

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO NA ÁREA DE
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (PMBqBM)**

JÚLIO RICARDO MACEDO SILVA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES
ISOLADAS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DA APA COSTA DOS CORAIS,
ALAGOAS, BRASIL**

**MACEIÓ/AL
2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO NA ÁREA DE
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (PMBqBM)**

JÚLIO RICARDO MACEDO SILVA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES
ISOLADAS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DA APA COSTA DOS CORAIS,
ALAGOAS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico na área de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular sob orientação da professora Dra. Melissa Fontes Landell e co-orientação do professor Dr. Marcelo Maraschin.

**MACEIÓ/AL
2023**

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586s Silva, Júlio Ricardo Macedo.
Seleção de leveduras produtoras de biossurfactantes isoladas de sedimentos de manguezais da APA Costa dos Corais, Alagoas, Brasil / Júlio Ricardo Macedo Silva. – 2023.
95 f. : il.

Orientadora: Melissa Fontes Landell.

Coorientador: Marcelo Maraschin.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 71-91.

Apêndices: f. 92-95.

1. Leveduras. 2. Pichia. 3. Tensoativos. 4. Bioemulsificantes. 5. Biotecnologia. I. Título.

CDU: 606

JÚLIO RICARDO MACEDO SILVA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES
ISOLADAS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DA APA COSTA DOS CORAIS,
ALAGOAS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico na área de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular sob orientação da professora Dra. Melissa Fontes Landell e co-orientação do professor Dr. Marcelo Maraschin.

Aprovado em: __24__ / __02__ / 2023__.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 FATIMA MENEZES BENTO
Data: 07/03/2023 17:35:19-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Dra. Fátima Menezes Bento (UFRGS)

Documento assinado digitalmente
 FRANCIS SOARES GOMES
Data: 02/03/2023 15:26:46-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Dr. Francis Soares Gomes (UFAL)

Documento assinado digitalmente
 HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA
Data: 07/03/2023 14:13:45-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira (UFAL)

MACEIÓ/AL
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR



Ata de Defesa de Dissertação

Ao vigésimo quarto dia do mês de fevereiro de 2023, às quatorze horas, reuniu-se, via videoconferência, a banca examinadora composta pelas docentes doutoras, Melissa Fontes Landell e Fátima Menezes Bento, e pelos docentes doutores, Francis Soares Gomes e Hugo Juarez Vieira Pereira, para o **Exame de Defesa de Dissertação** intitulada: “**SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE BIODERIVADOS ISOLADAS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DA APA COSTA DOS CORAIS, ALAGOAS, BRASIL**”, elaborada pelo mestrando regularmente matriculado no programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, mestrado **Júlio Ricardo Macedo Silva**, sob orientação da **Profa. Dra. Melissa Fontes Landell** e co-orientação do **Prof. Marcelo Maraschin**. Após a apresentação por 40 minutos, o mestrando foi arguido pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 17 horas, os examinadores consideraram a Dissertação (X) **APROVADA** ou () **APROVADA COM RESTRIÇÃO**, emitindo-se o seguinte parecer: _____

Nada mais havendo a tratar, eu, Daniel de Brito Ricarte, servidor, lavrei a presente ata que será assinada pela banca examinadora e pelo mestrando.

Maceió, 24 de fevereiro de 2023

Presidente (Orientadora): Profa. Dra. Melissa Fontes Landell

Documento assinado digitalmente
 MELISSA FONTES LANDELL
Data: 13/03/2023 10:20:24-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Examinador interno: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Documento assinado digitalmente
 FRANCIS SOARES GOMES
Data: 15/03/2023 13:30:13-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Examinador interno: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira

Documento assinado digitalmente
 HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA
Data: 14/03/2023 15:45:36-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Examinadora externa: Profa. Dra. Fátima Menezes Bento

Documento assinado digitalmente
 FATIMA MENEZES BENTO
Data: 16/03/2023 08:45:41-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Mestrando: Júlio Ricardo Macedo Silva

Documento assinado digitalmente
 JULIO RICARDO MACEDO SILVA
Data: 13/03/2023 11:50:44-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

“Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes.”

(Paulo Freire)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus, que conduziu todos os caminhos, proporcionando sabedoria, coragem e saúde durante a pandemia da COVID-19, além de esperança durante todos os meus anos de estudos e durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais diante de todos os esforços até aqui oferecidos. À minha mãe, Salete, sempre me incentivando, pois sempre lutou pela educação enquanto professora e mulher, sendo uma das minhas inspirações para um dia escolher seguir os caminhos da sala de aula e a educação como ferramenta para transformar minha vida como mudou a dela.

Ao meu pai, Carlos, que sempre foi um exemplo na minha vida de superação, vencendo o alcoolismo, meu amigo que está sempre me aconselhando a buscar os caminhos com honestidade e humildade.

Meu irmão, Rogério, que sempre foi um parceiro e amigo, sendo meu exemplo de paciência, com quem dividi minha infância e que guardo as melhores lembranças da minha vida.

A minha avó, Iraci, que sempre apoiou meus estudos e sempre me inspira com sua história, sendo a primeira entre as irmãs da família que aprendeu a ler sozinha quando proibida pelo seu pai de frequentar a escola.

A minha orientadora, Professora Doutora Melissa Fontes Landell que investe muitos esforços, competente e não mede limites para formar os seus alunos, gerando conhecimento e incentivando todos nós a buscar uma postura científica, mesmo diante de tantos momentos desafiadores e incertos na educação pública do Brasil. Atenciosa e cheia de conselhos, acreditou também em mim, foi conquistando a minha profunda admiração e respeito. Apesar de todas as dificuldades que no caminho da pesquisa posso encontrar, eu sempre senti que com ela estou em boas mãos. Tenho muito para aprender e amadurecer, mas sei que todos os nossos caminhos, que agora se cruzam, levarão a isso. A minha eterna gratidão pelas oportunidades e os incentivos que conduzem na minha vida.

Agradeço ao meu coorientador, Professor Doutor Marcelo Maraschin que sempre apoiou e orientou com paciência e sabedoria, que no exercício da sua

profissão possa continuar realizando um trabalho admirável e inspirando muitos outros alunos nas suas colaborações.

Aos meus amigos com quem aprendo e admiro no Laboratório de Diversidade Molecular (LDM) Aldeci, Maurício, Ciro, Carla, Bruno, Victor e a Vitória, a qual tenho um carinho especial, uma irmã, com quem compartilhei muitos momentos enriquecedores e desafiadores dentro e fora da academia.

À todos os meus professores de escola, graduação e pós-graduação que contribuíram na minha caminhada e formação. Que possam sempre se sentir realizados e contentes pelos esforços oferecidos em prol da educação, que de alguma forma sempre deixaram uma chama de esperança.

Aos meus amigos e familiares que foram suporte e alegria.

À Universidade Federal de Alagoas e ao Restaurante Universitário, a dedicação e a simplicidade por nos agraciar com seu serviço à comunidade estudantil.

Ao laboratório de Física do professor Ítalo, pelo apoio e parceria.

Agradeço ao programa de pós-graduação e coordenação no nome do Professor Doutor Francis Soares Gomes pelo apoio.

À FAPEAL pelo financiamento, oportunidade e concessão da bolsa no estado de Alagoas em um momento tão delicado para os estudantes de pós-graduação, e às agências de fomento CNPq e Capes, que estimulam e lutam pelo desenvolvimento das pesquisas no Brasil, e a Rede de Biotecnologia Marinha.

RESUMO

Ecossistemas litorâneos de alta diversidade como os manguezais são promissores à bioprospecção de moléculas de interesse biotecnológico, como os biossurfactantes. Biossurfactantes são moléculas tensoativas, com baixa toxicidade, capaz de reduzir a tensão superficial, podendo tolerar diferentes temperaturas, salinidade ou pH, com diversas aplicabilidades. O objetivo deste estudo foi selecionar leveduras de sedimentos de manguezais do litoral de Alagoas (rios Santo Antônio e Tatuamunha) quanto ao potencial para a produção de biossurfactantes. As leveduras foram inicialmente submetidas a busca a partir da literatura para a identificação de espécies ainda não descritas para a produção de biossurfactantes. Em seguida, 40 isolados de espécies não reportadas foram avaliadas quanto ao índice de emulsão IE₂₄%. Após a seleção inicial, 6 linhagens de *Candida (Pichia) pseudolambica* com o IE₂₄% ≥ 50% foram selecionadas para avaliação das propriedades tensoativas. Após, foram avaliados os efeitos de diferentes temperaturas, salinidades e pH sob os biossurfactantes, assim como a capacidade de emulsificação (IE₂₄%) em diferentes hidrocarbonetos. Avaliou-se também a produção de lipases, e, posteriormente, foram caracterizados os grupos funcionais de amostras da biomassa via Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR). As linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* demonstraram capacidade de reduzir a tensão superficial da água entre 36.69 mN/m a 42.47 mN/m, tolerância a condições de pH (2-4), emulsões variando entre 51% e 63%, e resistência a altas temperaturas (90 até 150 °C). Os cultivos celulares apresentaram capacidade de emulsionar diferentes hidrocarbonetos e atividade de lipase. A análise espectroscópica (FTIR) das amostras de biomassa revelou a existência de diversos grupos funcionais típicos de uma estrutura complexa de natureza de carboidrato e lipídio. Portanto, linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* oriundas de manguezais da região Nordeste do Brasil apresentaram potencial de produção de biossurfactantes e lipases, revelando a possibilidade de uso biotecnológico a ser melhor explorado.

PALAVRAS-CHAVE: Leveduras; *Pichia*; Surfactante; Bioemulsificantes; Biotecnologia.

ABSTRACT

Coastal ecosystems of high diversity such as mangroves are promising to the bioprospecting of molecules of biotechnological interest, such as biosurfactants. Biosurfactants are surfactant molecules, with low toxicity, capable of reducing surface tension, and can tolerate different temperatures, salinity, or pH, with various applications. The objective of this study was to select yeasts from mangrove sediments of the coast of Alagoas (Santo Antônio and Tatuamunha rivers) for the potential to produce biosurfactants. The yeasts were initially submitted to literature search for the identification of species not yet described for biosurfactant production. Then, 40 isolates of unreported species were evaluated for emulsion index IE₂₄%. After initial selection, 6 *Candida (Pichia) pseudolambica* strains with IE₂₄% ≥ 50% were selected for evaluation of surfactant properties. Afterwards, the effects of different temperatures, salinities, and pH on the biosurfactants as well as the emulsification capacity (IE₂₄%) in different hydrocarbons were evaluated. The production of lipases was also evaluated, and subsequently, the functional groups of biomass samples were characterized via Fourier transform mid-infrared vibrational spectroscopy (FTIR). The *C. (Pichia) pseudolambica* strains showed ability to reduce water surface tension between 36.69 mN/m to 42.47 mN/m, tolerance to pH conditions (2-4), emulsions ranging between 51% and 63%, and resistance to high temperatures (90 to 150 °C). The cell cultures showed ability to emulsify different hydrocarbons and lipase activity. Spectroscopic analysis (FTIR) of the biomass samples revealed the existence of several functional groups typical of a complex structure of carbohydrate and lipid nature. Therefore, strains of *C. (Pichia) pseudolambica* from mangroves of the Northeast region of Brazil showed potential for biosurfactant and lipase production, revealing the possibility of biotechnological use to be better explored.

KEYWORDS: Yeasts; *Pichia*; Surfactant; Bioemulsifiers; Biotechnology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Potencial biotecnológico de microrganismos de manguezais.....	15
2.2 Biossurfactantes	16
2.3 Produção de biossurfactantes por leveduras.....	20
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Microrganismos estudados.....	25
4.2 Reativação dos isolados.....	25
4.3 Triagem para seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes.....	26
4.3.1 Triagem inicial – Teste índice de emulsão (IE ₂₄ %).....	26
4.3.2 Teste índice de emulsão (IE ₂₄ %) após diferentes condições de cultivo.....	26
4.4 Curva de crescimento	27
4.5 Teste de produção de lipase.....	29
4.6 Avaliação das propriedades tensoativas.....	30
4.6.1 Teste colapso da gota.....	30
4.6.2 Teste Parafilm® M	31
4.6.3 Ensaio de deslocamento de óleo.....	31
4.7 Extração dos biossurfactantes.....	31
4.7. Determinação do rendimento da biomassa	32
4.8 Avaliação da tensão superficial	32
4.8 Avaliação do efeito de diferentes temperaturas, salinidade e pHs sobre a estabilidade dos biossurfactantes:.....	33

4.8.1 Efeitos de diferentes temperatura.....	33
4.8.2 Efeitos de diferentes pHs.....	33
4.8.3 Efeitos da salinidade.....	34
4.9 Atividade emulsificante em diferentes hidrocarbonetos.....	34
4.10 Avaliação da capacidade de crescimento e da atividade de emulsão (IE ₂₄ %) dos isolados em querosene e petróleo.....	34
4.11 Quantificação de proteínas totais.....	34
4.12 Análise de açúcares totais e açúcares redutores.....	36
4.13 Análise da biomassa por espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.14 Análises Estatísticas.....	39
5 RESULTADOS.....	40
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO.....	71
8 PERSPECTIVAS.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
APÊNDICES.....	94

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem a finalidade de utilizar sistemas biológicos e suas biomoléculas para aplicação tecnológica e geração de atividades de interesse econômico e social (CAVALLI, 2020). A bioprospecção de novos compostos tem permitido o avanço da biotecnologia, a partir do metabolismo dos microrganismos, selecionando espécies de maior potencial metabólico oriundas de ecossistemas naturais como estratégia ao desenvolvimento de inovadores processos (SANTOS, 2008; DIAS *et al.*, 2017).

No Brasil, estudos de bioprospecção aumentaram na última década, principalmente em biomas, relacionados com seu o valor de biodiversidade, exploração de conhecimentos e inovação de produtos (MARQUES *et al.*, 2014). Nesse sentido, a bioprospecção é um instrumento científico que visa pesquisar de maneira sistemática organismos, compostos e processos a partir de ecossistemas peculiares, com vistas ao desenvolvimento de novos produtos e aplicações biotecnológicas (AZEVEDO, 2003; JUNIOR, 2012; FILHO; SILVA; BIGI, 2014).

Os ecossistemas aquáticos são considerados excelentes fontes de novos compostos que merecem atenção (SAIMMAI *et al.*, 2013; DOMINGOS *et al.*, 2015; HANZA *et al.*, 2017; KUBICKI *et al.*, 2019). Entre esses, destacam-se os manguezais, que são ambientes dinâmicos, únicos e que abrigam muitos microrganismos com potencial biotecnológico. Tais microrganismos são naturalmente expostos às variações da maré, sofrem alterações de temperatura, salinidade e pH, tornando esse habitat um reservatório de biomoléculas importantes, sejam elas oriundas de bactérias ou leveduras (THATOI *et al.*, 2013).

Entre as biomoléculas de importância biotecnológica, os biossurfactantes são compostos que podem ser de origem microbiana, com propriedades surfactantes e de emulsificação (SINGH; PATIL; RALE, 2018). Tais compostos são possíveis alternativas à substituição parcial ou total de surfactantes sintéticos e podem ser aplicados em atividades alimentícias, cosméticas e outras (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008; BANAT *et al.*, 2014; JIMON; LIN, 2019).

Atualmente, são conhecidas mais de 2000 moléculas com ação surfactante no mundo todo (KUBICKI *et al.*, 2019). O Brasil tem se destacado entre os países da América Latina no quesito de produção de biossurfactantes e detenção de patentes (BRUMANO; SOLER; SILVA, 2016).

Estas moléculas possibilitam um cenário mais vantajoso de uso em relação aos surfactantes químicos disponíveis (ARAÚJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013) devido à baixa toxicidade, estrutura química simples, ação biocompatível e elevada seletividade pertinente à presença de grupos funcionais específicos, o que possibilita aplicações sob diversas condições de ambientes (FAKRUDDIN, 2012; VECINO *et al.*, 2015; IBRAHIM, 2018). Tais características conferem-lhes um papel importante em processos de emulsificação e formação de espumas (SANTOS *et al.*, 2016).

Fungos e bactérias são alternativas importantes à produção de biossurfactantes (GRAN-SCHEUCH *et al.*, 2017; ARUMUGAM *et al.*, 2017). Nesse contexto, as leveduras presentes em ambientes naturais desenvolveram processos metabólicos adaptativos a condições adversas, como as presentes nos manguezais, produzindo uma variedade de moléculas que lhes conferem tolerância aos fatores ambientais estressantes (BALAN, 2019). Dentre as espécies que têm se destacado com potencial para a produção de biossurfactantes destacam-se aquelas pertencentes ao gênero *Candida* (BENJAMIM; PANDEY, 1998; ACCORSINI, 2010; BARRIUSO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016; KAUR; SANGWAN; KAUR, 2017; SILVA *et al.*, 2018; RODRÍGUEZ-SALARICHS *et al.*, 2021).

O estudo do potencial de produção de biossurfactantes a partir de leveduras de manguezais é crucial, uma vez que esse ecossistema apresenta um perfil microbiano promissor a ser explorado (FRANÇA, 2014), pois a descrição de microrganismos provenientes desse ambiente ainda não recebeu a mesma atenção que ocorre em outros ecossistemas, tornando-o um objeto de pesquisa ainda mais interessante (THATOI *et al.*, 2013).

Nessa perspectiva, o presente estudo objetivou selecionar e caracterizar leveduras isoladas de sedimentos de manguezais à produção de biossurfactantes, de forma a gerar alternativas biotecnológicas relevantes à substituição daqueles compostos de origem sintética.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Potencial biotecnológico de microrganismos de manguezais

O Brasil abriga um extenso território de manguezais, equivalente a cerca de 50% da área total de manguezais da América Latina, com aproximadamente 120 locais de preservação no país (SANTOS *et al.*, 2014). Porém, existe um elevado processo de perdas e ações antrópicas, principalmente nas regiões Sudeste e Norte, com dados estimando perdas de cerca de 40% de extensões contínuas de manguezais (BRASIL, 2018).

Em Alagoas, as informações disponíveis mostram que dos 230 km² que formam a região costeira do estado, 150,91 km² são configurados pelos manguezais. Nessa extensão costeira é possível observar um destaque, por exemplo, para o rio Santo Antônio, que assim como muitos outros dessa região possui uma vasta biodiversidade e importância econômica e social (SINDJUSAL, 2014).

Os manguezais são um dos ecossistemas mais biodiversos do planeta, sendo de extrema importância para o funcionamento e manutenção da vida. Participam do ciclo de carbono, como ocorre nas grandes florestas tropicais, incluindo na Amazônia (BRASIL, 2018). Nesse contexto, esse ecossistema faz parte de regiões tropicais distribuídos em todo o mundo, que sofrem influência das marés. Os seus resíduos no solo são compostos ricos e abundantes, que possuem pouca oxigenação com diversas alterações de salinidade e nutrientes (HOLGUIN *et al.*, 2006; BEHERA *et al.*, 2014; GODOY; LACERDA, 2015).

O solo dos manguezais é principalmente constituído por matéria orgânica com sedimento, onde conjuntos de microrganismos desempenham atividades biológicas importantes, como a ciclagem de nutrientes (HOLGUIN *et al.*, 2001; DANOVARO *et al.*, 2002). Enquanto que a sua vegetação particular é resistente a diversas mudanças climáticas, e desempenha função de berçário para reprodução de diversos organismos marinhos, têm ganhado cada vez mais importância (COLARES; MELO, 2013).

O equilíbrio e funcionamento desse ecossistema também depende da função e estrutura dos microrganismos (NGUYEN *et al.*, 2017). Alguns estudos relatam ser na superfície do sedimento que existe uma diversidade de microrganismos que são resistentes a alterações de estresse do meio como salinidade, quantidade de luz disponível, minerais, temperatura e outras (AZMAN *et al.*, 2015; TIRALERDPANICH

et al., 2018), sendo possível encontrar uma abundância de bactérias, fungos, microalgas como parte desse ecossistema.

Diversos estudos buscam descrever a diversidade de microrganismos associados no solo de manguezais e sua importância biotecnológica (DIAS *et al.*, 2009; PATRA; MISHRA; THATOI, 2020; ELIZONDO *et al.*, 2021; TAVARES *et al.*, 2021). Dentro do grupo de microrganismos, os fungos têm notoriamente desempenhado um papel crucial como alternativas à produção de novos compostos com aplicações, por exemplo, à obtenção de xilitol (KAMAT *et al.*, 2013), óleos extracelulares para a produção de biodiesel (JIA *et al.*, 2020), além de compostos antimicrobianos (BALASUBRAMANIAN; SHANMUGASUNDARAM, 2016). Além disso, relatos de biossurfactantes com atividades tensoativas identificados a partir de microrganismos de manguezais são encontrados na literatura (SAIMMAI *et al.*, 2012; MARTINHO *et al.*, 2019; NETO *et al.*, 2020).

