz)
O-CH (glicerol)	5,27 (tt, J=5,93, 4,31 Hz)	5,27 (tt, J=5,93, 4,31 Hz)

Legenda: *dd*: duplete duplo, *ddd*: duplo duplete duplo, *t*: tripleto, *tt*: tripleto triplo, *q*: quarteto, *m*: multipeto, *J*: constante de acoplamento em hertz (Hz). Atribuições feitas com base na referência: MARCEL, S.F. et al. Chemistry and Physics of Lipids 77 (1995) 155-171

O espectro de RMN de ¹³C apresentou uma maior complexidade, apresentando, além dos sinais dos carbonos correspondentes aos TG's observados no espectro de RMN de ¹H, outros sinais de componentes de BSPP, tais como triterpenos, esteroides e ácidos graxos livres (Fig. 9).

3.5. Toxicidade do biossurfactante

O BSPP teve atividade contra *Artemia salina* L com LD50 de 6708,50 (mg.L⁻¹), ou seja, esta foi a concentração necessária para matar 50% da *Artemia salina* L. Apresentou limites que variam de 4484,31 a 8932,70 (mg.L⁻¹) classificando como não tóxico, pois de acordo com Nguta et colaboradores (2012), quando os valores LD50 > 1000 mg.L⁻¹, os compostos são considerados não tóxicos. Ao analisar a toxicidade do biossurfactante Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*, Edwards e colaboradores (2003) verificaram que o Emulsan apresentou toxicidade acima de 200 mg.L⁻¹. É importante conhecer a toxicidade do composto, pois é fundamental para aplicação em produtos alimentícios.

Para o teste fitotóxico (Fig. 10), foi observado que na maior concentração (10000 mg.L⁻¹) o efeito fitotóxico do BSPP foi 100%, ou seja, toxicidade elevada, impedindo o crescimento das sementes. Na concentração de 5000 mg.L⁻¹ o BSPP apresentou aproximadamente 23% de toxicidade e na concentração de 1500 mg.L⁻¹ o efeito fitotóxico foi reduzido para aproximadamente 4%. Já para concentrações abaixo de 1500 mg.L⁻¹, houve maior crescimento da raiz do que na presença de água (controle), demonstrando efeito negativo, portanto nestas concentrações o BSPP não apresentou mais efeito fitotóxico.

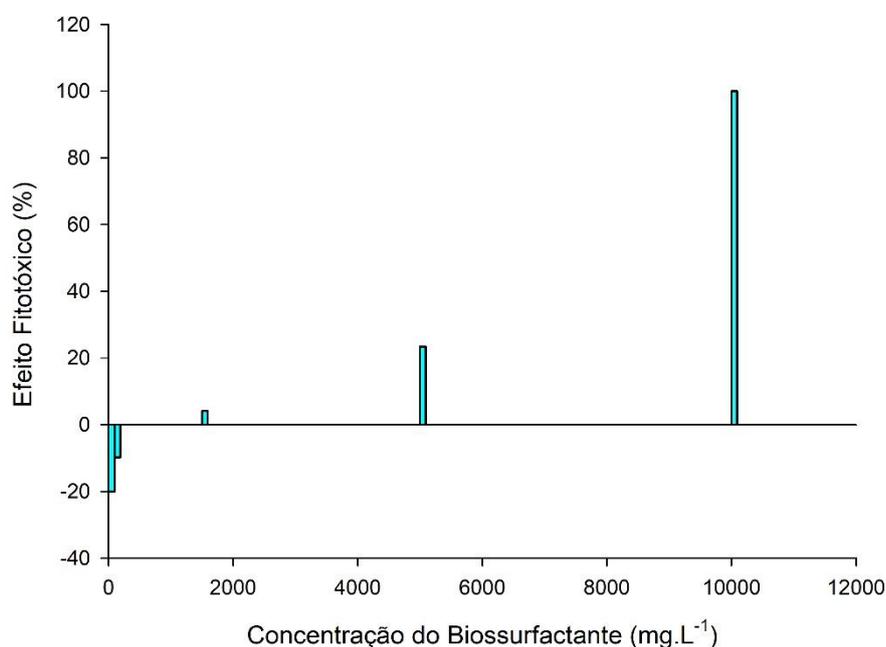


Fig. 10 Efeito fitotóxico, em sementes de *Latuca sativa* L., do BSPP produzido pelo fungo endofítico *T. asperellum*.