Dessa forma, a variedade de recursos naturais dos manguezais pode contribuir para o campo biotecnológico, pois sabe-se que esses ambientes ainda permanecem inexplorados em sua maioria, e neles há uma diversidade de novos metabólitos e atividades biológicas a explorar (DESHMUKH *et al.*, 2018).

2.2 Biossurfactantes

Os surfactantes são substâncias anfipáticas que contribuem para a diminuição da tensão superficial da água, com capacidade de formar agregados/micelas que agem em misturas com níveis, polaridades e fases distintas (ABADE *et al.*, 2022). São compostos inertes, que fazem parte dos constituintes químicos de diversos produtos, por exemplo, de herbicidas, de produtos de limpeza e biomédicos (WAGNER; MARENGO; PLEWA, 2003; CARRASCHI *et al.*, 2011; MAHJoubi *et al.*, 2013; VARJANI; UPASANI, 2016).

Essas moléculas sintéticas podem ser produzidas quimicamente a partir de derivados de petróleo, e diferente dos surfactantes biológicos podem ser classificadas com base em sua estrutura química em até quatro categorias principais: anfóteros (grupos funcionais carregados positivamente ou negativamente, são capazes de se comportar como ácidos ou bases dependendo do pH), catiônicos (carga positiva), aniônicos (carga negativa) e não-iônicos (não possuem carga), dependendo também

do domínio polar da molécula (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; DALTIM 2011; FELIPE-OLIVEIRA; DIAS, 2017).

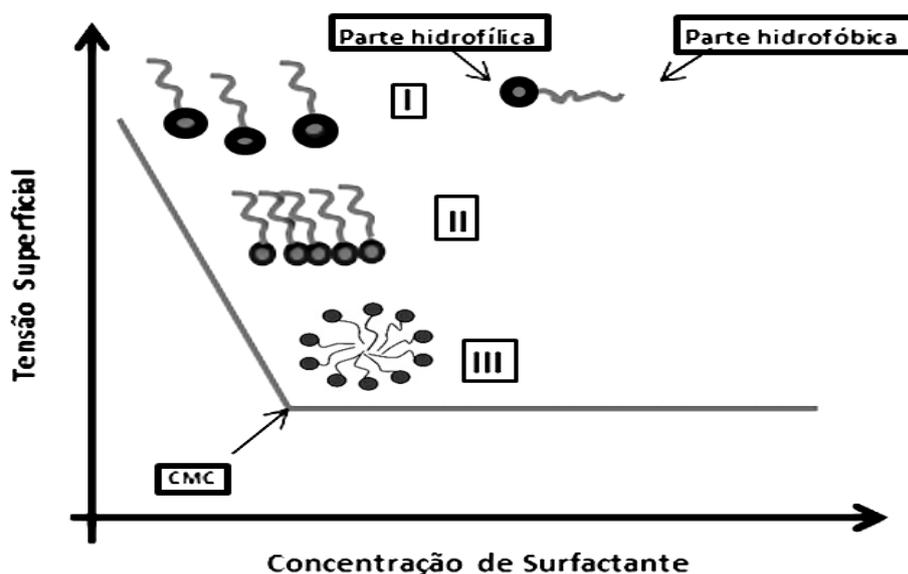
No entanto, nos últimos anos mais atenção tem sido direcionada para os efeitos indesejáveis provocados pelos surfactantes sintéticos ao ambiente, pois possuem baixa biodegradabilidade, e podem formar resíduos persistentes e biologicamente tóxicos, despertando mais interesse científico no campo de exploração de estudos com surfactantes de origem microbiana (NITSCHKE; PASTORE, 2002; CHAPRÃO, *et. al*, 2015).

Os surfactantes de origem microbiana são chamados de biossurfactantes e são produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Possuem uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica, apresentam variados tamanhos e sua classificação considera a sua origem e a estrutura química das moléculas (FELIX, 2012; ANTONIOU *et al.*, 2015; SHARMA; SAGWAN; KAUR, 2019). Assim, conforme a estrutura química formada os biossurfactantes podem ser categorizados em: glicolipídios, lipopeptídeos, fosfolipídios e polissacarídeos (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008; CHAPRÃO, *et. al*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016).

Além disso, a classificação dos biossurfactantes depende também da massa molecular desses compostos. Assim, aqueles que possuem alta massa molar são denominadas de bioemulsificantes, pois atuam melhor na estabilização das emulsões óleo e água (SOUZA; BHOSLE, 2012). Já as moléculas tensoativas que apresentam menor massa molecular e reduzem a tensão superficial entre fases que não conseguem formar um líquido homogêneo quando misturadas são denominados biossurfactantes (WILLUMSEN *et. al.*, 1997; BRUMANO, 2016).

É importante destacar que algumas características, como baixa concentração micelar crítica (CMC), baixa toxicidade e alta atividade emulsificante, são fundamentais para um biossurfactante de qualidade (COLARES; MELO, 2013). A CMC é responsável por determinar a eficiência da ação surfactante e indicar as concentrações mínimas necessárias para a formação de micelas. Uma vez formadas as micelas, a tensão superficial e interfacial diminuem, o que aumenta a eficácia do biossurfactante, como ilustrado na Figura 1 (BARROS *et al.*, 2007; STEINBÜCHEL, 2011).

Figura 1. Esquema estrutural dos biossurfactantes. I. Caracterização estrutural; II. Monômeros; e III. Formação das micelas.



Fonte: Adaptado de (ISLAS; MORENO; RODRÍGUEZ, 2010; SANTOS *et al.*, 2021)

É importante destacar que o processo de biossíntese de biossurfactantes é altamente complexo e varia de acordo com a espécie microbiana e as condições ambientais em que ocorre. Além disso, pode ocorrer de maneira extracelular, intracelular ou estar completamente associados às membranas celulares (BANAT *et al.*, 2014). Esse processo envolve a produção e secreção de compostos tensoativos na célula microbiana e pode ocorrer por meio de dois mecanismos principais: via de ácido graxo e via de aminoácido (KUYUKINA *et al.*, 2015).

Na biossíntese de moléculas tensoativas, quando os microrganismos liberam de forma extracelular, essas moléculas podem permanecer aderidas à membrana celular e, dependendo da sua ligação com esse componente ultraestrutural, definir o tipo de atividade que a molécula irá desempenhar (SATPUTE *et al.*, 2010). É bem conhecido que a capacidade de excretar biossurfactantes potencializa a solubilidade de compostos hidrofóbicos pela célula, favorecendo a disponibilidade de substrato. No entanto, quando o biossurfactante está presente na parede celular, ocorre uma melhor aderência e adesão do microrganismo a diferentes superfícies hidrofóbicas, contribuindo para os processos de colonização (RAMKRISHNA, 2010).

Além disso, levando em consideração os componentes estruturais envolvidos na biossíntese dessas moléculas, elas podem ser classificadas como glicolipídios,

fosfolipídios e lipopeptídeos, geralmente apresentando baixa massa molecular em comparação com compostos de natureza protéica (FENIBO; IBIETELA-DOUGLAS; STANEY, 2019). Dessa forma, existe uma vasta variedade de biossurfactantes relatados na literatura, como os ramnolipídios e soforolipídeos, conforme apresentado na Tabela 1, que mostra os principais tipos de biossurfactantes para as principais classes mencionadas na literatura (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010; LAWNICZAK *et al.*, 2013; CORTÉS-SÁNCHEZ *et al.*, 2013; SOBRERÓN-CHÁVEZ *et al.*, 2021; QAZI; WANG; DAI, 2022).

Tabela 1. Classificação dos biossurfactantes de acordo com a estrutura molecular e a origem microbiana.

Biossurfactantes		Microrganismo Produtor
Glicolipídeos	Soforolipídeos	<i>Candida bombicola</i>
	Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida lipolytica</i>
	Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Lipídeos Manosileritrol (MEL)	<i>Ustilago scitaminea</i>
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	Iturina A	<i>Bacillus subtilis</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Surfactina/ Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida utilis</i>
	Peptídeo-Lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
	Artrofactina	<i>Artrobacter sp.</i>
Ácidos graxos, fosfolipídeos, lipídeos neutros	Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Pseudomonas marginalis</i>

Fonte: Adaptado de NITSCHKE; PASTORE (2002); BANAT *et al.*, (2010); SANTOS *et al.*, (2016); FELIPE; DIAS (2017).

Quanto às principais funções dos biossurfactantes para os microrganismos produtores, destaca-se o transporte de hidrocarbonetos através da membrana e o potencial de modificar substratos com características mais hidrofóbicas em formas

mais biodisponíveis, permitindo um melhor crescimento nesses substratos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; OCAMPO, 2016). Além disso, alguns biossurfactantes apresentam atividade antimicrobiana, que favorece o microrganismo produtor nas relações ecológicas e na competição por nutrientes (LIMA, 2013).

Os processos de produção de biossurfactantes podem ser induzidos em escala através de diferentes fatores, tais como a presença de compostos lipofílicos, gradientes térmicos, velocidade de agitação, ou ainda, durante o crescimento celular sob situações de estresse, como a baixa concentração de fontes de carbono, nitrogênio e outros fatores físico-químicos (DESAI; BANAT, 1997; SANTOS *et al.*, 2016).

No que se refere às fontes de resíduos para utilização como substratos de baixo custo para o crescimento de microrganismos, o reaproveitamento de materiais que demandam preocupação ambiental é considerado relevante, a exemplo do bagaço da cana-de-açúcar (CHAVES, 2017), óleos vegetais (SARUBBO; FARIAS; CAMPOSTAKAKI, 2007; GUDIÑA; RODRIGUES, 2019), melação (KALOGIANNIS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2020), licor de milho (LÓPES-PRIETO *et al.*, 2021; RIBEIRO; GUERRA; SARUBBO, 2020), entre outros.

É notório que os biossurfactantes são agentes tensoativos promissores, o que os tornam adequados para aplicações em processos como biodegradação e tratamento de resíduos, pois apresentam uma menor tensão superficial em baixas concentrações em relação os surfactantes sintéticos, demonstrando boa tolerância à temperatura, pH e força iônica, e baixa toxicidade (ALMEIDA *et al.*, 2020).

Assim, nos últimos anos tem aumentado o interesse no campo da pesquisa e do desenvolvimento tecnológico dos biossurfactantes, já que sua produção é considerada um recurso sustentável e que pode contribuir, por exemplo, em práticas de biorremediação de ambientes marinhos contaminados com hidrocarbonetos (JIMOH; LIN, 2019; DERGUINE-MERCHERI; GANA-KEBBOUCHE; DJENANE, 2021).

2.3 Produção de biossurfactantes por leveduras

Leveduras são microrganismos que pertencem ao reino *Fungi*. Sua forma de reprodução ocorre por gemulação ou brotamento, e podem apresentar diferentes morfologias celulares dependendo da forma em que ela for cultivada. Por exemplo,

existem leveduras com formato ovóides, globosas, elipsoidal, cilíndricas, alongadas e outras. Esse grupo de organismos unicelulares pode possuir também colônias com uma variedade de características, desde colônias cremosas ou secas, rugosas ou lisas, até as com diferentes colorações (KURTZMAN; FELL, 1998; CARVALHO *et al.* 2006; STARMER; LACHANCE, 2011; BORTOLI *et al.*, 2013). Esses microrganismos estão distribuídos taxonomicamente em dois filos, Ascomycota e Basidiomycota (KURTZMAN; BOEKHOUT, 2017).

A constituição da parede celular das leveduras é composta aproximadamente de 90% de polissacarídeos sendo em sua maior parte β -glucanos, quitina, manoproteínas e proteínas que percorrem moléculas de glicolipídeos e glicanos (FLEET *et al.*, 1985; WANG *et al.*, 2018), contribuindo com a rigidez e elasticidade da parede celular (HURTADO-GUERRERO *et al.*, 2009; HAPALA *et al.*, 2013).

Uma das vantagens das leveduras na produção de biossurfactantes é a sua parede celular rígida, o que permite uma produção em elevadas concentrações regulando as propriedades de superfície. Além disso, as leveduras são menos suscetíveis à lise celular promovida pelos próprios biossurfactantes, tornando a produção mais econômica e viável (COOPER; PADDOCK, 1984; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Outra vantagem é que algumas leveduras possuem um perfil GRAS (Generally Regarded as Safe), o que significa que sua aplicação em alimentos, cosméticos, medicamentos e outros produtos é considerada segura pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (RIBEAUX, 2020; PINTO *et al.*, 2022).

Diversas leveduras se destacam na produção de compostos, por exemplo, a síntese de lipases (ZIENIUK; FABISZEWSKA, 2018; BALOCH *et al.*, 2021) e até mesmo moléculas mais complexas como os biossurfactantes (JEZIERSKA; CLAUS; BOGAERT, 2017; NANDY; SRIVASTAVA, 2017; JIA *et al.*, 2020). Nesse aspecto, as leveduras oriundas de diferentes ambientes apresentam boa capacidade de produção quando se trata de compostos tensoativos e enzimáticos podendo contribuir com diferentes aplicações (COLLA *et al.*, 2011; SABU, MUFEEDHA, PRAMOD, 2019).

A obtenção de biossurfactantes pode ser realizada a partir de diversas fontes, como microrganismos, vegetais e animais (CHANDRA *et al.*, 2020). No entanto, a produção dessas moléculas com atividade tensoativa por microrganismos é de grande interesse estratégico (SPERB *et al.*, 2015).

Um exemplo do potencial das leveduras produtoras de biossurfactantes pode ser encontrado no estudo de Morita e colaboradores (2012), que ressaltam a

importância do lipídio manosileritritol (MEL), um biossurfactante frequentemente produzido por leveduras, que pode apresentar atividade interfacial e ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Enquanto que a biomolécula denominada de lunasan, produzida por *Candida sphaerica* UCP 0995, foi descrita como um potencial agente com atividade antimicrobiana contra *Streptococcus oralis* (68%), *Candida albicans* (57%) e *Staphylococcus epidermidis* (57,6%) (LUNA *et al.*, 2011).

É importante mencionar também um estudo sobre a caracterização de biossurfactante produzido pela levedura *Meyerozyma guilliermondii*, onde foi possível observar que os glicolipídeos oriundos da levedura apresentaram resultados promissores para a remoção de cádmio de sedimentos (CAMARGO *et al.*, 2018).

Uma abordagem interessante presente na literatura ressalta também que leveduras podem ser aplicadas para a produção de biossurfactantes, quando são associadas e combinadas com mecanismos de cultivo diferentes e de baixo custo, por exemplo, água residual, meios combinados com glicose, óleo de soja e entre outros nutrientes (SANTOS *et al.*, 2013).

Já na indústria de alimentos, as espécies *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, são relatadas como boas produtoras de moléculas emulsificantes utilizadas em molhos de salada processados e à estabilização de emulsões de alimentos industrializados (TORABIZADEH *et al.*, 1996; CAMPOS *et al.*, 2015; ADETUNJI; OLANIRAN 2020).

Com a finalidade de rastrear biossurfactantes produzidos por leveduras em manguezais, foram identificadas linhagens produtoras de glicolipídeos, o que é bastante inovador, tendo em vista que existem poucas leveduras descritas de áreas de manguezais com capacidade para produzir grande quantidade de glicolipídeo (PATEL; PATEL, 2020). Assim, nos últimos anos, foram feitos inúmeros esforços para otimizar os processos de fermentação com leveduras para a produção de biossurfactantes, o que aumentou o interesse nessa área (JEZIERSKA; CLAUS; BOGAERT, 2017).

Desse modo, os manguezais são importantes ambientes que possuem microrganismos alvos de produção de moléculas tensoativas (MARTINHO *et al.*, 2019). Portanto, é possível que existam novas espécies ainda não descritas, que podem ser isoladas de ambientes naturais. E é compreendido que o pouco

conhecimento sobre esses microrganismos em ecossistemas naturais, reforça a relevância de novos estudos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar leveduras oriundas de sedimentos de manguezais APA Costa dos Corais, Alagoas, à produção de biossurfactantes.

3.2 Objetivos específicos

- I. Selecionar potenciais leveduras produtoras de biossurfactantes isoladas de sedimentos de manguezais;
- II. Avaliar a atividade de emulsificação frente a diferentes condições de salinidade, pH e variações de temperatura, assim como a capacidade de emulsificação em diferentes hidrocarbonetos;
- III. Caracterizar os grupos funcionais da biomassa das linhagens selecionadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos estudados

As leveduras utilizadas fazem parte da micoteca do Laboratório de Diversidade Molecular (LDM) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os isolados de leveduras foram previamente obtidos a partir do sedimento de manguezais alagoanos dos rios Santo Antônio e Tatuamunha e identificadas por meio do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S (dados não publicados).

Inicialmente, foi utilizado um total de 45 isolados disponíveis na micoteca, sendo 43 isolados de leveduras e 2 isolados de microalgas. Em seguida, foi estabelecido um critério de seleção baseado em espécies sem relatos na literatura para produção de biossurfactantes, utilizando as palavras chaves “nome da espécie de levedura” e “biossurfactante”, nos idiomas português e inglês, nas bases de pesquisa PubMed e Google acadêmico. Assim, dos 45 isolados disponíveis, 40 não tinham relatos nas literaturas pesquisadas para produção de biossurfactantes. Os 5 isolados já reportados na literatura foram desconsiderados para as etapas seguintes. Dessa forma, os 40 isolados foram submetidos ao teste de triagem inicial (4.3.1).

4.2 Reativação dos isolados

Os isolados de leveduras selecionados foram reativados em meio YEPD sólido (2% de ágar, 2% de glicose, 1% de peptona e 0,5% de extrato de levedura) e incubados a $26 \pm ^\circ\text{C}$ durante 48h a partir de estoques em meio GYMP (2% de ágar, 2% de glicose, 2% de extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura e 0,3% de fosfato de sódio monobásico). Em seguida, foram repicados novamente utilizando a técnica de esgotamento para isolamento das colônias em meio YEPD e incubados a $26 \pm ^\circ\text{C}$ durante 48h. Após o crescimento das colônias, foi realizada a confirmação da identificação das características morfológicas dos isolados por microscopia óptica utilizando o aumento de 40x, e a conferência na ficha de identificação de dados dos isolados presentes na micoteca.

4.3 Triagem para seleção das leveduras produtoras de biossurfactantes

4.3.1 Triagem inicial – Teste índice de emulsão (IE₂₄%)

Os isolados selecionados passaram por uma triagem inicial utilizando o IE₂₄%, que significa o teste de índice de emulsão com leitura realizada após 24h quando realizado o processo de vórtex (IQBAL; KHALLD; MALIK, 1995). Os isolados foram inoculados em triplicata em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio YEPD líquido e incubados a 26± °C por 48h. Após este período, foi adicionado o mesmo volume de querosene, agitados em vórtex durante 2 min e mantidos em repouso por 24h para ser feita a leitura do IE₂₄%. Como controle positivo foram utilizados 2 mL de uma solução de SDS 1% (dodecil sulfato de sódio) adicionados a 2 mL de querosene. Como controle negativo, foram utilizados 2 mL de YEPD líquido sem inóculo adicionados a 2 mL de querosene.

Após as 24h e com auxílio de um paquímetro, foram medidos e anotados os valores da camada emulsificada e da altura total, e aplicando na seguinte equação:

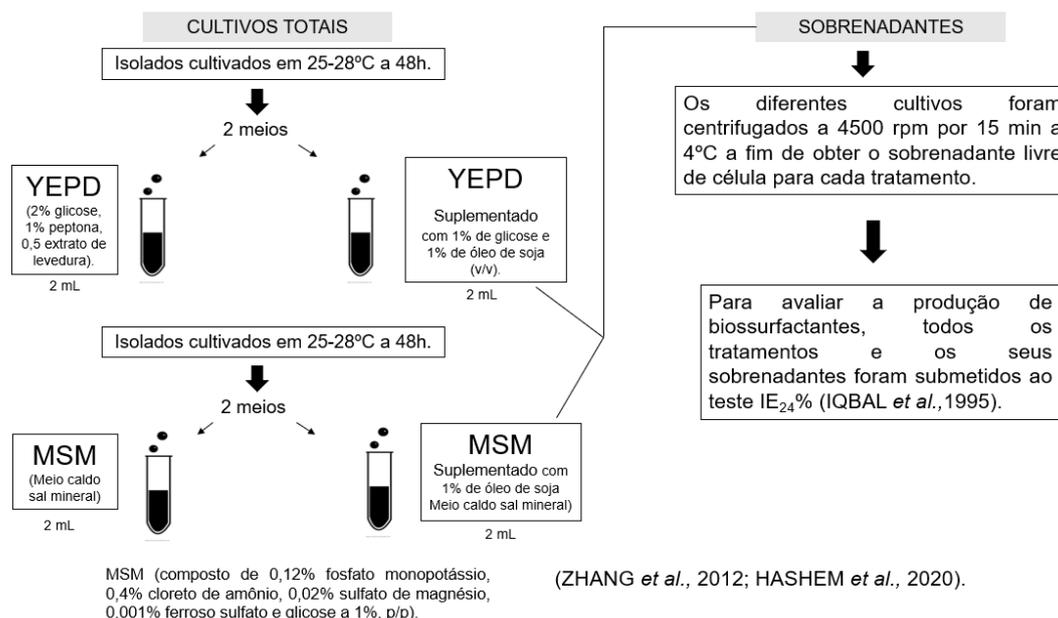
- $IE_{24}\% = \text{Camada emulsificada} / \text{Altura total} \times 100\%$

Os isolados que apresentaram atividade de emulsificação $\geq 50\%$ foram selecionados para a etapa seguinte, segundo preconiza Willumsen e Karlson (1997), onde um bom índice de emulsificação é aquele que atinge um valor $\geq 50\%$.

4.3.2 Teste índice de emulsão (IE₂₄%) após diferentes condições de cultivo

Os isolados que apresentaram valor de IE₂₄% $\geq 50\%$ foram inoculados em diferentes meios de cultivo para avaliar as melhores condições para a produção de biossurfactantes, conforme ilustrado no esquema apresentado na Figura 1.

Figura 1. Teste índice de emulsão (IE₂₄%) em diferentes condições de cultivo



Os óleos utilizados para suplementar os meios foram esterilizados a 160 °C durante 120 min em estufa de secagem e esterilização antes de serem adicionados aos meios.

O sobrenadante foi obtido através da centrifugação dos cultivos a 4500 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente, amostras contendo o cultivo total e os sobrenadantes foram submetidas aos testes do colapso da gota, teste Parafilm® M e ensaio de deslocamento de óleo.

4.4 Curva de crescimento

O preparo do pré inóculo dos isolados foi realizado em 10 mL de meio YEPD líquido e incubados a 26± °C por 48h. Após esse período, uma amostra de 100 µL foi retirada e colocada em uma câmara de Neubauer, que consiste em uma lâmina para microscopia projetada com uma espessura maior. Esta câmara contém pequenos compartimentos em sua parte central, que separam a amostra em quadrantes com dimensões estabelecidas. Cada câmara tem até 9 quadrados de contagem, cada um com 1mm² de área, obtendo assim um volume já conhecido de 0,1mm³. Assim, foram contadas as células nos 4 grandes quadrantes nas áreas laterais da câmara de contagem. Cada quadrante teve sua contagem em movimento zig-zag e dividido o valor por 4 para obter a média (MARTINS *et al.*, 1988; VARGAS, 2011).

Para fazer estimativa da quantidade células por mL de solução, foi seguido conforme Vargas (2011), onde na câmara e a quantidade de células é obtida com a contagem de um compartimento que possui um volume de $0,1\text{mm}^3$. Assim, para se obter o resultado em células/mL, foi necessário fazer uma correção, multiplicando o valor obtido por 10000 pois, sabendo que, 1 mL equivale a 1000mm^3 e que o volume da câmara é de $0,1\text{mm}^3$, então $10 \times 1000\text{mm}^3 = 10000$.

Dessa forma foi obtido o número de células/mL com a seguinte equação:

$N = N_t / Q \times D \times 10000$, onde:

N - número de células por mL;

N_t - valor total de células que foram contadas;

Q - quantidade de quadrantes contados;

D - o fator de diluição usado.

Após a contagem, foi medida a quantidade de células por absorbância em espectrofotômetro com o comprimento de onda fixado em 640 nm. Em seguida, foi também retirada do pré-inóculo uma alíquota de 1 mL diluída em 9 mL de água destilada estéril. Dessa diluição foram retirados 100 μL para semear com alça de drigalski em placas (triplicata) em meio YEPD sólido para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

Depois dos procedimentos realizados com o pré-inóculo, foram preparados inicialmente 100 mL de meio YEPD líquido em triplicata para cada isolado de levedura. Em seguida, foi calculado o volume da alíquota a ser retirada para fazer o inóculo em 100 mL de meio YEPD líquido, seguindo a fórmula abaixo:

$$(DO_{640\text{nm}})_{\text{inóculo}} \times V_{\text{inóculo}} = (DO_{640\text{nm}})_{\text{pretendida}} \times V_{\text{meio}}$$

Onde o valor de “ $DO_{640\text{nm}}$ inóculo” corresponde ao valor da absorbância medida no pré-inóculo.

Os meios foram divididos em:

1. YEPD líquido suplementado com 1% de óleo de soja estéril e 2. YEPD líquido sem óleo de soja.

Para avaliar o crescimento, após o inóculo das leveduras nos meios, foi realizada a leitura da densidade óptica utilizando o espectrofotômetro (D.O 640nm) utilizando meio sem inóculo como branco. Em seguida, foi realizada a leitura dos meios líquidos YEPD com 1% de óleo e sem óleo e registrada a absorbância a cada 24h, durante 7 dias. A cada 24h durante 7 dias, foi retirada uma alíquota de 100 μL do meio líquido YEPD e inoculada em placas com YEPD sólido, semeada com alça de

drigalski em placas (triplicata) para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

Também a cada 24h durante 7 dias, foram retirados 2 mL dos cultivos e realizada a leitura do $IE_{24\%}$, conforme descrito anteriormente.

Foram preparados pré-inóculos das linhagens em 10 mL de YEPD líquido e incubados a $26 \pm ^\circ\text{C}$ por 48h. Após esse período, uma amostra de 100 μL foi retirada e realizada a contagem em câmara de Neubauer para fazer a estimativa da quantidade de células por mL de solução, em seguida foi medida a quantidade de células por absorbância com o comprimento de onda fixado em 640 nm (MARTINS *et al.*, 1988. E seguida, foi retirada do pré-inóculo uma alíquota de 1 mL diluída em 9 mL de água destilada estéril. Dessa diluição foram retirados 100 μL para semear em placas (triplicata) em meio YEPD sólido para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Para avaliar o crescimento, após o inóculo das leveduras nos meios, foi realizada a leitura da densidade óptica utilizando o espectrofotômetro (D.O 640nm) utilizando meio sem inóculo como branco. Em seguida, foi realizada a leitura dos meios líquidos YEPD com 1% de óleo e sem óleo e registrada a absorbância a cada 24h, durante 7 dias. A cada 24h durante 7 dias, foi retirada uma alíquota de 100 μL do meio líquido YEPD e inoculada em placas com YEPD sólido a cada 24h durante 7 dias, foram retirados 2 mL dos cultivos e realizada a leitura do $IE_{24\%}$

4.5 Teste de produção de lipase

O teste para a detecção da atividade de lipase foi realizado devido à observação do aspecto das emulsões realizadas na presença de óleo de soja, tendo em vista que as mesmas apresentaram emulsões com formação de bolhas e com baixa estabilidade. Assim, nossa hipótese era de que as leveduras poderiam estar produzindo enzimas lipolíticas e estas, interferindo no aspecto das emulsões.

Nesse teste, foram preparados 30 mL do meio Ágar tributirina (2% de peptona, 0,1% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, 2% de ágar, 1% de tributirina líquida) em triplicata. Após a preparação, foram padronizados os inóculos correspondentes a 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, foram pipetados 10 μL

dos isolados no centro das placas e incubadas a $26 \pm ^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após, foi realizada a leitura com a finalidade de observar a atividade de produção de lipase através da existência de um halo translúcido perceptível ao redor das colônias inoculadas quando a placa foi colocada contra a luz. Os isolados com formação de halo tiveram os mesmos medidos com auxílio de um paquímetro, e os valores foram aplicados a seguinte fórmula:

$$Pz = \text{Tamanho da colônia} / \text{tamanho da colônia} + \text{tamanho do halo}$$

4.6 Avaliação das propriedades tensoativas

4.6.1 Teste colapso da gota

Essa metodologia foi proposta por Bodour e Miller-Maier (1998) e consiste no uso de uma placa de poliestireno com 96 poços identificada para cada tratamento para distribuir o óleo de motor. Foram adicionados 100 μL de óleo de motor a cada poço nas placas dos tratamentos A-H. As placas de todos os tratamentos foram mantidas em repouso por 24h para proporcionar um revestimento uniforme do óleo nos poços. Após 24h de repouso, nos poços de cada placa de poliestireno com óleo de motor identificadas com os diferentes tratamentos foram adicionados 20 μL de cada um dos tratamentos, conforme a seguir:

- A. Cultivo total em YEPD sem óleo de soja;
- B. Cultivo total em YEPD com 1% de óleo de soja;
- C. Cultivo total em MSM sem óleo de soja;
- D. Cultivo total em MSM com 1% de óleo de soja;
- E. Sobrenadante livre de células do cultivo em YEPD sem óleo de soja;
- F. Sobrenadante livre de células do cultivo em YEPD com 1% de óleo de soja;
- G. Sobrenadante livre de células do cultivo em MSM sem óleo de soja;
- H. Sobrenadante livre de células do cultivo em MSM com 1% de óleo de soja.

Os resultados do teste foram registrados e determinados visualmente após 1 min de repouso. As culturas produtoras de biossurfactantes que formam gotas planas, com propagação parcial a completa na superfície do óleo, foram pontuadas como

positivas, de + até ++++ para produção de surfactante. As culturas que formaram gotas arredondadas foram considerada negativas.

4.6.2 Teste Parafilm® M

O teste de parafilm M foi realizado em triplicata de acordo com Eldim, Kamel e Hossan (2019), onde foi utilizada uma tira de Parafilm® M para cada um dos 8 tratamentos citados no item 4.6.1

Em seguida, foram adicionados 20 µL de cada tratamento na tira de Parafilm® M. Aguardou-se a estabilização da gota por até 1 min. Posteriormente, a forma e o diâmetro da gota foram observados e anotadas.

As amostras que apresentaram a forma plana da gota indicam presença de biossurfactante, com sistema de pontuação que varia entre "+" e "+++++" e correspondente de espalhamento parcial a completo da gota na superfície. Foi utilizado SDS 1% como controle positivo, enquanto que YEPD e MSM estéreis sem inóculo como controles negativos.

4.6.3 Ensaio de deslocamento de óleo

Nesse ensaio foram utilizadas placas de Petri (150 mm de diâmetro) em triplicatas para cada um dos tratamentos descritos anteriormente, onde foram adicionados 40 mL de água do mar. Após, foram adicionados 10 µL de petróleo bruto à superfície da água do mar (SHARMA *et al.*, 2019). Em seguida, foram adicionados 10 µL de cada uma das amostras dos tratamentos citados no item 4.6.1 no centro da membrana de petróleo.

Após 2 min, foi observada a formação de uma halo de dispersão medindo o diâmetro da zona clara ao redor do centro onde as amostras foram colocadas com auxílio de um paquímetro. Foi utilizado SDS 1% como controle positivo, enquanto que YEPD e MSM estéreis sem inóculo como controles negativos.

4.7 Extração dos biossurfactantes

Esse método foi seguido conforme preconiza KRELING *et al.* (2019). Foram preparados 2 L de meio YEPD líquido em frascos tipo Erlenmeyer. Em seguida, os isolados foram inoculados e incubados à 26± °C, durante 168 h. Após este período, os cultivos foram transferidos para tubos tipo Falcon estéreis e centrifugados a 5000

rpm, durante 20 min, à 25 °C. Em seguida, o sobrenadante foi separado da biomassa, adicionaram-se 15 mL de etanol 95%, contendo 10 mL de ácido acético 1% (v.v⁻¹), os quais foram refrigerados por 16 horas, à 4 °C, para testes posteriores.

As células da biomassa foram suspensas em 10 mL de solução tampão de citrato de sódio 0,1 mol/L⁻¹ e metabissulfito de potássio 0,02 mol/L⁻¹ pH 7. Em seguida, foram autoclavadas à 121°C durante 2 h. Ao finalizar o processo, foram adicionados à biomassa 10 mL de água destilada estéril, agitados em vórtex por 30 s, e em seguida foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min, à 25 °C.

Após, foi retirado 1 mL da biomassa ressuspensa, e diluída em 9 mL de água destilada estéril (duplicata). Um dos tubos da duplicata foi em seguida colocado em um equipamento de Banho Ultra-sônico Alpha 3L Plus durante 30 min, com o objetivo de avaliar os efeitos do processo de sonicação na liberação dos biossurfactantes aderidos à parede celular. Assim, foram obtidos três tratamentos: 1) sobrenadante do cultivo total; 2) sobrenadante da biomassa sonicada; e 3) sobrenadante da biomassa não sonicada.

Em seguida, foi realizado o índice de emulsão (IE_{24%}) com as amostras dos tratamentos 1, 2 e 3.

4.7. Determinação do rendimento da biomassa

Com auxílio de uma balança analítica previamente calibrada, foi realizada a pesagem de placas de petri estéreis sem a biomassa e com a biomassa para cada amostra, e os valores foram anotados e calculado o rendimento da biomassa para cada amostra. Em seguida, a biomassa foi submetida à secagem por calor em estufa a 40°C. Após a secagem, a mesma foi colocada em tubos tipo Falcons identificados e armazenada em ultra-freezer -80 °C.

4.8 Avaliação da tensão superficial

O potencial dos biossurfactantes em diminuir a tensão superficial da água foi analisado através de um tensiômetro do modelo Theta, Attension Instruments, onde foram feitas 5 medições por amostras. Nesse teste foi avaliada a tensão superficial dos cultivos totais e dos sobrenadantes da biomassa sonicado e não sonicados. Os sobrenadantes da biomassa foram obtidos segundo os procedimentos explicados no

item 4.6 da seção material e métodos. Foram utilizados o sobrenadante da biomassa e o sobrenadante da biomassa pós sonicação a base de água. Os sobrenadantes foram previamente filtrados em membrana de 0,22 μM . Foi utilizado SDS 1% (m/v) como controle positivo e água destilada estéril como controle negativo.

Para cada amostra, uma gota foi analisada digitalmente com o auxílio de uma câmera digital com uma elevada resolução de até 60 fps. A medida de tensiometria óptica estabeleceu medições com gotas com volumes entre 8 e 10 μL , durante 15 s.

4.8 Avaliação do efeito de diferentes temperaturas, salinidade e pHs sobre a estabilidade dos biossurfactantes:

Os testes que avaliam os efeitos da temperatura, pH, e condições de salinidade sobre a atividade do biossurfactante, foram realizados seguindo a metodologia descrita por Ganji *et al.*, 2020.

4.8.1 Efeitos de diferentes temperatura

Primeiramente, os isolados foram cultivados em meio 4 mL YEPD Líquido a $26 \pm$ $^{\circ}\text{C}$ por 48h. Foi utilizado um volume de 4 mL tendo em vista que durante o teste de temperatura pode ocorrer evaporação do meio de cultura. Assegurando assim o volume necessário para o teste ($\text{IE}_{24\%}$). Após as 48h de crescimento, os cultivos foram submetidos à exposição em diferentes temperaturas (90 $^{\circ}\text{C}$, 100 $^{\circ}\text{C}$, 110 $^{\circ}\text{C}$, 120 $^{\circ}\text{C}$ e 150 $^{\circ}\text{C}$) durante 30 min. Em seguida, 2 mL dos cultivos submetidos às temperaturas foram transferidos para um outro tubo esteril e adicionados 2 mL de querosene para realizar o teste do índice de emulsão ($\text{IE}_{24\%}$) (Ganji *et al.*, 2020).

4.8.2 Efeitos de diferentes pHs

Os isolados foram cultivados em 5 mL de YEPD Líquido a $26 \pm$ $^{\circ}\text{C}$ durante 48h. Após o crescimento, os cultivos foram transferidos para tubos estéreis e tiveram o seu pH ajustado para 2, 4, 6, 8 e 10, com HCl 1% ou NaOH 1%, e incubados por 30 min. Em seguida, foram adicionados 2 mL dos cultivos em tubos de ensaio estéreis 2 mL de querosene para ser realizado o teste $\text{IE}_{24\%}$.

4.8.3 Efeitos da salinidade

Os isolados foram cultivados em 5 mL de YEPD líquido a $26\pm$ °C por 48h. Após o crescimento, os cultivos foram transferidos para tubos estéreis e sua concentração de salinidade foi ajustada para 2, 4, 6, 8 e 10% (m/v) utilizando NaCl seguido de incubação a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, foram adicionados 2 mL dos cultivos em tubos de ensaio estéreis e 2 mL de querosene para ser feito o teste IE₂₄%.

4.9 Atividade emulsificante em diferentes hidrocarbonetos

Nessa etapa foram realizados testes de IE₂₄% com o cultivo total das amostras. Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 2 mL de YEPD líquido e incubados a $26\pm$ °C por 48h. Após esse período, foi realizado o IE₂₄% com diferentes hidrocarbonetos: tolueno, hexano, óleo lubrificante, óleo de motor e diesel. Após esse procedimento, as amostras foram agitadas em vórtex por 2 min. Em seguida, as amostras foram mantidas em repouso durante 24 h para ser realizada a leitura e o cálculo conforme a equação do IE₂₄% (IQBAL; KHALLD; MALIK, 1995).

4.10 Avaliação da capacidade de crescimento e da atividade de emulsão (IE₂₄%) dos isolados em querosene e petróleo

Os isolados foram inoculados em três meios de cultura: YEPD líquido modificado 1 (2% de querosene, 1% de peptona, 0,5 % de extrato de levedura), YEPD líquido modificado 2 (2% de petróleo 1% de peptona, 0,5 % de extrato de levedura) e YEPD líquido como controle positivo (2% de glicose, 2% de extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura) incubados a $26\pm$ °C por 48h. Após esse período, foi observada a existência de crescimento nos meios líquidos através da turvação e em comparação com o controle negativo (YEPD líquido sem inóculo). Em seguida, para confirmação da capacidade de crescimento dos isolados, foram realizados repiques em YEPD sólido para observar o crescimento das colônias. Os cultivos considerados positivos em YEPD líquido modificado 1 e 2 foram submetidos ao teste IE₂₄%.

4.11 Quantificação de proteínas totais

O método de Bradford foi utilizado para medir a concentração de proteínas em uma solução (BRADFORD, 1976). Após a obtenção dos diferentes tratamentos a

partir dos cultivos em YEPD líquido a $26 \pm ^\circ\text{C}$ por 168h, relatados no item 4.6: (1. sobrenadante do cultivo; 2. sobrenadante da biomassa sonicada; 3. sobrenadante da biomassa não sonicada, as amostras obtidas foram submetidas ao teste de Bradford para determinar a concentração de proteínas presentes.

O reagente de Bradford foi obtido comercialmente já preparado para utilização direta. Enquanto que para a albumina sérica bovina (BSA) foi preparada uma solução estoque ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, até $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Em seguida, foi elaborada uma curva padrão, onde foram utilizados 10 tubos de ensaio identificados de 1 a 10 para realizar diferentes concentrações de água, BSA e reagente de Bradford (Apêndice A). Em cada tubo foi adicionado água destilada, BSA, e o reagente de Bradford com o auxílio de micropipetas de acordo com os volumes pretendidos e indicados na Tabela 1.

Foi preparado 1 mg por mL de BSA, pesando 10 mg da proteína e diluindo em 10 mL de água destilada. Em seguida, foi levada a solução para agitação completa e diluição da proteína e em seguida realizada as diluições seriadas (Tabela 2).

Tabela 2. Valores dos componentes distribuídos em tubos de ensaio para realização da curva padrão de BSA para o teste de Bradford.

Tubos	BSA (μL)	Água destilada (μL)	Concentração de BSA ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)	Reagente Bradford (mL)
1	50 μL	950 μL	5 μg	2,5 mL
2	100 μL	900 μL	10 μg	2,5 mL
3	150 μL	850 μL	15 μg	2,5 mL
4	200 μL	800 μL	20 μg	2,5 mL
5	250 μL	750 μL	25 μg	2,5 mL
6	300 μL	700 μL	30 μg	2,5 mL
7	350 μL	650 μL	35 μg	2,5 mL
8	400 μL	600 μL	40 μg	2,5 mL
9	450 μL	550 μL	45 μg	2,5 mL
10	500 μL	500 μL	50 μg	2,5 mL

Após adicionar todos os reagentes e soluções presentes na tabela 1, estes foram homogeneizados em vórtex durante 30 s. Em seguida, os tubos ficaram em repouso por cerca de 2-5 min. As leituras foram realizadas a 595 nm e água destilada foi utilizada como branco.

No final foram anotados todos os valores da absorbância e elaborada a curva padrão como base em BSA, onde a curva padrão obtida em relação a concentração de BSA foi construída. Foi obtida a equação da reta que serviu como base para determinar a concentração de proteínas totais.