A utilização de plantas em testes de toxicidade oferece um resultado rápido e também apresenta baixo custo de manutenção (Farré e Barceló, 2003). Com esse teste verificou-se que principalmente na CMC do BSPP o efeito fitotóxico foi negativo, o que contribui para uma possível aplicação desse composto nos alimentos.

3.6. Aplicação do BSPP

No sistema emulsionado foi possível avaliar a ação do biossurfactante frente a outros emulsificantes por meio de sete ensaios. No ensaio A continha uma matriz alimentícia que simulava um molho de salada do tipo Grego e 1,0 % Maltodextrina + 0,6 % Goma Xantana; no ensaio B, matriz alimentícia e 1,0 % Maltodextrina; ensaio C, matriz alimentícia e 1,0 % Maltodextrina + 0,1 % BSP; ensaio D, 0,6 % Goma Xantana; ensaio E, 0,6 % Goma Xantana + 0,1 % BSPP; ensaio F, 0,1 % BSPP; ensaio G, 1,0 % BSPP. Mesmo sendo empregado em baixas concentrações, ensaios F e G, o BSPP promoveu a formação de emulsão, apresentando índice de emulsificação de 68 e 72%, respectivamente (Fig.11).

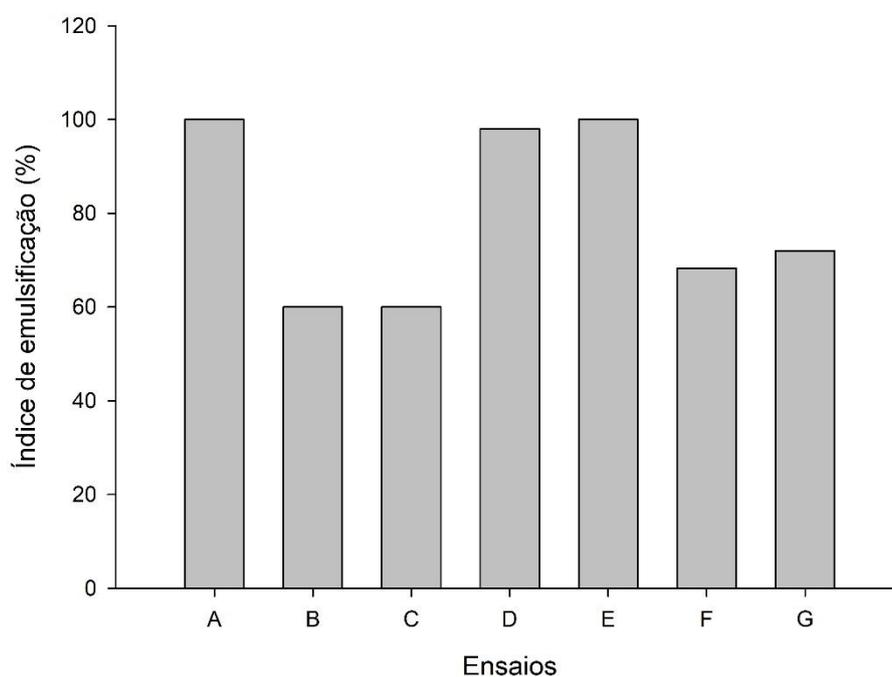


Fig. 11 Teste de aplicabilidade do BSPP e outros emulsificantes em uma matriz alimentícia. A: 1,0 % Maltodextrina + 0,6 % Goma Xantana; B: 1,0 % Maltodextrina; C: 1,0 % Maltodextrina + 0,1 % BSP; D: 0,6 % Goma Xantana; E: 0,6 % Goma Xantana + 0,1 % BSPP; F: 0,1 % BSPP; G: 1,0 % BSPP.