Para a dosagem de proteínas nas amostras foram separados em triplicata tubos de ensaio com os diferentes tratamentos para cada isolado de levedura. Foram pipetados 100 μL do sobrenadante dos isolados e adicionados ao tubo contendo 2,5 mL de reagente de Bradford. Em seguida, foram agitados em vórtex e mantidos em repouso por 2 min, seguido da leitura da absorbância no espectrofotômetro (595 nm). Após a anotação dos valores obtidos no espectrofotômetro, foram avaliados os valores de absorbância e comparados à curva de calibração previamente construída e calculada a equação da reta.

4.12 Análise de açúcares totais e açúcares redutores

Para a determinação de açúcares totais foi utilizada a metodologia de fenol sulfúrico preconizada por Dubois *et al.* (1956). Foi elaborada uma curva padrão de sacarose (Apêndice C). Foram pesados 25 mg de sacarose e adicionadas em 100 mL de água destilada para determinar a concentração de sacarose em função da curva padrão. Em seguida, foi feita a solução de fenol a 5% em H_2O .

Após, foi adicionado 0,5 mL de amostra em tubos de ensaio 0,5 mL fenol 5%, e 2 mL de H_2SO_4 fumegante. Após resfriar em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em 490 nm. Água destilada foi utilizada como branco. Na tabela 3 ilustra os processos de elaboração da solução padrão de sacarose.

Tabela 3. Componentes e volumes da solução padrão de sacarose.

Tubos	Volume de solução padrão de sacarose (μL)	Volume de água destilada (μL)	Volume de fenol (mL)	Volume de H_2SO_4 (mL)
1	20 μL	480 μL	0,5	2,0
2	40 μL	460 μL	0,5	2,0
3	80 μL	420 μL	0,5	2,0
4	120 μL	380 μL	0,5	2,0
5	160 μL	340 μL	0,5	2,0
6	200 μL	300 μL	0,5	2,0
7	240 μL	260 μL	0,5	2,0
8	280 μL	220 μL	0,5	2,0
9	320 μL	180 μL	0,5	2,0
10	360 μL	140 μL	0,5	2,0
11	400 μL	100 μL	0,5	2,0

Para a dosagem nas amostras, foi pipetado 0,5 mL dos sobrenadantes dos diferentes tratamentos conforme o item 4.10 para cada isolado. Já para a análise de açúcares redutores foi adaptado o método de Maldonado, Carvalho e Ferreira, (2013).

Uma solução de glicose a 1,0 g/L foi preparada apenas instantes antes do teste ser realizado. Foi realizada a pesagem de 0,1000 g de glicose. Em seguida foi transferido todo o conteúdo de glicose para um balão volumétrico de 100 mL, o volume completado com água destilada e homogeneizado vigorosamente.

Para a solução do reagente de DNS a 5%, inicialmente foi pesado 0,79 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) e 1,39 g de 1% de NaOH. Em seguida, foram diluídos em 100 mL de água destilada e acrescentado 7,6 mL de fenol a 0,54%, 0,586 g de metabissulfito de sódio e agitado cuidadosamente na capela de exaustão. Armazenado em um frasco âmbar no refrigerador.

Para a preparação da solução de 1% de tartarato duplo de sódio e potássio foram pesados 0,45 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), diluídos em 30 mL de água destilada. Após a sua preparação, a solução também foi armazenada em frasco âmbar em temperatura de refrigeração. A outra solução preparada foi a de NaOH 2N, onde foi pesado 4 g de NaOH e feita a diluição em água destilada e ajustado o volume para 50 mL, em balão volumétrico. Para a preparação da solução de HCl 2N, foram medidos 50 mL de HCl em uma capela, depois diluído em água destilada e ajustado o volume para 0,05 L, em balão volumétrico.

Para a construção da curva de padrão de açúcar redutor, foram pipetados os volumes conformes apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Preparação das diluições da solução padrão de glicose a 1,0 g/L.

Amostras	Concentração de glicose (g/L)	Volume de solução padrão de glicose (mL)	Volume de água destilada (mL)	Volume de DNS
1	0,10	1,0	9,0	1,0
2	0,20	2,0	8,0	1,0
3	0,30	3,0	7,0	1,0
4	0,40	4,0	6,0	1,0
5	0,50	5,0	5,0	1,0
6	0,60	6,0	4,0	1,0
7	0,70	7,0	3,0	1,0
8	0,80	8,0	2,0	1,0
9	0,90	9,0	1,0	1,0
10	1,00	10,0	0,0	1,0

Em seguida, foi realizada a homogeneização das amostras. Após esse procedimento, foi retirada uma alíquota de 1,0 mL da mistura de água destilada e

glicose e 1,0 mL do reagente de DNS, homogeneizado e quantificado em espectrofotômetro a 540 nm para a para obter curva padrão de glicose.

Posteriormente, foi realizada a dosagem em triplicata das amostras dos diferentes tratamentos conforme o item 4.10. Foi retirado 1,0 mL dos sobrenadantes e adicionados em tubos de ensaio. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL do reagente DNS, agitado em vórtex por 30 s e mantido em banho maria à 100 °C, por 5 min. Os tubos contendo as amostras foram resfriados em banho de gelo por 5 min. Após o resfriamento, foram adicionados 2 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio 1%. Depois foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. O branco consistiu de 1 mL de água destilada. Foi calculada a equação da reta para cada isolado a partir da curva padrão.

4.13 Análise da biomassa por espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)

A identificação da composição química da biomassa das 3 linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* (LS 76, LS 101 e LS 165), foi realizada por espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de FTIR foram registrados da biomassa em espectrômetro Bruker IFS 55, equipado com sistema de ATR de reflexão única (Golden Gate), com o objetivo de identificar a presença de grupos funcionais e direcionar na elucidação da natureza do biossurfactante, tendo em vista que existe a possibilidade do biossurfactante estar aderido a parede celular, uma vez que testes anteriores realizados no sobrenadante do cultivo total foram negativos, enquanto que os sobrenadantes da biomassa apresentam atividade emulsificante/biossurfactante. Assim, para cada espectro (n = 3/amostra) foram coletados 128 varreduras/amostra, em janela espectral de 500 a 4000 ondas.cm⁻¹ e com resolução de 4 ondas.cm⁻¹. O processamento dos espectros obtidos foi realizado manualmente com o auxílio do programa OPUS (Bruker Biospin, versão 5.0) e considerou a delimitação da janela espectral de interesse (3000-600 ondas.cm⁻¹), a correção da linha de base, a normalização e a diminuição da relação sinal/ruído (*smoothing*).

4.14 Análises Estatísticas

Todos os ensaios foram conduzidos independentemente e realizados em triplicata. Os dados foram coletados, sumarizados e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey, quando aplicável, utilizando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), com suporte do software BioStat.

5 RESULTADOS

5.1 Triagem inicial e avaliação do IE₂₄% em diferentes condições de cultivo

Foram selecionados 40 isolados de leveduras obtidas dos manguezais Santo Antônio e Tatuamunha, pertencentes à APA Costa dos Corais. Dos isolados selecionados não relatados em nenhuma base de dados consultada, 38 são leveduras e 2 são de microalgas. Os isolados foram selecionados para avaliar sua atividade de emulsão (IE₂₄%).

Após os testes do IE₂₄% foi possível identificar 17 isolados com diferentes atividades de emulsão (Tabela 5). Entretanto, apenas 10 isolados apresentaram atividade de emulsão $\geq 50\%$. O isolado da microalga *Prototeca zopfii* apresentou 68% no IE₂₄%, enquanto que o isolado de *Prototheca* sp. não emulsionou, assim esses isolados foram removidos tendo em vista que o foco principal do trabalho é a seleção de leveduras.

Assim, entre as espécies de leveduras com os melhores valores de IE₂₄%, a que mais se destacou foi *C. (Pichia) pseudolambica*, com 6 linhagens (LS 67, LS 71, LS 76, LS 90, LS 101 e LS 165) apresentando índices de emulsão que variam entre 50% a 68%. Dessa forma, essas linhagens foram selecionadas para continuar nas próximas etapas (Tabela 5).

As linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* foram depositadas na coleção de leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com os seguintes códigos: LS 76 *C. (Pichia) pseudolambica* (UFMG-CM-Y7258), LS 101 *C. (Pichia) pseudolambica* (UFMG-CM-Y7259) e LS 165 *C. (Pichia) pseudolambica* (UFMG-CM-Y7260).

Tabela 5. Triagem das linhagens de leveduras dos manguezais dos rios Santo Antônio (LS) e Tatuamunha (LT) em relação as buscas na literatura científica e com base no teste do índice de emulsificação (IE₂₄%).

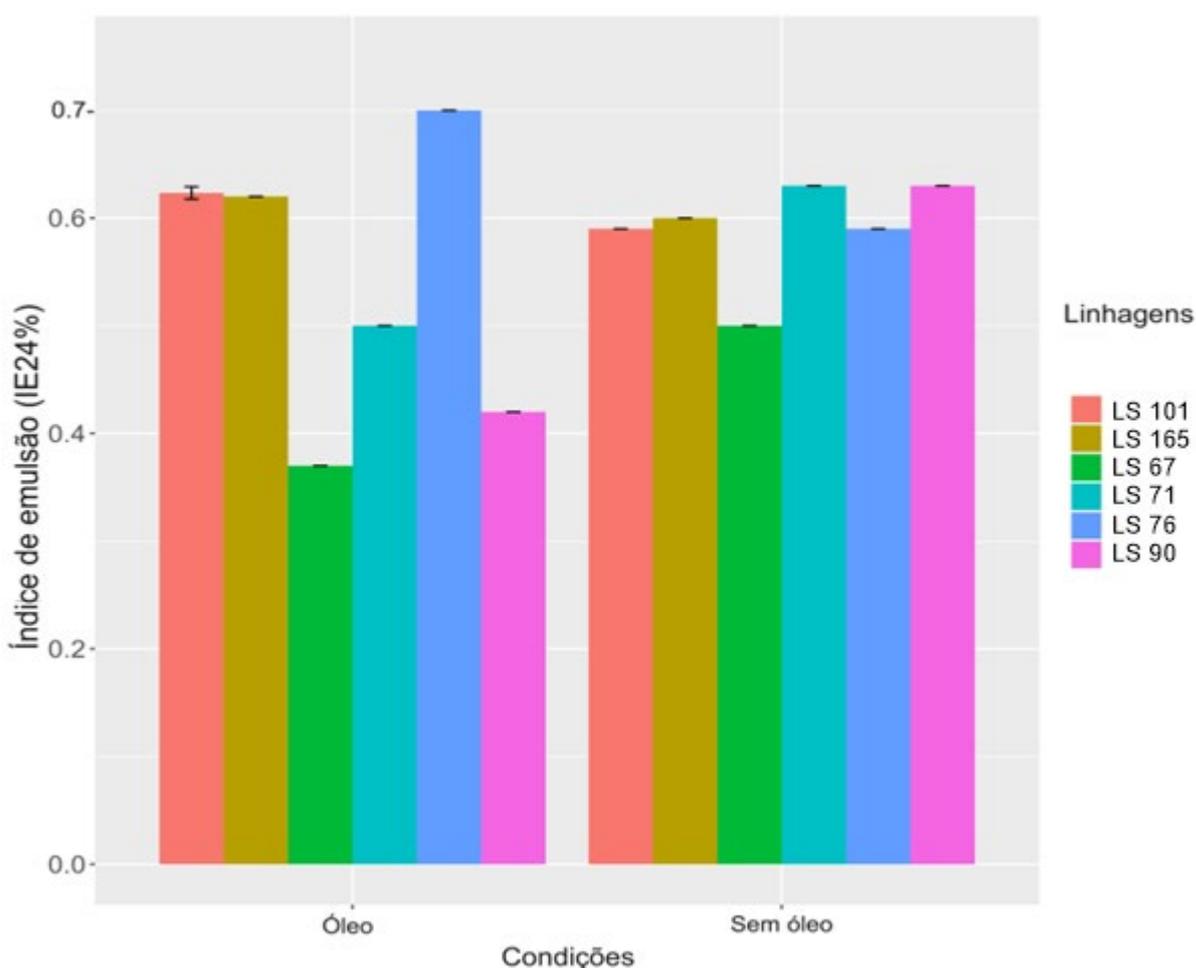
Linhagens de leveduras	Espécies	IE ₂₄ %
LT35	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	55%
LS15	<i>Candida ghanaensis</i>	-
LS25	<i>C. ghanaensis</i>	-
LS80	<i>Cyberlindnera subsufficiens</i>	-
LS49	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	33,33%
LS170	<i>K. aestuarii</i>	-
LS171	<i>K. aestuarii</i>	41,46%
LT03	<i>K. aestuarii</i>	40%
LS14	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-
LS41	<i>P. laurentii</i>	-
LS88	<i>P. laurentii</i>	40,18%
LS169	<i>P. laurentii</i>	-
LS120	<i>P. laurentii</i>	-
LT08	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-
LT04	<i>Pichia kudriavzevii</i>	45%
LS67	<i>C. (Pichia) pseudolambica</i>	50%
LS71	<i>C. (Pichia) pseudolambica</i>	50%
LS76	<i>C. (Pichia) pseudolambica</i>	68%
LS90	<i>C. (Pichia) pseudolambica</i>	50%
LS102	<i>C. (Pichia) pseudolambica</i>	-
LS165	<i>C. (Pichia) pseudolambica</i>	55%
LS101	<i>C. (Pichia) pseudolambica</i>	62,50%
LS137	<i>C. (Pichia) pseudolambica</i>	--
LS19	<i>Prototeca zopfii</i>	68%
LS39	<i>Prototheca sp.</i>	-
LS06	<i>Pseudozyma alboarmeniaca</i>	-
LS21	<i>Rhodotorula toruloides</i>	-
LS59	<i>Saitozyma podzolica</i>	-
LS126	<i>S. podzolica</i>	-
LS115	<i>Saturnispora silvae</i>	-
LS93	<i>S. silvae</i>	-
LS121	<i>S. silvae</i>	47,05%
LS151	<i>S. silvae</i>	50%
LS16	<i>Torulaspora globosa</i>	52%
LS52	<i>T. globosa</i>	-
LS33	<i>Torulaspora indica</i>	35%
LS10	<i>Vishniacozyma alagoana</i>	-
LS60	<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	-
LT07	<i>Yamadozyma mexicana</i>	-

(-) Resultados negativos

Ao verificar as médias dos IE₂₄% utilizando os cultivos totais dos 6 isolados de *C. (Pichia) pseudolambica* em diferentes meios de cultivo a 25-28°C durante 48 h, é possível notar que, no geral, todos os isolados obtiveram IE₂₄% ≥ 50% quando cultivados em YEPD sem óleo, mas quando o YEPD foi suplementado com 1% de óleo os isolados LS 76, LS 101 e LS 165 atingiram valores de emulsão de 62% a 70%

(Gráfico 1). Quando analisado o IE₂₄% em MSM sem óleo, foi detectado diferentes valores de emulsões nas linhagens LS 67 (45%), LS 76 (50%), LS 101 (50%) e LS 165 (55%). Com MSM suplementado com óleo apenas o isolado LS 76 emulsionou 50%, todas as demais linhagens apresentaram resultado negativo. Dessa forma, o isolado LS 76 foi o único a demonstrar atividade de emulsão $\geq 50\%$ em todos os diferentes tratamentos em relação aos demais isolados, enquanto que o YEPD sem óleo e suplementado com óleo foram as melhores condições para o IE₂₄%.

Gráfico 1. Médias dos IE₂₄% dos cultivos celulares das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em diferentes meios de cultura, à 26±2 °C durante 48h.

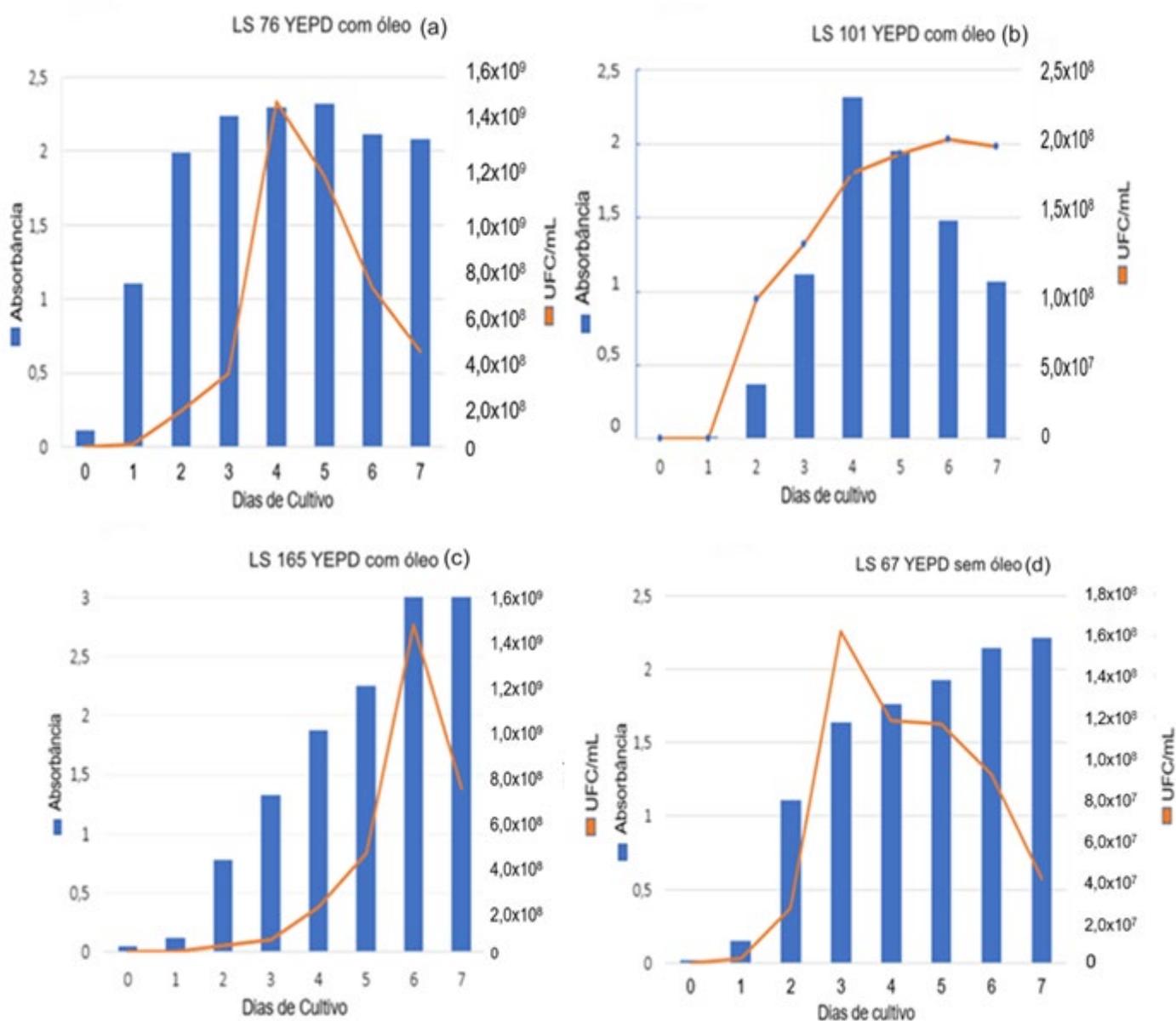


Ao analisar o IE₂₄% dos sobrenadantes das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em meio YEPD com 1% de óleo de soja, YEPD sem óleo de soja, e em meio MSM com 1% de óleo de soja e MSM sem óleo de soja, à 26±2 °C durante 48h, constatou-se a ausência de atividade de emulsão.

5.2 Curva de crescimento e teste de produção de lipase

As curvas de crescimento apresentadas demonstram os resultados obtidos para as linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em YEPD líquido, suplementados com 1% de óleo de soja estéril (a) LS 76, (b) LS 101, (c) LS 165 e YEPD sem óleo de soja (d) LS 67 (Gráfico 2).

Gráfico 2. Curva de crescimento das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em função da absorbância (640 nm), tempo e da UFC/mL em YEPD líquido suplementados com 1% de óleo de soja estéril (a) LS 76, (b) LS 101, (c) LS 165 e YEPD sem óleo de soja (d) LS 67 26±2 °C, durante 168h.



Analisando a curva de crescimento da linhagem LS 76 em YEPD com óleo é possível observar que até o 5º dia de cultivo a absorbância e as UFC/mL aumentaram (Gráfico 2), porém após o 5º dia a absorbância diminuiu, não sendo possível visualizar a fase estacionária, pois as UFC/mL começaram a reduzir, formando uma curva característica de declínio. Já ao verificar a linhagem LS 101 em YEPD com óleo, nota-se que a absorbância e as UFC/mL aumentaram até o 4º dia de cultivo, porém entre o 6º e 7º dia de cultivo as UFC/mL estabilizaram e a absorbância diminuiu.

No cultivo da linhagem LS 165 com óleo verificou-se que ao decorrer dos dias a medida que a absorbância aumentava as UFC/mL também, porém só a partir do 6º dia de cultivo a absorbância estabilizou, enquanto que entre o 6º e 7º dia de cultivo é possível identificar um declínio das UFC/mL. Enquanto que no isolado LS 67 em YEPD sem óleo, é possível analisar que a medida que a absorbância aumentava durante os 7 dias de cultivo, as UFC/mL configuravam uma rápida estabilidade a partir do 4º dia e entrava na fase de declínio do 5º dia até o 7º dia de cultivo.

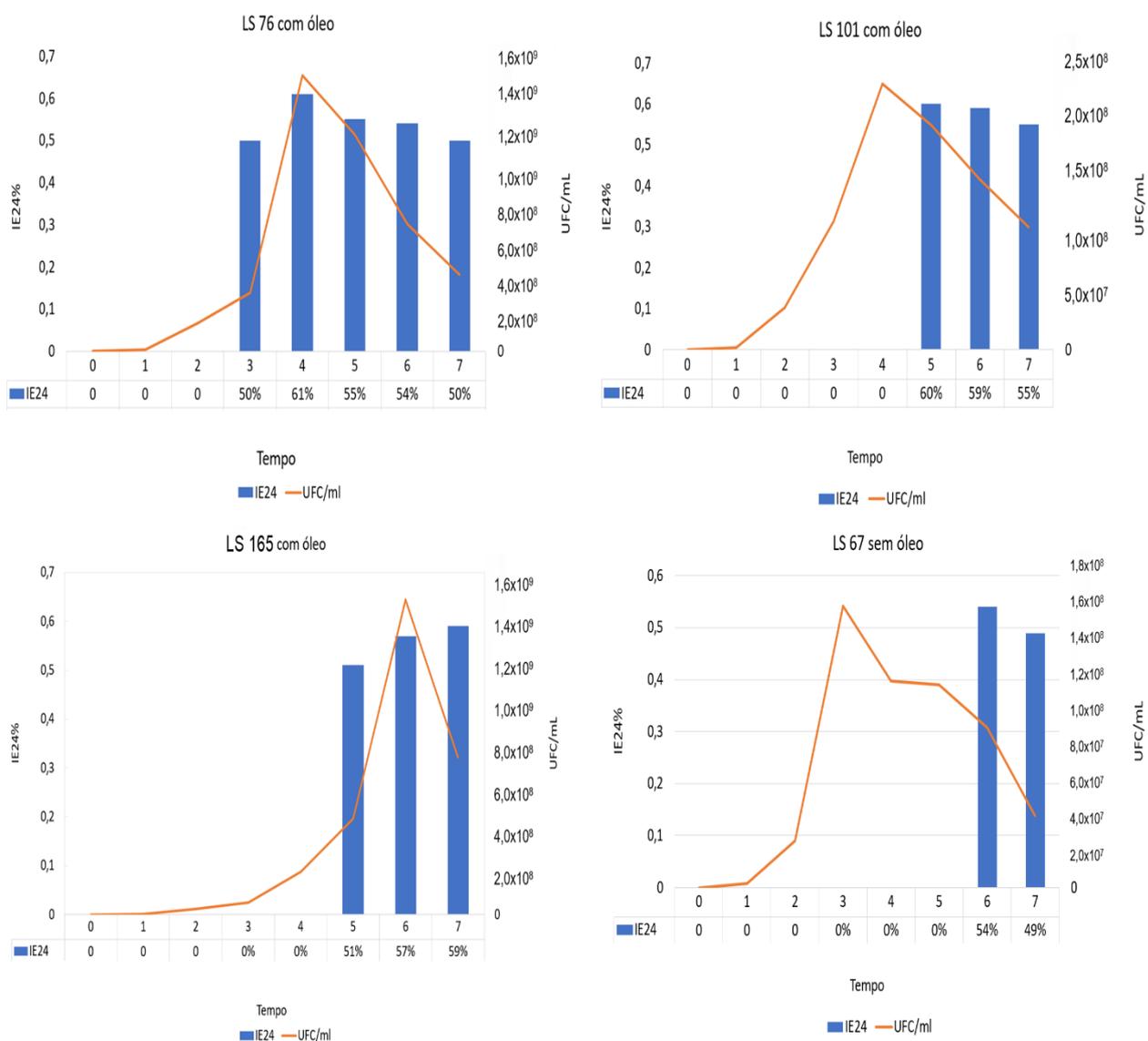
Ao avaliar o IE₂₄% na curva de crescimento das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em YEPD líquido suplementados com 1% de óleo de soja estéril (a) LS 76, (b) LS 101, (c) LS 165 e YEPD sem óleo de soja (d) LS 67 frente as UFC/mL (Gráfico 3), verificou-se que a linhagem LS 76 cultivada em YEPD com óleo (a) apresentou atividade de emulsão $\geq 50\%$ entre o 3º dia até o 7º dia de cultivo, porém no 4º dia de cultivo foi identificado um melhor índice de emulsão (61%) quando as UFC/mL estavam elevadas, mas a partir do 5º dia a medida que as UFC/mL foram sendo reduzidas, a atividade de emulsão teve um declínio de até 50% no 7º dia de cultivo.

Já para a linhagem LS 101 em YEPD com óleo (b), a medida que as UFC/mL aumentavam não foi possível detectar atividade de emulsão, porém a partir do 5º dia, com o declínio das UFC/mL, a atividade de emulsão atingiu 60%, ocorrendo uma redução do índice de emulsão de 59% até 55% entre o 5º ao 7º dia de cultivo respectivamente. Enquanto que a linhagem LS 165 cultivada em YEPD com óleo (c), foi possível detectar que a partir do 5º dia de cultivo até o 6º dia de cultivo a medida que as UFC/mL aumentaram os valores de emulsão foram de 55% a 57%, porém com o declínio das UFC/mL visualizado no 7º dia de cultivo a atividade de emulsão ainda aumentou para 59%.

A capacidade de emulsificação da linhagem LS 67 cultivada em meio YEPD sem óleo (d) revelou valores entre de 54% a 49% e somente foi detectada a partir do

6º dia de cultivo, estando associada ao declínio da UFC/mL. Dessa forma observou-se que a linhagem LS 76 (a) demonstrou uma melhor atividade de emulsão em um menor tempo de cultivo em comparação com as linhagens testadas com YEPD com óleo e sem óleo, sendo que a linhagem LS 67 em YEPD sem óleo (d) utilizou um tempo maior de cultivo para atingir uma atividade de emulsão menor quando comparado com as linhagens testadas em YEPD com óleo.

Gráfico 3. IE₂₄% das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em função do tempo e da UFC/mL em meio YEPD líquido suplementados com 1% de óleo de soja estéril (a) LS 76, (b) LS 101, (c) LS 165 e YEPD sem óleo de soja (d) LS 67 à 26±2 °C, durante 168h.



Após realizar o teste de produção de lipase, verificou-se que todas as 6 linhagens testadas de *C. (Pichia) pseudolambica* apresentaram atividade de lipase, com valores de Pz (cm) caracterizados como LS 67 (0,35 cm), LS 71 (0,39 cm), LS 76 (0,31 cm), LS 90 (0,35 cm), LS 101 (0,33 cm) e LS 165 (0,34 cm).

5.3 Avaliação das propriedades tensoativas

Ao realizar o teste do colapso da gota foi possível observar o efeito de atividade surfactante sobre a gota de óleo, onde os parâmetros foram avaliados para culturas produtoras de biossurfactante que formaram gotas planas. Assim, verificou-se que o cultivo em meio YEPD sem a suplementação de óleo de soja foi a melhor condição, onde um número maior de linhagens teve a capacidade de transformar gotas planas completas e com espalhamento da gota, seguido do tratamento com MSM sem óleo de soja (Tabela 6).

Tabela 6. Testes de colapso da gota com o cultivo celular das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em diferentes meios de cultura à 26 ± 2 °C durante 48h.

Linhagem	MSM 1% óleo de soja	MSM sem óleo de soja	YEPD 1% óleo de soja	YEPD sem óleo de soja
LS 67	+	+++	++	+++
LS 71	+	++	++	+++
LS 76	++	++	+	+++
LS 90	++	+++	+	++
LS 101	++	+++	+++	+++
LS 165	++	+++	+++	+++
Controle positivo 1% SDS	+++	+++	+++	+++
Controle negativo	-	-	-	-

Já no teste de colapso da gota com os sobrenadantes dos isolados de *C. (Pichia) pseudolambica* em diferentes meios de cultivo a $26\pm$ °C durante 48h, verificou-se que nenhuma amostra de sobrenadante dos isolados de *C. (Pichia) pseudolambica* foi capaz de causar alteração sobre a gota de óleo nos poços, sendo considerados

todos negativos, corroborando com o teste do IE₂₄% quando realizado com o sobrenadante.

No teste de Parafilm® M ocorreu maior medida do diâmetro da gota com espalhamento completo na superfície apenas nos isolados LS 76, LS 101 e LS 165 quando cultivados em YEPD com 1% de óleo de soja (Tabela 7). Os tratamentos MSM sem óleo e com óleo apresentaram bons diâmetros, porém tiveram espalhamento parcial muito baixo, enquanto YEPD sem óleo de soja todas as linhagens apresentaram um diâmetro inferior e sem indução de espalhamento na superfície.

Tabela 7. Teste de Parafilm® M dos cultivos celulares das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em diferentes meios de cultura à 26±2 °C durante 48h.

Linhagens	MSM 1% óleo de soja	MSM sem óleo de soja	YEPD 1% óleo de soja	YEPD sem óleo de soja
LS 67	0,4 ++	0,3	0,4 ++	0,2
LS 71	0,4 ++	0,4++	0,4 ++	0,1
LS 76	0,5 ++	0,4++	0,5 +++++	0,3
LS 90	0,4 ++	0,4++	0,4 ++	0,3
LS 101	0,5 ++	0,4++	0,5 +++++	0,2
LS 165	0,5 ++	0,4++	0,5 +++++	0,2
Controle positivo 1% SDS	0,6+++++	0,6+++++	0,6+++++	0,6+++++
Controle negativo	0,3	0,3	0,3	0,3

Já quando se utilizou os sobrenadantes nos meios de cultivo MSM com óleo, MSM sem óleo e YEPD com óleo foi possível verificar que tiveram um diâmetro da gota parcial nas linhagens LS 67, LS 90, LS 101 e LS 165. Enquanto a linhagem LS 76 apresentou baixo diâmetro da gota e baixa atividade de espalhamento para todos os diferentes tratamentos utilizando o sobrenadante (Tabela 8).

Tabela 8. Testes de Parafilm® M com os sobrenadantes das linhagens celulares de *C. (Pichia) pseudolambica* cultivadas em diferentes meios de cultura à 26±2 °C durante 48h.

Linhagens	MSM 1% óleo de soja	MSM sem óleo de soja	YEPD 1% óleo de soja	YEPD sem óleo de soja
LS 67	0,4++	0,4++	0,4++	0,4++
LS 71	0,4++	0,4++	0,3+	0,3+
LS 76	0,3+	0,3+	0,3+	0,3+
LS 90	0,4++	0,4++	0,4++	0,3+
LS 101	0,4++	0,4++	0,4++	0,4++
LS 165	0,4++	0,4++	0,4++	0,4++
Controle positivo 1% SDS	0,6++++	0,6++++	0,6++++	0,6++++
Controle negativo	0,3	0,3	0,3	0,3

No teste de deslocamento de óleo, todas as linhagens induziram um baixo diâmetro de deslocamento quando cultivadas em meio YEPD sem óleo de soja, com valores nas seguintes linhagens LS 67 (0,1 cm), LS 71 (0,3 cm), LS 76 (0,4 cm), LS 90 (0,4 cm), LS 101 (0,5 cm) e LS 165 (0,4 cm). Já na presença de óleo de soja, os isolados LS 67 (0,4 cm) e LS 165 (0,1 cm) apresentaram também um baixo deslocamento, quando comparados ao controle positivo 1% SDS (9,4 cm). Entretanto, todos os isolados nas diferentes condições de cultivo em meio MSM não tiveram nenhuma atividade de deslocamento da camada de petróleo.

Já quando foi analisado o teste de deslocamento de óleo com os sobrenadantes das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em YEPD com 1% de óleo de soja e YEPD sem óleo de soja e em MSM com 1% de óleo de soja e MSM sem óleo de soja, verificou-se que todas as linhagens não apresentaram nenhum tipo de atividade de deslocamento da camada de petróleo, sendo consideradas negativas.

5.4 Determinação do rendimento da biomassa e avaliação da tensão superficial

Ao obter a biomassa das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* verificou-se que as 3 linhagens apresentaram valores de rendimentos diferentes quando cultivadas nas mesmas condições durante 168h, sendo o isolado LS 101 com o melhor rendimento de biomassa (3.4759 g), sendo esse isolado também o único que manteve as unidades formadoras de colônias na curva de crescimento. Enquanto que os

demais isolados tiveram decréscimo das unidades formadoras de colônias, obtendo o seguinte rendimento de biomassa LS 165 (2.7223 g) e LS 76 (1.1180 g).

Quando observado os resultados com os sobrenadantes da biomassa sonicada e não sonicada das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica*, verificou-se atividade de redução da tensão superficial em ambas as condições para todos os isolados quando comparado com o controle negativo (Tabela 9). Logo, a linhagem LS 76 atingiu a menor redução da tensão entre as linhagens quando se utilizou a biomassa sonicada em comparação com a água de 70.82 mN/m para uma redução de 50.15 mN/m.

Tabela 9. Médias dos valores de tensão superficial realizada com o sobrenadante da biomassa sonicada e não sonicada das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* cultivadas em meio YEPD à $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48h.

Linhagens	Tempo	Volume	Tensão superficial final não sonicado	Volume	Tensão superficial final sonicado
LS 67	15s	10 μl	60 mN/m	10 μl	62.81 mN/m
LS 71	15s	9 μl	59.25 mN/m	10 μl	51.21 mN/m
LS 76	15s	10 μl	54.96 mN/m	10 μl	50.15 mN/m
LS 90	15s	10 μl	55.37 mN/m	10 μl	50.40 mN/m
LS 101	15s	10 μl	55.01 mN/m	10 μl	55.58 mN/m
LS 165	15s	10 μl	55.85 mN/m	10 μl	55.95 mN/m
Controle positivo (SDS 1%)	15s	10 μl	35.43 mN/m	10 μl	35.42 mN/m
Controle negativo	15s	10 μl	70.84 mN/m	10 μl	70.82 mN/m

Já ao observar os resultados da tensão superficial do sobrenadante dos cultivos totais das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica*, foi possível identificar que ocorreu atividade de redução da tensão superficial também em todos os isolados, quando

comparados com o controle negativo (Tabela 10). Nesse sentido, o isolado LS 67 teve a menor tensão superficial de 36.69 mN/m, seguido dos isolados LS 76 (37.05 mN/m), LS 165 (37.65 mN/m), LS 90 (37,89 mN/m), LS 101 (42.47 mN/m) e LS 71 (44.31 mN/m).

Tabela 10. Médias dos valores de tensão superficial realizada com o sobrenadante dos cultivos das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em meio YEPD líquido à 26± 2°C durante 48h.

Linhagens	Tempo	Volume	Tensão superficial final
LS 67	15s	6,6 µl	36.69 mN/m
LS 71	15s	7,0 µl	44.31 mN/m
LS 76	15s	6,8 µl	37.05 mN/m
LS 90	15s	6,9 µl	37.89 mN/m
LS 101	15s	7,2 µl	42.47 mN/m
LS 165	15s	6,7 µl	37.65 mN/m
Controle positivo (SDS 1%)	15s	7,5 µl	39,54 mN/m
Controle negativo YEPD líquido sem inóculo	15s	6,9 µl	55.81 mN/m

5.5 Avaliação do efeito de diferentes temperaturas, pH, salinidade e diferentes fontes de hidrocarbonetos sobre a estabilidade dos biossurfactantes

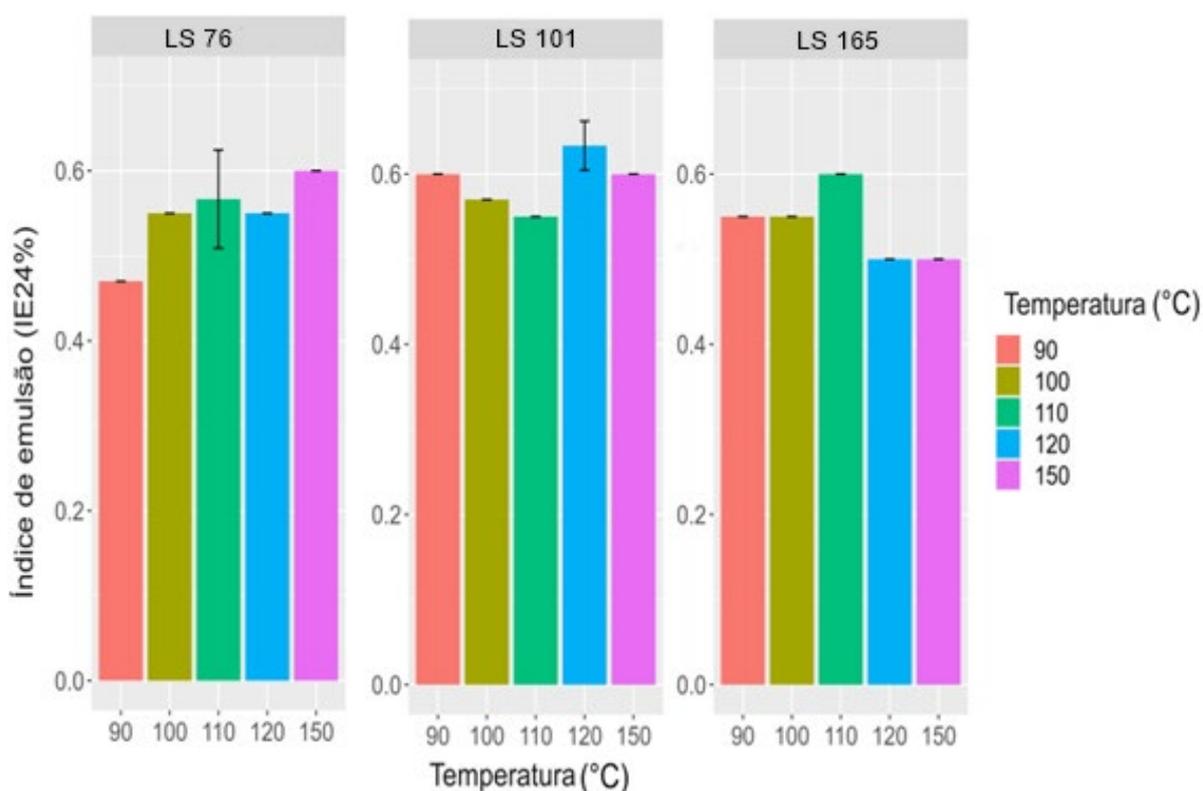
Ao analisar a capacidade das moléculas tensoativas em formar emulsões presentes nas linhagens LS 76, LS 101 e LS 165 de *C. (Pichia) pseudolambica* quando submetidas a diferentes temperaturas (90 °C, 100 °C, 110 °C, 120 °C, 150 °C), verificou-se que após a exposição a diferentes temperaturas o biossurfactante da

linhagem LS 76 tolerou temperaturas entre 100 °C a 150 °C com índices de emulsão $\geq 50\%$, atingindo um maior índice de 63% na faixa de 150 °C (Gráfico 4).

Enquanto que o biossurfactante da linhagem LS 101 tolerou todas as faixas de temperaturas com emulsões $\geq 50\%$, sendo a temperatura de 120 °C o melhor índice de emulsão com 63%. Já na linhagem LS 165 o biossurfactante demonstrou tolerância em todas as temperaturas e obteve melhor emulsão na temperatura de 110 °C com 60%, porém a medida que a temperatura foi aumentando o índice de emulsão foi reduzido para até 50%.

Dessa forma as moléculas com ação surfactante presente nas 3 linhagens apresentaram ser tolerantes a altas temperaturas

Gráfico 4. IE₂₄% de cultivos celulares das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em meio YEPD líquido ($26\pm 2^\circ\text{C}$, 48h), consoante as condições de temperatura investigadas.