Porém, não proporcionou grande estabilidade ao sistema, pois após um tempo a emulsão foi separando (Anexo 6). Os ensaios A e E atingiram 100% do índice de emulsificação, sendo totalmente eficazes no sistema, principalmente porque permaneceram estáveis. Observou-se que para estes dois ensaios a presença da goma xantana contribuiu para a estabilidade, já que a mesma é capaz de afetar as propriedades reológicas do sistema emulsionado. A sua eficiência é aumentada quando é empregada juntamente com outro polissacarídeo, a maltodextrina. Empregada sozinha ou misturada com o biossurfactante, a maltodextrina apresentou menores valores para o IE, ensaios B e C. Ainda assim, todos os ensaios foram capazes de formar emulsão, mantendo a capacidade de estabilizar as emulsões em pelo menos 50% do volume total (Batista et al., 2006).

4. Conclusão

A utilização de ferramentas de otimização estatística neste trabalho contribuiu na maximização da produção do BSPP obtido a partir do fungo endofítico *T. asperellum* CBS 433.97, sendo obtidos como níveis ótimos na produção, uma concentração de carbono de 9,20 g.L⁻¹ e de nitrogênio 17,46 g.L⁻¹. O valor da CMC obtido para o BSPP foi 1400 mg.L⁻¹, apresentando alta atividade de emulsão. Por meio da caracterização química e estrutural, o BSPP foi classificado como sendo uma mistura complexa formada de ácidos graxos saturados e insaturados. Por fim, este composto tem grande potencial para ser aplicado aos alimentos, pois apresentou baixa toxicidade e eficiência em sistemas emulsionados.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia- UESB, pelo suporte das análises.

Conflito de interesse

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

Referências

Anjum, F., Gautam, G., Edgard, G., Negi, S., 2016. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresour. Technol.* 213, 262–269.

- Araújo, L.V., Freire, D.M.G., Nitschke, M., 2013. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Química Nova*, 36, 848-858.
- Ashitha, A., Radhakrishnan, E.K., Jyothis, M., 2020. Characterization of biosurfactant produced by the endophyte *Burkholderia sp.* WYAT7 and evaluation of its antibacterial and antibiofilm potentials. *J. Biotechnol.*
- Banat, I., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T. J., Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production, application and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 427–444.
- Bannon, C.D., Breen, G.J., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L., O'Rourke, K.L., 1982. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. *J Chromatogr.* 247, 71-89.
- Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R., Tótola, M.R., 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 97, 868–875.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.
- Bhange, K., Chaturvedi, V., Bhatt, R., 2016. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. *Biotechnol Rep.* 10, 94–104.
- Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M, 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol Meth.* 32, 273–280.
- Camino, M., Bagur, M.G., Sánchez-Viñas, M., Gázquez, D., Romero, R., 2001. Multivariate optimization of solvent extraction of Cd(II), Co(II), Cr(VI), Cu(II), Ni(II), Pb(II), and Zn(II) as dibenzylthiocarbamates and detection by AAS. *JAAS.* 16, 638 – 642.
- Cooper, D.G., MacDonald, C.R.S., Duff, J.B., Kosaric, N., 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 408–412.
- Coronel-León, J., Marqués, A.M., Bastida, J., Manresa, A., 2015. Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control, *J. Appl. Microbiol.* 120, 99–111.
- Dos Reis - Gorny. M. F., Durrant, L. R., 2003. Screening Fungi for Their Possible Ability to Degrade Dioxins and Furans. In: *In Situ and On- Site Bioremediation, 2003* [electronic resource]: proceedings of the Seventh International In Situ and On- Site Bioremediation Symposium June 2-5, 2003, Orlando, Florida. Eds. Magar, V. S. and Mark, E. K. ISBN 1-57477-139-6.
- Edwards, K. R., Lepo, J. E., Lewis, M. A., 2003. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1309-1316.