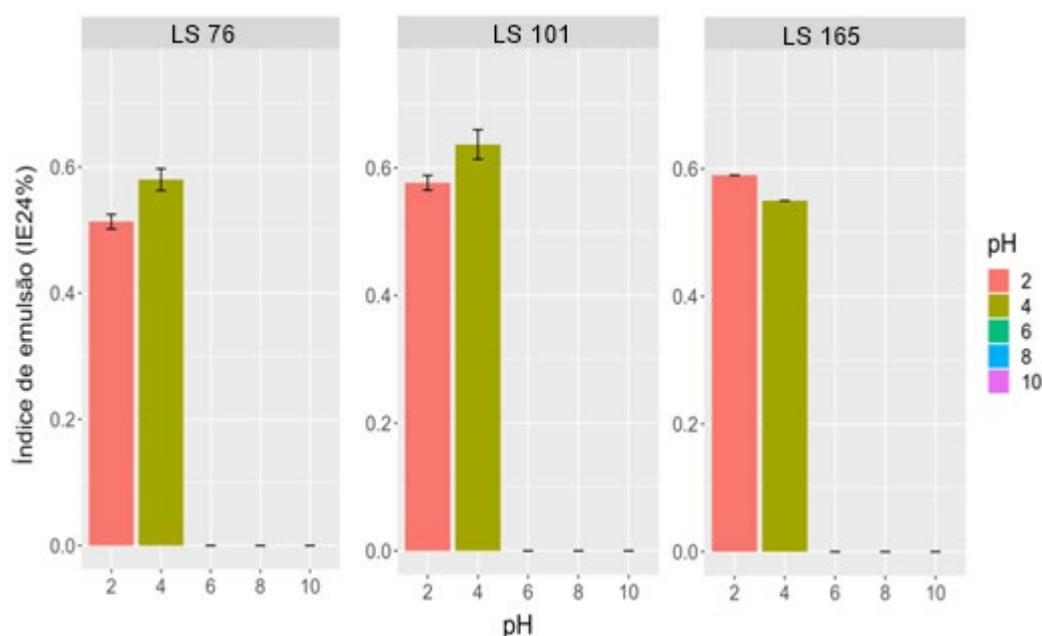


Ao analisar o resultado da linhagem LS 76 é possível observar que o biossurfactante presente demonstrou um melhor índice de emulsão de 58% na faixa de pH 4, variando para 51% na faixa de pH 2 (Gráfico 5). Já na linhagem LS 101 também demonstrou um melhor índice de emulsão em pH 4 com 63%, com variação

para 57% em pH 2. Enquanto que na linhagem LS 165 obteve um melhor IE₂₄% em pH 2 com 59%, variando para 55% quando testado em pH 4.

Dessa forma, as 3 linhagens apresentaram moléculas com capacidade de emulsionar nos pH 2 e 4, todas com índices $\geq 50\%$, configurando um perfil de tolerância em pH mais ácidos, já que nas demais faixas de pH a atividade de emulsão foi negativa, sendo na linhagem LS 101 a que melhor apresentou atividade de emulsão entre as demais, enquanto que LS 165 tolerou a faixa mais ácida entre todas as linhagens testadas.

Gráfico 5. IE₂₄% de cultivos celulares das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em meio YEPD líquido ($26\pm 2^\circ\text{C}$, 48h), conforme as condições de pH.



Entretanto, ao verificar o IE₂₄% utilizando os cultivos totais das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em meio YEPD líquido a $26\pm 2^\circ\text{C}$ durante 48h, frente a diferentes concentrações NaCl, verificou-se que as 3 linhagens avaliadas não apresentaram nenhuma atividade de emulsão. Dessa forma as 3 linhagens não demonstraram um perfil de emulsificação tolerante às diferentes condições de salinidade testadas (2%, 4%, 6%, 8%, 10%).

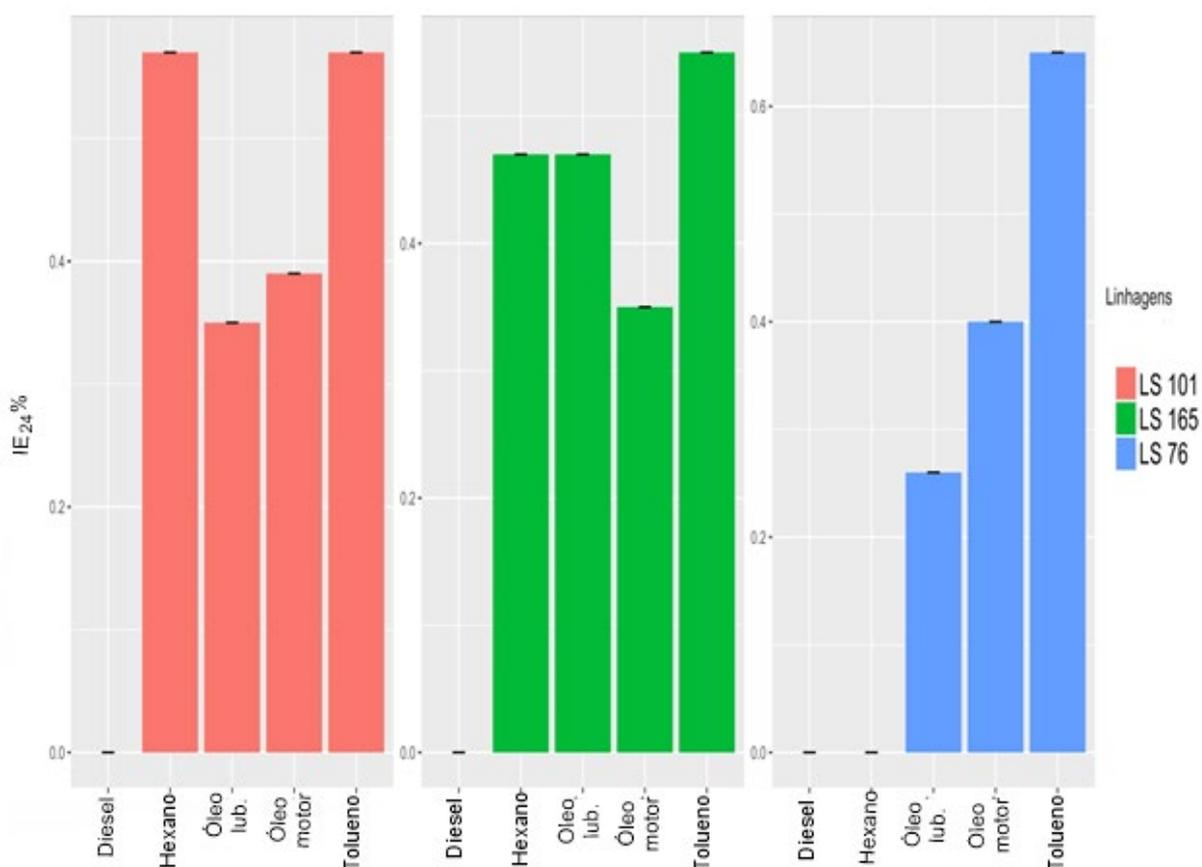
5.6 Atividade emulsificante em diferentes fontes de hidrocarbonetos e capacidade de crescimento na presença de querosene e petróleo

Ao analisar o IE₂₄% dos cultivos totais das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em diferentes fontes de hidrocarbonetos, foi possível observar que na linhagem LS 76 na presença de tolueno foi onde obteve um bom índice de emulsão

de 65% (Gráfico 6). Por outro lado, valores inferiores a 50% foram encontrados na presença de óleo de motor e óleo lubrificante, e quando avaliado na presença de diesel e hexano não ocorreram emulsões. Já na linhagem LS 101 verificou-se que em 4 fontes de hidrocarbonetos ocorreu atividade de emulsão, porém apenas na presença de tolueno (58%) e hexano (57%) que foram obtidos bons resultados. Entretanto, emulsões baixas foram presentes quando realizado teste com óleo lubrificante (35%) e de motor (38%), enquanto na presença de diesel não foi encontrada atividade de emulsão.

Enquanto na linhagem LS 165 frente a diferentes fontes de hidrocarbonetos, é possível observar que a melhor emulsão foi na presença de tolueno (55%), já quando analisadas outras atividades de emulsão identificadas para outros hidrocaróleo lubrificante (48%), hexano (47%), óleo de motor (33%), porém quando testado em diesel o IE₂₄% foi negativo. Dessa forma na presença de tolueno foi onde ocorreu os melhores IE₂₄% em todas as linhagens testadas, enquanto no diesel todas foram negativos.

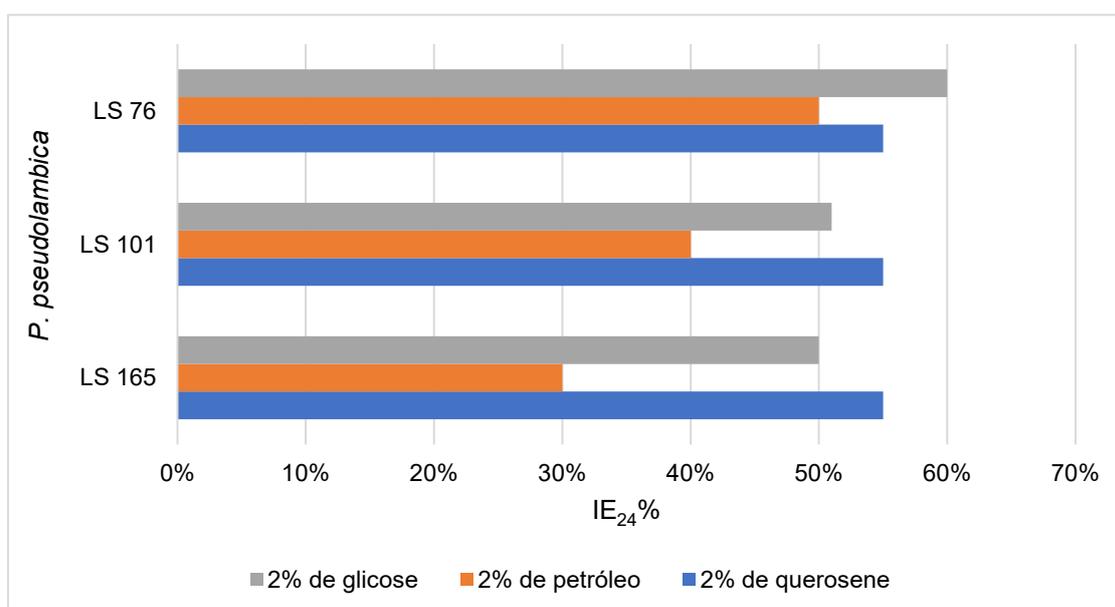
Gráfico 6. IE₂₄% de cultivos celulares das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em meio YEPD líquido (26±1°C/2°C, 48h), quando expostos a tolueno, hexano, óleo lubrificante e óleo usado de motor.



Ao avaliar a capacidade de crescimento e emulsificação na presença de 2% de petróleo e 2% de querosene como fonte de carbonos em cultivos totais, verificou-se que LS 76, LS 101 e LS 165 foram capazes de crescer em YEPD com 2% de petróleo e YEPD com 2% de querosene, quando comparados ao YEPD com 2% de glicose (Gráfico 7). Além disso ao analisar o $IE_{24\%}$ foi possível observar que LS 76 apresentou boas atividades de emulsão tanto na presença de 2% glicose (60%), petróleo (50%) e de querosene, porém entre os hidrocarbonetos testados na presença de querosene o índice de emulsão foi maior (55%).

Já ao verificar a linhagem LS 101 na presença de 2% de glicose atingiu 51%, e quando testado em 2% querosene atingiu emulsão de 55%, mas ao ser testado na presença de 2% de petróleo ocorreu uma redução da sua atividade de emulsão para 40%. Enquanto que LS 165 em 2% de glicose obteve 50%, porém verificou-se um valor de 55% de emulsão na presença de 2% de querosene, mas ao analisar na presença de 2% de petróleo houve uma redução da atividade de emulsão para 30%. Dessa forma, as 3 linhagens emulsionaram melhor na presença de 2% querosene quando comparado com o petróleo em que todas as linhagens apresentaram $IE_{24\%} \leq 50\%$.

Gráfico 7. Atividade de emulsificação ($IE_{24\%}$) das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* cultivadas em meio YEPD suplementado com hidrocarbonetos como fontes de carbono, à $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48h.



5.7 Quantificação de proteínas, açúcares redutores e totais

Ao analisar os resultados obtidos com o teste de Bradford (Tabela 11) nos sobrenadantes do cultivo total e da biomassa das linhagens LS 76, LS 101 e LS 165 em diferentes tratamentos, observou-se que os 3 isolados apresentaram uma baixa concentração de proteínas. Nesse sentido, a concentração de proteínas obteve valores um pouco maior entre 3,63 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 3,89 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no sobrenadante da biomassa sonicada em comparação com os demais tratamentos para todas as linhagens.

Tabela 11. Médias dos valores da concentração de proteínas, açúcares redutores e açúcares totais nos sobrenadantes do cultivo, da biomassa pós sonicação e não sonicada das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em meio YEPD líquido, à 26 ± 2 °C durante 168h.

Tratamentos	Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentração de glicose ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentração de açúcares totais ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Sobrenadante do cultivo LS 76	2,29	7,41	40,32
Sobrenadante biomassa não sonicada LS 76	2,98	3,85	14,43
Sobrenadante biomassa pós sonicação LS 76	3,84	2,15	24,16
Sobrenadante do cultivo LS 101	2,42	6,80	53,20
Sobrenadante biomassa não sonicada LS 101	2,98	2,67	10,46
Sobrenadante biomassa pós sonicação LS 101	3,89	2,62	20,87
Sobrenadante do cultivo LS 165	2,43	6,61	37,31
Sobrenadante biomassa não sonicada LS 165	2,92	2,58	6,63
Sobrenadante biomassa pós sonicação LS 165	3,63	3,28	16,63

Ao observar o teste de açúcares redutores com os sobrenadantes do cultivo total e da biomassa das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em diferentes tratamentos (Tabela 11), nota-se que no sobrenadante do cultivo total que ocorreu a maior concentração de glicose para as 3 linhagens com valores de 7,41 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (LS 76), 6,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LS 101) e 6,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (LS 165). Enquanto que para os sobrenadantes

da biomassa pós sonicação e não sonicada a concentração de glicose foi reduzida em todas as linhagens.

Na análise de açúcares totais nos sobrenadantes do cultivo total e da biomassa das linhagens de leveduras em diferentes tratamentos, foi possível constatar que a quantificação de açúcares totais foi elevada para as 3 linhagens no sobrenadante do cultivo, com concentrações de 40,32 µg/µL (LS 76), 53,20 µg/µL (LS 101) e 37,31 µg/µL (LS 165). Já quando foi testado o sobrenadante da biomassa nas condições pós sonicação e não sonicada, verificou-se que para as linhagens LS 76 e LS 101 no sobrenadante da biomassa pós sonicação a concentração de açúcares totais foi maior que o sobrenadante da biomassa pós sonicação com valores entre 24,16 µg/µL e 20,87 µg/µL, respectivamente. Para a linhagem LS 165, o sobrenadante da biomassa pós sonicação apresentou uma maior concentração de açúcares totais (16,63 µg/µL) em comparação com o tratamento não sonicado (6,63 µg/µL).

Ao testar a atividade de emulsão das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em diferentes tratamentos a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48h (Apêndice D), verificou-se que todas as linhagens produziram emulsão $\geq 50\%$ no cultivo total, com valores de emulsões variando entre 60% a 55%. Porém no sobrenadante do cultivo total não foi detectado nenhuma atividade de emulsão. Enquanto que na biomassa todas as linhagens emulsionaram com índices entre 53% a 45%. Dessa forma o cultivo total e a biomassa foram os tratamentos com melhor atividade de emulsão.

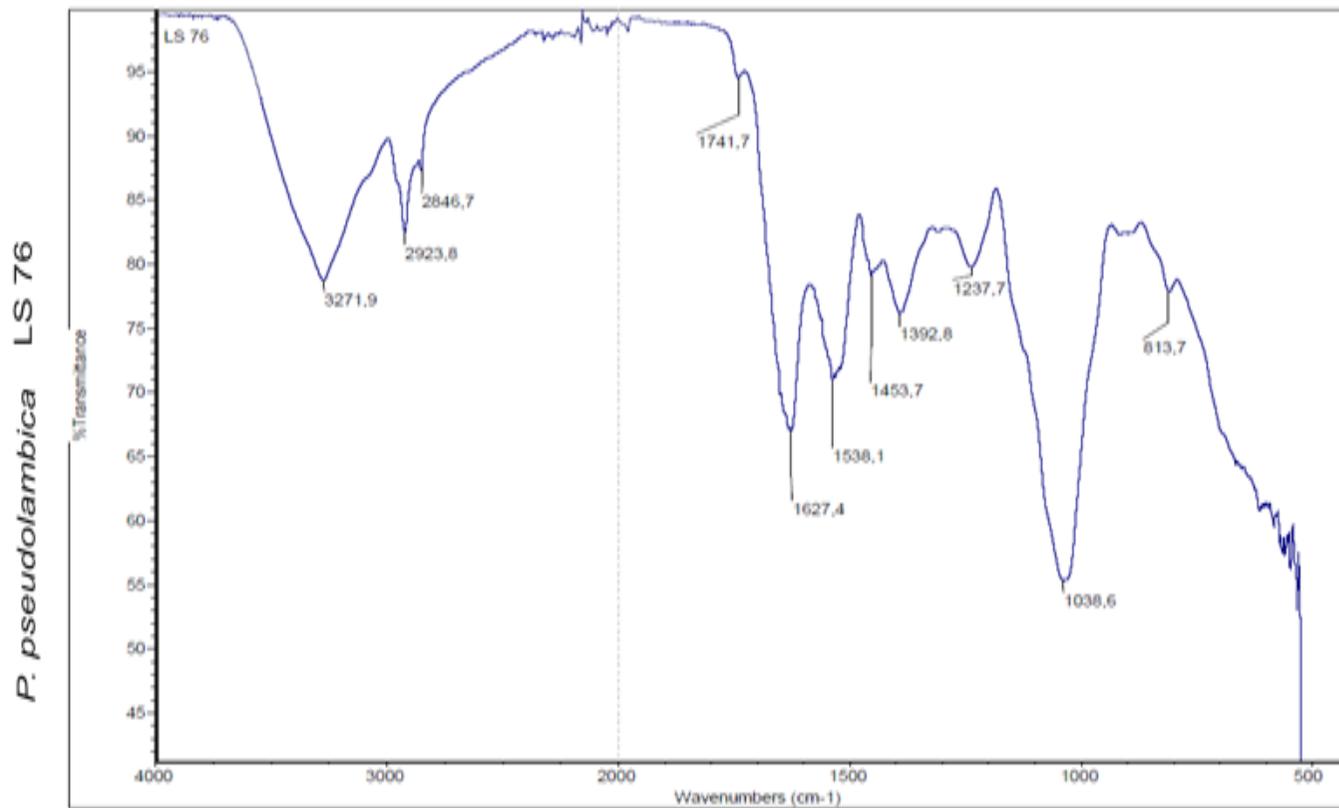
Quando realizado o IE_{24%} com os sobrenadantes em diferentes tratamentos, verificou-se que as linhagens LS 76, LS 101 e LS 165 não apresentaram atividade de emulsão no sobrenadante do cultivo. Porém quando analisado o sobrenadante da biomassa foram detectadas os seguintes índices de emulsão LS 76 (55%), LS 101 (50%) e LS 165 (50%). Já quando o sobrenadante da biomassa pós sonicação foi avaliado observou-se que ocorreu um aumento da atividade de emulsão para as 3 linhagens (LS 76 com 60%, LS 101 com 58% e LS 165 58%).

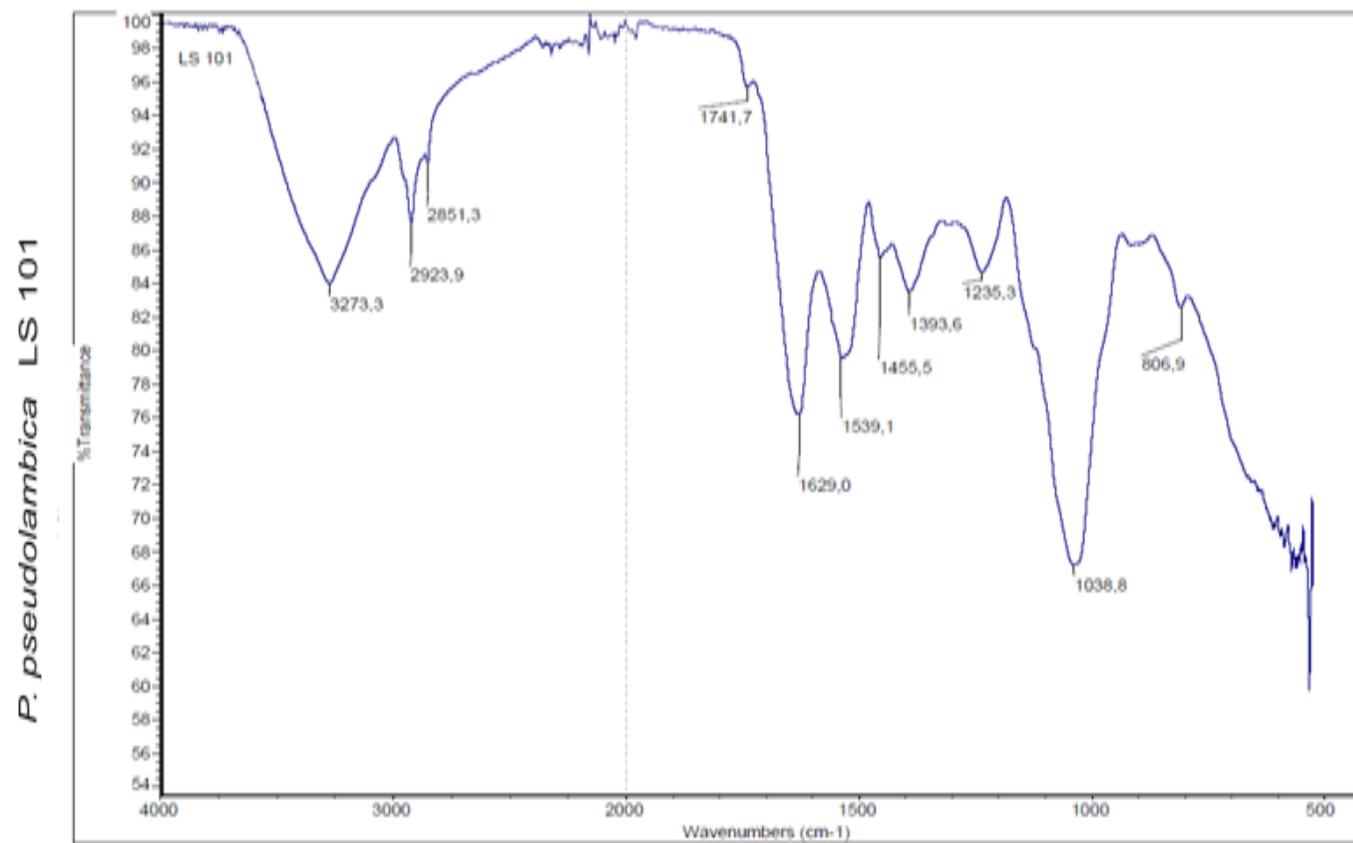
5.8 Análise da biomassa por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

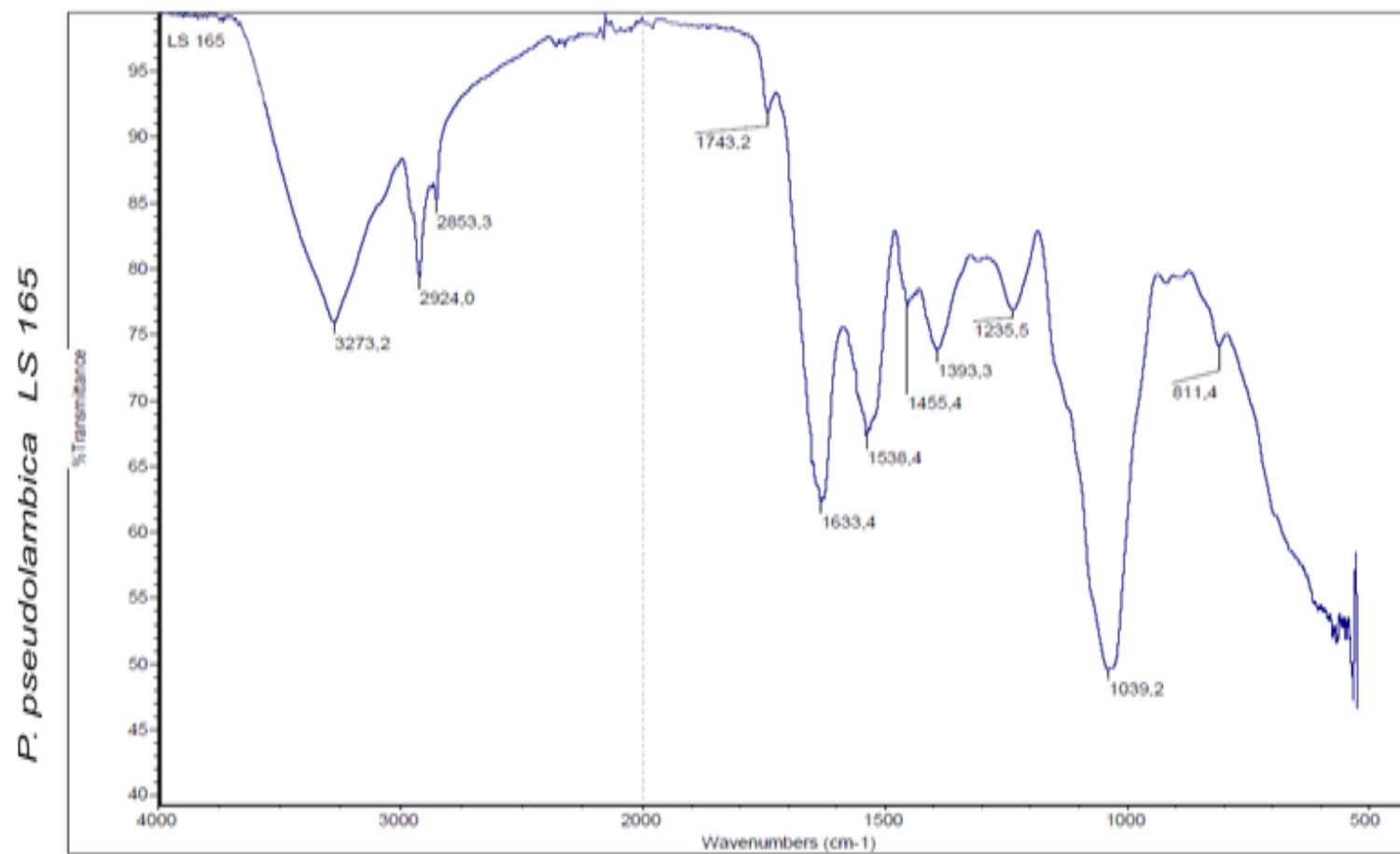
A análise dos espectros de FTIR das amostras de biomassa celular de *C. (Pichia) pseudolambica* revelou perfis semelhantes para as 3 linhagens em estudo (Gráfico 8). Nesse contexto, por exemplo, na linhagem LS 76 observa-se uma banda resultante de estiramento de grupamento O-H, sugestivo da função álcool (3271,9 cm⁻¹

¹) seguido de bandas associadas ao estiramento de grupo C-H associado à presença de grupos alcano, metileno e metila ($2923,8\text{ cm}^{-1}$ a $2846,7\text{ cm}^{-1}$). Notam-se também bandas de estiramento da função C=O ($1741,7\text{ cm}^{-1}$ a $1627,4\text{ cm}^{-1}$), de deformação angular CH₃ ($1538,1\text{ cm}^{-1}$), enquanto em ($1453,7\text{ cm}^{-1}$ a $1392,8\text{ cm}^{-1}$) foram detectadas bandas com dobramento O-H sugestivas de ácido carboxílico. Por fim, as bandas em $1237,7\text{ cm}^{-1}$ - (deformação ligação C-O) e em $1038,6\text{ cm}^{-1}$ (estiramento C-O) são indicativos da função álcool, com dobramento C-H em $813,7\text{ cm}^{-1}$.

Gráfico 8. Perfis espectrais de FTIR de amostras de biomassas celulares das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* cultivadas em meio YEPD, à $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 168h.







6 DISCUSSÃO

6.1 Triagem inicial e avaliação do IE₂₄% em diferentes condições de cultivo

Nas últimas décadas tem crescido o interesse científico na seleção e triagem de microrganismos produtores de moléculas tensoativas com alta atividade emulsificante (SILVA *et al.*, 2014). A capacidade de produção de biossurfactante pode ser variada de linhagem para linhagem dentro da mesma espécie (IHEANACHO *et al.*, 2016), assim como um mesmo microrganismo pode ser produtor de diferentes tipos de biossurfactantes (RUFINO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2016).

Durante a triagem a partir de leveduras isoladas de sedimentos de manguezais em Alagoas, foi possível identificar 6 linhagens da espécie *C. (Pichia) pseudolambica* (KURTZMAN *et al.*, 2008; DANIEL; LACHANCE; KURTZMAN, 2014). As linhagens selecionadas nesse trabalho demonstraram resultados de IE₂₄% acima de 50%, nesse contexto, até o momento não foram reportados dados na literatura referente a produção de biossurfactantes para a espécie, sendo este o primeiro relato.

O gênero *Candida* têm um histórico promissor na produção de biossurfactantes, que pode ser ilustrado pela variedade de relatos na literatura por leveduras do gênero, por exemplo, *C. glabrata* (LUNA; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2011) *C. bombicola* (FELSE *et al.*, 2007; VAUGHN *et al.*, 2014), *C. sphaerica* (LUNA *et al.*, 2011; SOBRINHO *et al.*, 2013b), *C. lipolytica* (RUFINO *et al.*, 2014) e *C. tropicalis* (VERMA *et al.*, 2015; RUBIO *et al.*, 2017). Porém algumas leveduras desse gênero foram reclassificadas e incluídas no clado *Pichia* (DANIEL; LACHANCE; KURTZMAN, 2014), como é caso da levedura *Candida pseudolambica*.

O gênero *Pichia* possui algumas espécies relatadas na literatura para a produção de biossurfactantes como *Pichia anomala* (THANIYAVARN *et al.*, 2008), *P. pastoris* (SALLADA; HARKINS; BERGER, 2019), assim como *P. membranaefaciens* que além da capacidade de produzir biossurfactantes, apresenta a capacidade de degradar derivados de petróleo (MARTINS; ARAGÃO; MARTINS, 2014) e *P. caribbica* como produtora de biossurfactantes do tipo soforolipídeo e xylolipídeo (JOSHI-NAVARE *et al.*, 2014).

Ao analisar a fonte de carbono disponível no meio de cultura para a produção de biossurfactante a literatura relata que a fonte pode influenciar e essa influência pode sofrer variação entre diferentes espécies (SANTOS *et al.*, 2016). Nesse sentido

a utilização de óleo soja é uma estratégia que pode reduzir custos, tendo em vista que essa fonte de substrato contém teores nutricionais importantes para a produção de biossurfactantes (FELSE *et al.*, 2007; ACCORSINI *et al.*, 2012). Logo, microrganismos que usam óleos como fonte de substratos geralmente são considerados bons produtores de biossurfactantes (MATSUURA, 2004; DECESARO *et al.*, 2013). Além disso, a atividade emulsificante também depende da afinidade com o substrato e o biossurfactante (URUM; PEKDEMIR, 2004; RUFINO *et al.*, 2008).

Nessa linha de discussão, alguns microrganismos podem emulsionar e produzir biossurfactantes na presença de hidratos de carbono, ou com várias fontes de carbono, seja de forma individual ou combinada, um estudo com *Bacillus subtilis* C9 demonstrou na presença de glicose a formação de emulsão, porém quando utilizou óleo de soja houve uma menor produção de biossurfactante e de emulsão (KIM *et al.*, 1997). Já uma pesquisa com *Aeromonas* spp. demonstrou que a soja foi a melhor fonte de nitrogênio em comparação com a glicose (ILORI; AMOBI; ODOCHA, 2005).

Por outro lado, uma pesquisa com a levedura *P. anomala* reportou capacidade de emulsionar e produzir biossurfactante na presença de 4% de óleo de soja, quando comparado com a glicose como fonte no meio (THANIYAVARN *et al.*, 2008). Já as leveduras *P. anomala* e *Pichia guilliermondii*, foram capazes de produzir biossurfactantes, no entanto a levedura *P. guilliermondii* não foi capaz de emulsionar na presença de óleo de soja, mas emulsionou na presença de glicose (83%) (PINHEIRO, 2017). Assim, em consonância a essa abordagem Arcosini (2010), afirma que as fontes de carbono glicose e óleo de soja podem ser excelentes substratos para a atividade de emulsificação.

Verificou-se também que algumas linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em meio MSM com óleo apresentaram atividade de emulsão, porém sem óleo houve uma redução da atividade. Esses resultados quando foram comparados com as emulsões obtidas em meio YEPD sem óleo e com óleo, destacam que as linhagens responderam melhor nas condições ricas em glicose e óleo, tendo em vista que MSM é um meio nutricionalmente pobre comparado com YEPD.

Desse modo, o meio MSM é bem relatado na literatura para a produção de biossurfactantes de bactérias e fungos, por exemplo, um estudo utilizando o fungo *Mucor circinelloides* apresentou emulsão em MSM de 66,6% (ZADEH; MOGHIMI; HAMED, 2018). Enquanto que Oliveira *et al.* (2022), destacam espécies de

Pseudomonas como potenciais agentes emulsificantes quando cultivadas em MSM com uma atividade de emulsão de até 63%.

Segundo Banat *et al.* (2014), existe uma relação carbono e nitrogênio que pode alterar a produção e o acúmulo de produtos do metabolismo, por exemplo, baixas frações de nitrogênio podem reduzir o crescimento e favorecer a produção de metabólitos, porém um excesso pode levar a uma redução do acúmulo de produtos do metabolismo (ROBERT *et al.*, 1989). Além disso, a utilização de variadas fontes de carbono pode em alguns casos modificar a estrutura dos biossurfactantes influenciando na sua atividade de emulsificação (SARMA *et al.*, 2019).

6.2 Curva de crescimento e teste de produção de lipase

A curva de crescimento pode ser definida como a variação da quantidade de células por unidade de tempo. Assim, devido à variação da taxa de crescimento dos microrganismos ao longo do tempo pode-se traçar a curva de crescimento (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009). De acordo com pesquisas avaliando a cinética da produção de biossurfactantes, a maioria das moléculas tensoativas são produzidas no meio de cultura na fase exponencial ou estacionária (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; RON; ROSENBERG, 2001; PINTO; MARTINS; COSTA, 2009; LIRA 2020).

Entretanto, alguns microrganismos podem também apresentar uma reduzida produção durante a fase exponencial de crescimento (AMARAL *et al.*, 2006). Os autores Colla e Costa (2003), ressaltam que quando o meio de cultivo apresenta um elevado teor de fontes de carbono frente a outros nutrientes limitantes, a curva de crescimento e/ou a produção do biossurfactante pode no início expressar uma fase de crescimento com tendência ao equilíbrio, com todos os nutrientes utilizados igualmente. Porém quando os nutrientes começam ficar indisponíveis, a velocidade de crescimento é reduzida, e a fonte de carbono pode seguir para o interior da célula e ser utilizada para a síntese de outros compostos.

Durante a detecção da atividade de lipase com as linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica*, algumas emulsões com óleo de soja neste trabalho ficaram com um aspecto e estabilidade menor, porém outros testes complementares são necessários para compreender a relação da produção de lipase e produção de biossurfactante nessa espécie. Nesse sentido, ao analisar a literatura um trabalho com a co-produção de lipase e biossurfactante, indicou que a quantidade de lipase produzida não alterou a produção de biossurfactante (MARTINS; KALIL; COSTA, 2008). Já um outro estudo

com produção de lipase e biossurfactantes de fungos, demonstrou não ocorrer uma interferência entre ambos os compostos, mas uma produção concomitante (SPERB *et al.*, 2015).

Nessa linha de discussão, esses isolados podem ser promissores na capacidade de produção de lipase e biossurfactante de interesse biotecnológico. Pois, as lipases oriundas de microrganismos tem despertado interesse na indústria atuando na interface água-óleo hidrolisando hidrocarbonetos e lipídeos (JOSEPH *et al.*, 2008; CARVALHO, 2012; BANCERZ, 2017).

6.3 Avaliação das propriedades tensoativas

O teste de colapso da gota embora busque avaliar a ação surfactante, não deve ser usado individualmente (SANTOS *et al.*, 2016; KREISCHER; SILVA, 2017). Shoeb e colaboradores (2015), ao avaliarem variados métodos em microrganismos com atividade surfactante, ressaltam que o teste de colapso da gota é complementar ao teste de Parafilm® M. Assim, um estudo com *P. guilliermondii* e *Candida sake* frente ao teste de colapso da gota e Parafilm® M, demonstrou que as ambas leveduras tiveram ação surfactante em meio de cultivo composto com glicose, peptona e extrato de levedura (PINHEIRO, 2017). Enquanto que *Issatchenkia orientalis* UCP 1603, demonstrou atividades tensoativas confirmadas apenas para o teste de Parafilm® M (FONSECA *et al.*, 2022).

Nesse sentido, o sobrenadante das linhagens de *Candida (Pichia) pseudolambica* no teste de Parafilm® M e colapso da gota não demonstrou atividade satisfatória quando comparado com os testes com os cultivos totais com óleo de soja e o controle positivo. Nessa abordagem segundo Ariech e Guechi (2015), para fins de validação desse teste é fundamental utilizar também o sobrenadante livre de células, reduzindo qualquer possibilidade de falso-positivo, pois tal evento poderia ocorrer devido a algumas espécies serem naturalmente hidrofóbicas, o que induziria a formação de colapso da gota sem a síntese de moléculas surfactantes.

O teste de deslocamento de óleo é outro método que analisa as propriedades tensoativas (IBRAHIM *et al.*, 2013), o mesmo pode ser utilizado quando a quantidade ou a atividade de biossurfactante for pequena (PLAZA; ZJAWIONY; BANAT, 2006), pois quanto maior o diâmetro melhor a ação de superfície do biossurfactante com redução da tensão superficial (BAI; BRUSSEAU; MILLER 1997; SANTOS *et al.*, 2016). Assim, ao analisar os cultivos totais das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica*,

verificou-se baixa atividade de deslocamento de óleo. Nessa perspectiva, trabalhos com a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* demonstrou 6 cm de diâmetro de atividade de deslocamento de óleo (NETA, 2021). Enquanto outro estudo com *P. guilliermondii* YK 32 detectou deslocamento máximo de óleo igual a 7,5 cm (SHARMA; SANGWAN; KAUR, 2019).

Assim, a determinação de biossurfactantes em microrganismos pode ser baseada também na análise das propriedades de emulsificação e tensoativas do sobrenadante da cultura, porém o tipo de atividade vai depender das características do microrganismo alvo (TRINDADE *et al.*, 2021). Nesse contexto, quando foi analisado o IE₂₄% dos sobrenadantes das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* nos diferentes meios de cultivo, não foi detectada atividade de emulsão. Porém é possível encontrar boas atividades de emulsão no sobrenadante livre de células com *Bacillus* sp. (RAM *et al.*, 2019).

5.9 Determinação do rendimento da biomassa e avaliação da tensão superficial

A determinação e análise de biomassa pode ser uma boa estratégia também para compreender a produção de biossurfactantes e o seu rendimento (KAUR *et al.*, 2022). Vale destacar que, a síntese de biomassa e o seu rendimento também pode sofrer influência pelo meio de cultura, as condições de cultivo, pH e temperatura (BRAVO *et al.*, 2000; CASTRO-GÓMEZ, 2010). Assim, a atividade de emulsão com o sobrenadante da biomassa pós sonicação realizada neste trabalho com as linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica*, apresentou um melhor índice de emulsão (entre 58% e 60%) quando verificada junto ao tratamento não sonicado (50% e 55%), indicando que o tratamento ultrassônico pode garantir efeitos na liberação de moléculas com atividade emulsificantes/biossurfacantes se estas estiverem aderidas a parede celular.

Nossa hipótese é que o biossurfactante esteja aderido à parede, tendo em vista que, as emulsões ocorreram nas condições com cultivo total, enquanto que no sobrenadante livre de células não ocorreu atividade, porém houve redução da tensão superficial. Nessa esfera, sabe-se que alguns microrganismos podem liberar biossurfactantes extracelularmente ou até mesmo aderidos à célula (DESAI; BANAT, 1997). Por exemplo, um estudo demonstra que algumas linhagens de bactérias reduziram a tensão superficial no cultivo, e a outra parte delas com atividade de redução no sobrenadante livre de células, sugerindo que as primeiras linhagens

produziram biossurfactante aderido ou como parte da parede (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009).

Desse modo quando o biossurfactante estar aderido a parede celular, sabe-se que é um importante fator para interações com fontes de hidrocarbonetos (MARCHI *et al.*, 1997). Por exemplo, em um estudo com *Alcanivorax borkumensis* capaz de produzir uma molécula tensoativa de natureza glicina-glicolípido na parede celular capaz de auxiliar na degradação de hidrocarbonetos (CUI *et al.*, 2022). Além disso, vale lembrar também que as fontes de carbono podem influenciar na produção de biossurfactantes aderidos ou não à parede celular (GOGOTOV; KHODAKOV, 2008).