- Farré, M., Barceló, D., 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends Anal. Chem.* 22, 299-309.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226(1), 497-509.
- Kiran, S.G., Thomas, A.T., Selvin, J., Sabarathnam, B., Lipton, A.P., 2010. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresour. Technol.* 101, 2389–2396.
- Lima, B. M., 2012. Produção de biossurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato. Dissertação Mestrado. UNESP.
- Liu, X., Ren, B., Gao, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., Yu, Z., Wang, S., Hu, J., Kokare, C.R., Zhang, L., 2012. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *Plos One.* 7, 1–10.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1, 1–19.
- Marin, C.P., Kaschuk, J.J., Frollini, E., Nitschke, M., 2015. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. *Ind. Crop. Prod.* 66, 239–245.
- McClements, D.J., Decker, E.A., Park, Y., Weiss, J., 2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 577–606.
- Meneses, D.P., Gudiña, E.J., Fernandes, F., Gonçalves, L.R.B., Rodrigues, L.R., Rodrigues, S., 2017. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. *Microbiol. Res.* 204, 40–47.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., McLaughlin, J. L., 1982. Brine shrimp, a conveniente general bioassay for active-plant constituents. *Planta Med.* 45, 31-34.
- Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T., 2000. A Study on the structure–function relationship of lipopeptides biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 211–218.
- Nalini, S., Parthasarathi, R., 2014. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. *Bioresour. Technol.* 173, 231–238.
- Novaes, C. G., Yamaki, R. T., de Paula, V. F., do Nascimento Júnior, B. B., Barreto, J. A., Valasques, G. S., Bezerra, M. A., 2017. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. *Rev. Virtual Quim.* 9, 32.
- Nguta, J. M., Mbaria, J. M., Gakuya, D. W., Gathumbi, P. K., Kabasa, J. D., Kiama, S. G., 2012. Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). *The Open Conference Proceedings Journal.* 3, 30-34.

Oliveira, J.G., Garcia-Cruz, C.H., 2013. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56, 155–160.

Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J.A.P., Rodrigues, L. R., 2013. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel.* 111, 259–268.

Qiao, N., Shao, Z., 2010. Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1207-1216.

Santana, L., Morcillo, B., Alencar, K., Coelho, M.A.Z., 2015. Evaluation of The Stability of Industrialized Food Emulsions, Using Rheology and Digital Image Processing. *MOJFPT.* 1:8 – 12.

Santos, R.D., Gagliardi, A.C.M., et al., 2013. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arq. Bras. Cardiol.* 100, 1-40.

Santos, D.K.F., Brandão, Y.B., Rufino, R.D., Luna, J.M., Salgueiro, A.A., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2014. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3:(3), 48–57.

Santos, A.S., Pereira, N.J., Freire, D.M., 2016. Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *PeerJ.* 4, 1–16.

Shoresh, M., Mastouri, F., Harman, G.E., 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21-43.

Silva, K.A., Fontes, G.C., Coelho, M.A.Z., 2016. Avaliação de diferentes métodos de extração do biossurfactante produzido por *Yarrowia lipolytica*. *COBEQ 2016, ENBEQ 2016, Fortaleza-CE.*

Simionato, J. I., Garcia, J. C., Santos, G. T., Oliveira, C. C., Visentainer, J. V., Souza, N. E., 2010. Validation of the Determination of Fatty Acids in Milk by Gas Chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.* 21, 520-524.

Sivertsen, E., Bjerke, F., Almøy, T., Segtnan, V., Naes, T., 2007. Multivariate optimization by visual inspection. *Chemo. Intell. Lab. Syst.* 85, 110.

Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C., Oliveira, R.P.D.S., 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 89, 88–94.

Souza, K.S.T., Gudiña, E.J., Schwan, R.F., Rodrigues, L.R., Dias, D.R., Teixeira, J.A., 2018. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. *J. Hazard. Mater.* 346, 152–158.

Unás, J.H., Santos, D.A., Azevedo, E.B., Nitschkea, M., 2018. *Brevibacterium luteolum* biosurfactant: Production and structural characterization. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 13, 160–167.

Varjani, S.J., Upasani, V.N., 2017. Review: Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 232, 389–397.

Vecino, X., Rodríguez-López, L., Gudiña, E.J., Cruz, J.M., Moldes, A.B., Rodrigues, L.R., 2017. Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. *J. Ind. Eng. Chem.* 55, 40–49.

Williamson, K., Hatzakis, E., 2017. NMR Spectroscopy as a Robust Tool for the Rapid Evaluation of the Lipid Profile of Fish Oil Supplements. *J. Vis. Exp.* (123).

Wu, Q., Sun, R., Ni, M., Yu, J., Li, Y., Yu, C., Dou, K., Ren, J., Chen, J., 2017. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *Plos One.* 12(6).

Zhao, F., Zhou, J.-D., Ma, F., Shi, R.-J., Han, S.-Q., Zhang, J., Zhang, Y., 2016. Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H₂S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl: applications for microbial enhanced oil recovery. *Bioresour. Technol.* 207, 24–30.

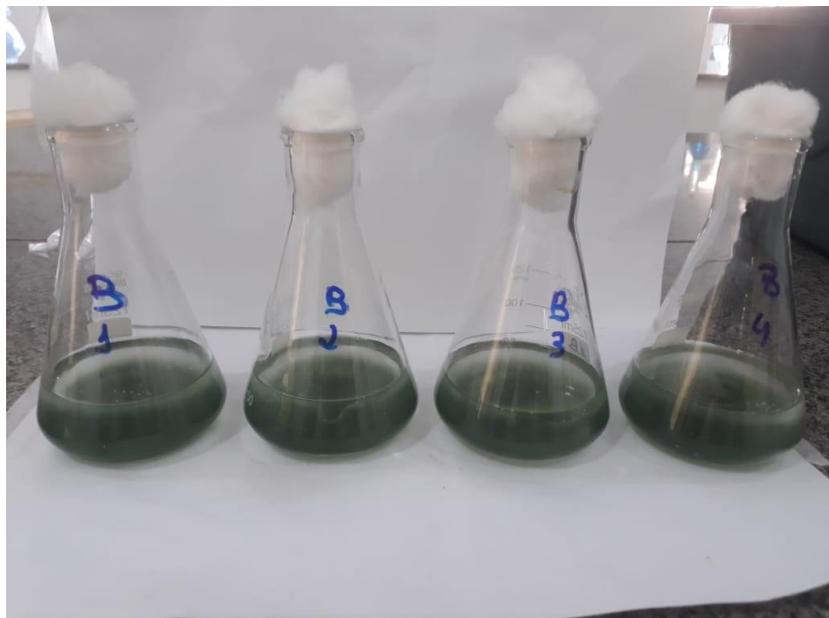
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo buscou o emprego de novos microrganismos na produção de biossurfactantes no sentido de reduzir os custos na produção desses compostos observadas no setor e ampliar a sua aceitabilidade ecológica, já que em comparação com os surfactantes químicos, os biossurfactantes apresentam menor impacto ambiental por serem biodegradáveis. Dessa forma algumas considerações nesta pesquisa merecem destaques:

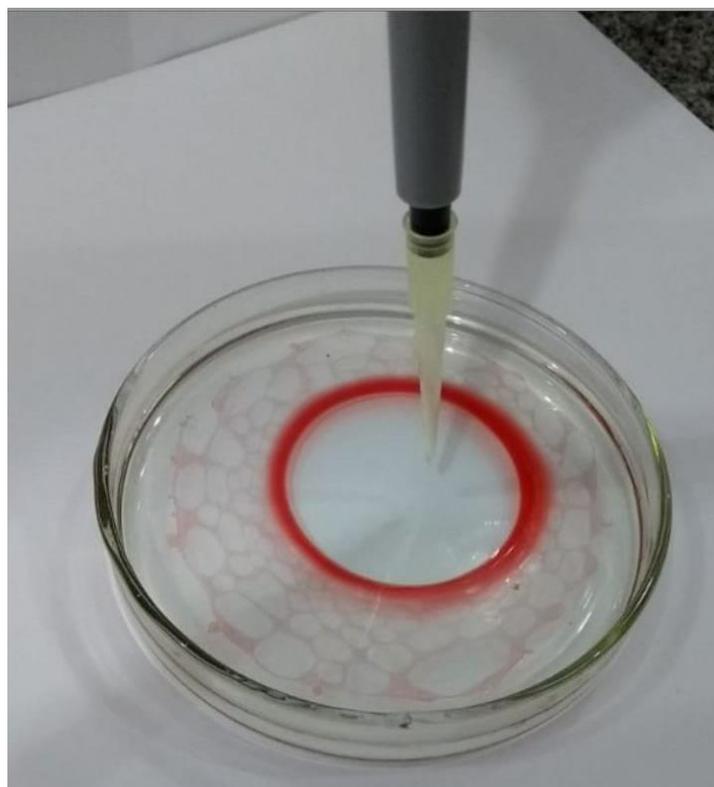
1. A produção de biossurfactantes por fungos filamentosos endofíticos isolados de videira pode contribuir para o fortalecimento das indústrias biotecnológicas podendo auxiliar na resolução das questões econômicas e ambientais.
2. As fontes de carbono e nitrogênio influenciaram na produção dos biossurfactantes. Portanto, a escolha de fontes com maior eficiência no processo e de baixo custo devem ser avaliadas.
3. O processamento de biossurfactante é complexo e pode ocasionar perdas, isso demonstra a importância de se buscar otimizar a produção para que estas perdas sejam mínimas. Nesse sentido, este estudo deixou claro que experimentos estatísticos são fundamentais, pois é possível identificar a condição ótima na produção desses agentes tensoativos.
4. A análise da concentração micelar crítica (CMC) é fundamental quando se estuda biossurfactante, pois é a fase inicial da formação de micelas de um componente anfifílico. Para a sua determinação neste trabalho, foi utilizada a técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) que contribuiu no fornecimento das informações por se tratar de uma técnica bastante precisa.
5. Outro fator observado foi a caracterização estrutural do biossurfactante. Estes, foram classificados como sendo substâncias compostas por vários ácidos graxos, que na maioria são importantes para área de nutrição (alimentos e nutracêuticos).
6. A aplicação do biossurfactante produzido pelo fungo *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 mostrou eficiência em processos de emulsificação e apresentou baixa toxicidade, tornando-o um excelente promissor como aditivo alimentar.
7. A demanda por novas fontes produtoras de biossurfactantes tem levado a necessidade de novos estudos para sanar essa demanda. O fungo *Trichoderma asperellum* é um dos agentes de biocontrole fúngico muito estudado e aplicado. Produzir biossurfactante por este fungo abre uma série de possibilidades para trabalhos futuros.

ANEXOS

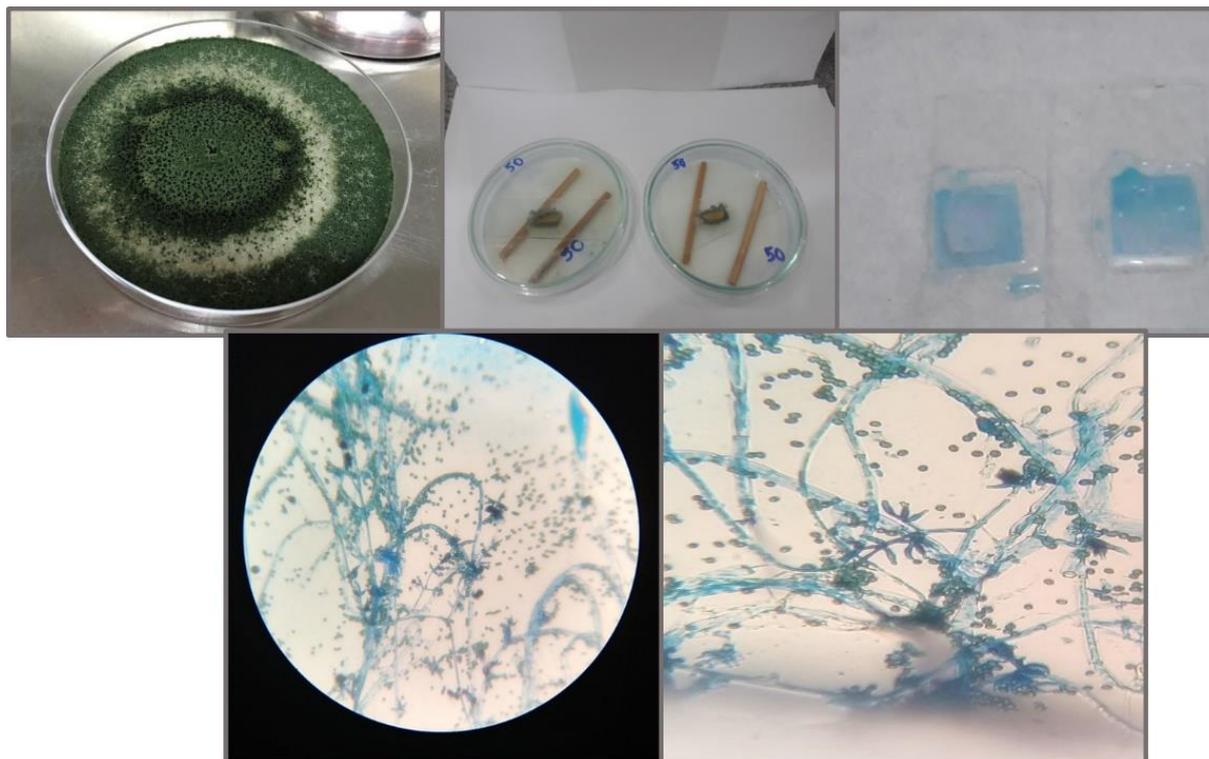
ANEXO 1- Fermentação submersa estática do isolado 50 (I50) para a produção do biossurfactante.



ANEXO 2- Zona de limpeza do óleo com o biossurfactante na técnica de espalhamento do óleo.



ANEXO 3 – Fotos do isolado fúngico 50 (I50) na caracterização morfológica.



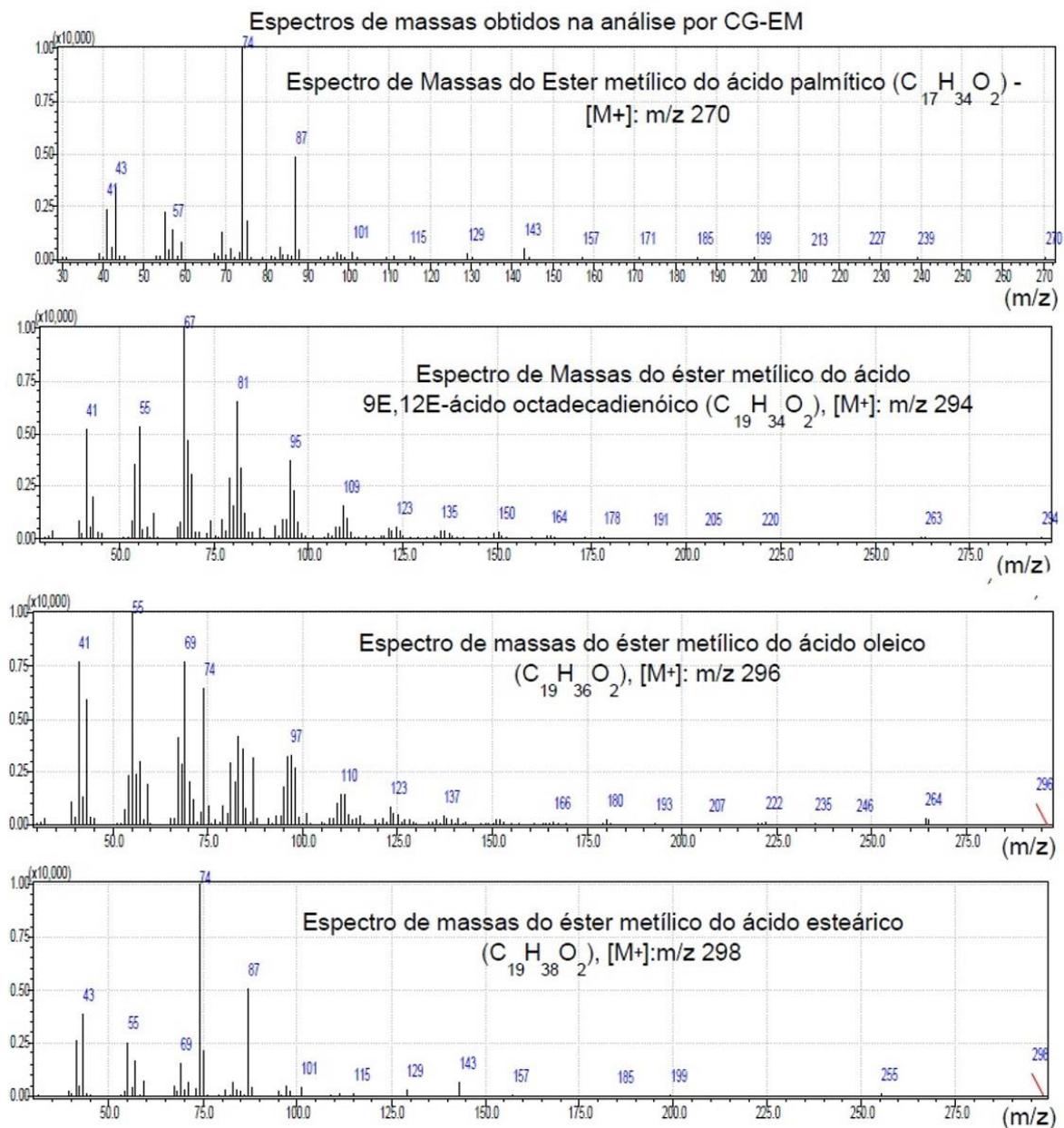
ANEXO 4- Sequências parciais das amostras analisadas.

>CPQBA 2194/19 DRM 01

>conesnsus2194

```
GGGGTGTCAAATTTTTGGCAGCAACCCCGCTATgCCaCTGCACCTCTTCCATCACCCACCACGTGCTATTTGCTCAAT  
CGCATCGTCTTTTTTGTTCATTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAAGTCCGGCAAGGGTTCCTTC  
AAGTATGCGTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTT  
CGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGACTCTTCTcTCTAGCTATCGACATTCCAAGTCCG  
CCATTCTAACATGCTCTTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCA  
GGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAA
```

ANEXO 5 - Espectros de massas dos picos identificados na análise por CG -MS.



ANEXO 6 - Emulsão formada com suco de limão e azeite extravirgem (1:1) e misturas de emulsificantes.