A medida da tensão superficial utilizando o sobrenadante da cultura é uma outra alternativa de técnica direta para triagem preliminares de microrganismos produtores de biossurfactante (WALTER; SYLDATK; HAUSMANN, 2013.). Assim, as linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* apresentaram redução da tensão superficial promissora com os sobrenadantes nos tratamentos com o cultivo total, biomassa pós sonicção e não sonicada, pois todas as reduções foram oriundas de cultivos com apenas 48h. Tendo em vista que, bons surfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 até 35 mN / m (SANTOS *et al.*, 2016).

Nesse campo de discussão um estudo também relatado para esse gênero com a espécie *P. anomala* demonstrou redução da tensão superficial da água para 33 mN/m (THANIYAVARN *et al.*, 2008). Já ao avaliar a tensão superficial de uma linhagem de *C. tropicalis* de manguezais foi possível detectar resultados redução da tensão superficial da água para 28,8 mN/m em condições de cultivo de 96h (RUBIU-RIBEAUX *et al.*, 2017).

Assim, apesar da seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes ser muitas vezes guiada pela avaliação da tensão superficial, vale ressaltar que os microrganismos com atividade emulsificantes não obrigatoriamente precisam possuir a capacidade de reduzir a tensão superficial (YOUSSEF *et al.*, 2004). Pois, conforme Souza *et al.* (2012), os microrganismos podem produzir em algumas condições apenas biossurfactantes com propriedades emulsificantes e em outras, biossurfactantes com atividade de redução da tensão superficial.

6.5 Avaliação do efeito de diferentes temperaturas, pH e salinidade sobre a estabilidade dos biossurfactantes

A faixa de temperatura de atuação e tolerância do biossurfactante é um outro fator que pode interferir na qualidade, na quantidade produzida, e na estabilidade das emulsões (CALVO *et al.*, 2009). Ao observar as moléculas surfactante das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em diferentes temperaturas, observou-se boa tolerância em todas as faixas e atividade de emulsão.

Desse modo, a tolerância do biossurfactante em diferentes temperaturas pode sugerir chances de aplicação em condições que demandam uma elevada estabilidade térmica, como processos industriais de alimentos, elaboração de cosméticos, processos farmacêuticos e até têxteis (LIMA, 2007). Além disso a temperatura pode inferir no grau de hidratação das micelas e nos aspectos de estabilidade das ligações de hidrogênio presentes (SHE; GANG; MU, 2012).

O pH é também um outro parâmetro que influencia em diferentes propriedades na produção de biossurfactantes, como estabilidade, tensão superficial, formação de micelas, e até mesmo aplicabilidade (WALTER; SYLDATK; HAUSMANN, 2013; SANTOS *et al.*, 2016). Ao analisar os resultados observou-se as linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* apresentaram capacidade de emulsionar entre os pH 2 e 4, porém perderam atividade para as outras faixas de pH testadas.

Nestes termos, O pH é fundamental para explorar aplicações diversas, como em um estudo com um biossurfactante produzido a partir de *Rhodotorula* sp. YBR, com capacidade para remover hidrocarbonetos de solos contaminados com elevada atividade emulsificante em faixas de pH variando de 2 até 12 (DERGUINE-MECHERI; KEBBOUCHE-GANA; DJENANE, 2021). Além disso, o pH é importante na produção de biossurfactantes em aplicações com ação bacteriostática e fungistática (BUENO, SILVA, GARCIA-CRUZ, 2010).

Enquanto que para fins de otimização a determinação do pH ideal para produção de biossurfactantes, pois um pH mais alto em torno de 8 pode diminuir a atividade de alguns biossurfactantes para alguns microrganismos (ROY, 2017). Logo, o pH e a temperatura atuam no comportamento de agregação de diferentes tamanhos e estruturas químicas, e ambos podem ser analisados de forma combinada ou independente, já que podem impactar o estado de hidratação das moléculas (ORTIZ *et al.*, 2021)

No que se diz respeito a tolerância a diferentes concentrações de salinidade, Segundo Santos *et al.* (2016), é um fator que pode ser importante, tendo em vista que muitos biossurfactantes podem tolerar até 10% de NaCl, enquanto que os sintéticos podem perder atividade em faixas de até 2%. Assim, observando os resultados, as linhagens não apresentaram atividade de emulsão nas diferentes concentrações de salinidade testadas. Porém, é possível encontrar variados estudos com diferentes microrganismos produtores de biossurfactantes apresentando diferentes faixas de tolerância de salinidade (LUNA; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2009; MENESES *et al.*, 2017; MARCELINO *et al.*, 2019; CHAVES *et al.*, 2021).

6.6 Atividade emulsificante em diferentes fontes de hidrocarbonetos e capacidade de crescimento na presença de querosene e petróleo

Ao analisar o IE_{24%} frente a diferentes hidrocarbonetos das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* observou-se um melhor índice na presença de tolueno. O diesel foi a única fonte de hidrocarboneto que não ocorreu emulsão. Entretanto, pode-se encontrar na literatura leveduras capazes de emulsionar e degradar diesel (BABAEI; HABIBI, 2018). Vale ressaltar que as espécies capazes de emulsificar diferentes hidrocarbonetos pela produção de biossurfactantes, podem ser promissoras a contribuir com a redução da tensão superficial, permitindo beneficiar processos de biodegradação no meio ambiente (LI *et al.*, 2020).

Vale destacar, que as linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* apresentaram capacidade de crescimento e emulsão na presença de petróleo e querosene, sendo em querosene o melhor índice de emulsão. Dessa forma observando na literatura composição dos hidrocarbonetos testados, é sugestivo que o biossurfactante/emulsificante produzido possa ter uma melhor afinidade por querosene que possui uma mistura (9-17 carbonos) com reduzidas frações de substâncias aromáticas e insaturadas, enquanto que o petróleo, é uma mistura complexa (1-38 carbonos). Nessa perspectiva, a emulsificação de hidrocarbonetos pode sugerir o aumento da biodisponibilidade de contaminantes ambientais como o petróleo e seus derivados (MOTA; LISBOA, 2020).

As mesmas linhagens também apresentaram uma melhor capacidade de emulsionar o tolueno entre os diferentes hidrocarbonetos testados, não sendo possível emulsionar o diesel, o que pode ter relação com a estrutura química dos mesmo, tendo em vista que o tolueno possui apenas 7 carbonos, enquanto o diesel

pode possuir uma estrutura de até 20 carbonos como apresentado no apêndice E (PETROBRAS, 2021).

6.7 Quantificação de proteínas, açúcares redutores e totais

O teste de Bradford pode auxiliar na elucidação da natureza das estruturas envolvidas na produção dos biossurfactantes (SERI *et al.* 2019). Por exemplo, Rufino e colaboradores (2014), por meio da determinação da concentração de proteínas encontraram teor de 50% para o biossurfactante produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica*. Enquanto estudos com *Rhodococcus opacus* R7 os autores atribuíram com a quantificação de proteínas à natureza de aminoácidos e compostos peptídicos (ZAMPOLLI *et al.*, 2022).

Conforme Santos *et al.* 2019, alguns microrganismos também podem reduzir carboidratos como fonte energia para a síntese de biossurfactantes. Quando se analisou a concentração de açúcares redutores, apenas no sobrenadante do cultivo para as linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* foi detectada uma maior concentração de glicose. Enquanto para açúcares totais as linhagens apresentaram nos sobrenadantes do cultivo alta concentração de açúcares.

6.8 Análise da biomassa celular por espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)

A análise dos resultados da espectroscopia de FTIR permite inferir a presença de grupos funcionais sugestivos de uma estrutura química dos compostos biossurfactantes de natureza glicídica e lipídica. Dentro dessa abordagem, um estudo similar investigou amostras de biomassa celular da levedura *Pichia caribbica* produtora de soforolipídeos e identificou perfis espectrais semelhantes ao observado para *C. (Pichia) pseudolambica*, associando-os a grupos funcionais característicos de estruturas complexas formadas por carboidratos e lipídios. Tais resultados foram subsequentemente confirmados por espectrometria de massa de alta resolução, revelando ser o composto surfactante um glicolipídeo (JOSHI-NAVARE; SINGH; PRABHUNE, 2014).

Em outros relatos, a técnica de FTIR, associada ou não à ressonância magnética nuclear, foi utilizada também à elucidação da estrutura química de compostos biossurfactantes do tipo glicolipídios através da identificação de grupos funcionais importantes (FELIX *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*,

2013) presentes em bioamostras de leveduras (CHADRAN *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2016). Dessa forma, outros estudos e técnicas são necessários para a confirmação da natureza da estrutura do bioemulsificante/biossurfactante das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica*, que é sugestiva de uma estrutura formada por carboidratos e lipídeos.

7 CONCLUSÃO

- A bioprospecção de leveduras produtoras de biossurfactantes oriundas de sedimentos de manguezais da APA Costa dos Corais, Alagoas, Brasil, levou à seleção de 6 linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* com atividades de emulsificantes/biossurfactante promissoras e ainda não reportadas na literatura, ressaltando o papel dos manguezais como fonte de leveduras produtoras de biossurfactantes e lipases.
- Entre as linhagens selecionadas, 3 delas se destacaram (LS 76, LS 101 e LS 165), formando emulsões com valores de IE_{24%} entre 59% e 60% e com boa estabilidade.
- As moléculas produzidas pelas linhagens testadas foram resistentes a altas temperaturas, tolerantes a pHs ácidos, não apresentando atividade em diferentes condições de salinidade.
- A atividade de emulsão do sobrenadante do cultivo total foi negativa, enquanto que sobrenadante da biomassa não sonicada e sobrenadante da biomassa pós sonicação apresentaram bons índices de emulsão, indicando que o biossurfactante pode estar aderido à parede celular.
- A análise da biomassa por espectroscopia de infravermelho (FTIR) revelou bandas sugerindo a presença de grupos funcionais e ligações associados a uma estrutura sugestiva de carboidratos e lipídios, o que pode indicar um biossurfactante da classe dos glicolipídeos. Todavia, estudos subsequentes utilizando outras técnicas analíticas são necessários à confirmação daquele resultado.

8 PERSPECTIVAS

Como perspectivas do trabalho, ainda é necessário avaliar a concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes, purificar o biossurfactante a partir da parede celular, assim como caracterizar quimicamente a estrutura molecular do(s) composto(s) biossurfactante(s) por técnicas espectroscópicas e cromatográficas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCCORSINI, F. R. *et al.* Production of biosurfactants by yeasts using soybean oil and glycerol as low-cost substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2012.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M. *et al.* Ramnolipídios: Diversity of microbial structures, origins, and functions. **Application Microbiology Biotechnology**. v. 86, p. 1323–1336, 2010.
- ABADE V. *et al.* A review on the physico-chemical and biological applications of biosurfactants in biotechnology and pharmaceutical products. **Heliyon**, v. 8, n. 8, 2022.
- ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**. p. 1-11, 2020.
- ALMEIDA, G. A. M.; NETA, M. R. A. V.; SILVA, G. F.; PRADO, P. F.; ALMEIDA, M. A.; DUARTE, I. C. S. Produção de biossurfactante por *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. **Revista Matéria**, v. 25, n. 4, 2020.
- ALMEIDA, D. G. Produção, caracterização e aplicação de biossurfactante como agente de remediação em ambiente marinho. 2017. 142 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, p. 142, 2017.
- ANDADOR, J. D. *et al.* Chlorophyll-free oil-degrading alga *Prototheca zopfii*. **Nature**, v. 254, p. 423–424, 1975.
- ANTONIOU, E.; FODELIANAKIS, S.; KORKAKI, E.; KALOGERAKIS, N. Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, p. 2-14, 2015.
- AMARAL, P. F. F. *et al.* Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, 2006.
- ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactants: anticorrosive, antibiofilm, and antimicrobial properties. **Química Nova**, v.36, n.6, p. 848-858, 2013.
- ARUMUGAM, T *et al.* Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 107-225, 2017.
- ATAKPA, O. E. *et al.* Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture of biosurfactant-producing fungi and bacteria. **Chemosphere Journal**, v. 290, 2022.
- AZMAN, A. S. *et al.* Mangrove rare actinobacteria: Taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–15, 2015.

AZEVEDO, P. R. et al. Genome sequence of *Shewanella corallii* strain A687 isolated from pufferfish (*Sphoeroides spengleri*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, 2020.

AZEVEDO, C. M. A. Bioprospecção e Coleta de Material Biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. 2ª Ed. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 2003.

BAI, G.; BRUSSEAU, M. L.; MILLER, R. M. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 25, p. 157-170, 1997.

BABAEI, F.; HABIBI, A. Fast biodegradation of high-concentration diesel hydrocarbons by the sophorolipid-producing yeast *Candida catenulata* KP 324968. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 240-254, 2018.

BAHIA, M. F. et al. Production of rhamnolipids from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

BANCERZ, R. Industrial application of lipases. **Postepy biochemii**, v. 65, n. 4, p. 335-341, 2017.

BALAN, S. S.; KUMAR, C. G.; JAYALAKSHMI, S. Physicochemical, structural and biological evaluation of Cybersan (trigalactomargarate), a new glycolipid biosurfactant produced by a marine yeast, *Cyberlindnera saturnus* strain SBPN-27. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 171-180, 2019.

BALASUBRAMANIAN, A.; SHANMUGASUNDARAM, A. Screening of Rhizosphere microorganisms from mangroves forest for saline tolerance and antibiotic resistance. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 1, p. 1-6, 2016.

BALOCH, K. A. et al. The Occurrence of Triple Catalytic Characteristics of Yeast Lipases and Their Application Prospects in Biodiesel Production from Non-Edible *Jatropha curcas* Oil in a Solvent-Free System. **Current Microbiology**, v. 78, p. 1924-1925, 2021.

BANAT, I. M. et al. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. **Frontiers in Microbiology**, n. 5, p. 1–18, 2014.

BANAT, I. M. Biosurfactant production and use in microbial enhanced oil recovery and possible uses in pollution remediation: A Review. **Bioresource Technology**, n. 51, p. 1-12, 1995.

BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. dos Manguezais do Brasil. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018.

BARRIGA, J. A. T. *et al.* Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 25, p. 96-102, 1999.

BARRIUSO, J. *et al.* Structural features and catalytic versatility of lipases *Candida rugosa*: Uma revisão. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 874-885, 2016.

BENJAMIM, S.; PANDEY, U. Lipases from *Candida rugosa*: molecular biology and versatility in biotechnology. **Review Yeast**, v. 14, p. 1069-87, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 1976, p. 248-254, 1976.

BRAVO, C. E. C. *et al.* Determining ideal conditions for poligalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, p.103-136, 2000.

BRAVO-MARTINS, C. E. C. Production of cellulolytic enzymes by anaerobic fungi cultivated in different conditions. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, p. 14-13, 2009.

BELLO, X. V. *et al.* Study of the Synergistic Effects of Salinity, pH, and Temperature on the Surface-Active Properties of Biosurfactants Produced by *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 1258-1265, 2012.

BEHERA, B. C., SETHI, B. K., MISHRA, R. R., DUTTA, S. K., THATOI, H. N. Microbial cellulases Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 15, p. 197-210, 2016.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; GAYLARDE, C. C. Biossurfactantes. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Microbiologia ambiental. 2ª ed., p. 647, 2008.

BEZERRA, M. S. Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manípueira como fonte de carbono. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Natal, p. 123, 2012.

BHIMA, B. *et al.* Optimized Protein Extraction from Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for 2-D Gel Electrophoresis. **Journal of Theoretical and Experimental Biology**, p. 77-84, 2011.

BRITO, M. A. V. P.; VEIGA, V. M. O. Mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*: relato de um caso. **Microbiologia Ciência Rural**, v. 27, 1997.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273–80, 1988.

BOLTER, G. *et al.* *Pseudallescheria boydii* and *Meyerozyma guilliermondii*: behavior of deteriorogenic fungi during simulated storage of diesel, biodiesel, and B10 blend in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 30410-30424, 2018.

BORTOLI, D. A. S. *et al.* Leveduras e produção de cervejas – Revisão. **Bioenergia em revista: diálogos**. v. 3, p. 45-58, 2013.

BUENO, J. *et al.* Biosurfactant production by yeasts from different types of soil of the South Shetland Islands (Maritime Antarctica). **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1402-1413, 2019.

BRUMANO, L. P.; SOLER, M. F.; SILVA, S. S. Recent Advances in Sustainable Production and Application of Biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12 n. 1, 2016.

CAMPOS, J. M. *et al.* Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1164–1170, 2015.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD T. L. M.; SARUBBO L. A. Production of a Bioemulsifier with Potential Application in the Food Industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 3234 – 3252, 2014.

CAMARGO, F. P. *et al.* Characterization of biosurfactant from yeast using residual soybean oil under acidic conditions and their use in metal removal processes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, 2018.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Biosurfactant synthesis under extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520-529, 1988.

CALVO, C. *et al.* Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 12, p. 3634–3640, 2009.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte- As leveduras. **Revista Analítica**. São Paulo, 2006.

CAVALLI, R. O. Introdução a biotecnologia marinha. In: THOMPSON, F.; THOMPSON, C. **Biотecnologia Marinha**. Ed. FURG, p. 855, 2020.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 173-176, 1984.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte- As leveduras. **Revista Analítica**. São Paulo, 2006.

COLARES, G. B.; MELO, V. M. M. Relating microbial community structure and environmental variables in mangrove sediments inside *Rhizophora mangle* L. habitats. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 171-177, 2013.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v. 13, p. 85-103, 2003.

CARRASCHI *et al.* Efeitos tóxicos de surfactantes fitossanitários para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 33, n. 2, p. 191-196, 2011.

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.

CHAPRÃO, M. J.; FERREIRA, I. N. S.; CORREA, P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SILVA, E. J.; SARUBBO, L. A. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.18, p. 471–479. 2015.

CHAVES, F. S. Bioprospecção de leveduras da Antártica para a produção de biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, p. 133, 2017.

CHANDRAN, N. *et al.* Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil, **International Journal Science Nature**. v. 2, p. 63–71, 2011. CHAKRABARTI, S. Bacterial Biosurfactant: Characterization, Antimicrobial and Metal Remediation Properties. Ph.D. Thesis. National Institute of Technology; Surat, India, 2012.

CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, p. 1-49, 2020.

CHODAT, R. Monographies d'algues en culture pure. Esteira. Cripta, v. 42, p. 266, 1913.

CORTÉS-SÁNCHEZ, A. J.; SÁNCHEZ, H. H.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Atividade biológica dos glicolípídeos produzidos por microrganismos: Novas tendências e possíveis alternativas terapêuticas. **Microbiology Research**. v. 168, p. 22–32, 2013.

COLLA, L. M. *et al.* Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocess. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8308-8314, 2010.

CUTLER, A. J.; LIGHT, R. J. Regulation of hydroxydocosanoic acid sophorolipid production in *Candida bogoriensis* by the levels of glucose and yeast extract in the growth medium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 1944-1950, 1979.

CUI, J. The Glycine-Glucolipid of *Alcanivorax borkumensis* Is Resident to the Bacterial Cell Wall. **Applied and Environmental Microbiology Journal**. v. 88, p. 23;88, 2022.

DALTIN, D. Introdução e primeiros conceitos. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. Cap. 1, p. 1-44, São Paulo: Blucher 2011.

DANIEL, H. M.; LACHANCE, M. A.; KURTZMAN, C. P. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 67-84, 2014.

DANOVARO, R.; GAMBI, C.; MIRTO, S. Meiofaunal production and energy transfer efficiency in a seagrass *Posidonia oceanica* bed in the western Mediterranean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 234, p. 95-104, 2002.

DERGUINE-MERCHERI, L.; GANA-KEBBOUCHE, S.; DJENANE, D. Production of biosurfactant from newly isolated *Rhodotorula sp.* YBR and its great potential in enhanced removal of hydrocarbons from contaminated soils. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 37, n.1, 2021.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 47-64, 1997.

DESHMUKH S. K. *et al.* Fungi associated with mangroves: a new source of potential compounds. **Jornal of Fungi**, v. 4, p. 101, 2018.

DESHMUKH, N. KATHAWATE, GUNDERAO. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* Strain LTR1 and its Application. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 13, p. 1-13, 2023.

DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Production of biosurfactants by microorganisms isolated from diesel oil contaminated soil. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DE ALMEIDA, D. G. *et al.* Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1-14, 2016.

DIAS, L. R. L. *et al.* Bioprospecting of Microorganisms with Biotechnological Interest Isolated in Mangrove Ecosystem. **Revista Investigativa Biomédica**, v. 9 p. 24-30, 2017.

DIAS, A. C. F. *et al.* Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1305-1311, 2009.

DOMINGOS, D. F. *et al.* Genomic and chemical information on biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n, 7, 2015.

DUBOIS, M. K. A. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical chemistry**. v. 28, n. 3, p. 351-355, 1956.

DU NOÛY, P. L. An interfacial tensiometer for universal. **Journal of General Physiology**, v. 20, p. 625-31, 1925.

EBADI, T. *et al.* Rapid biodegradation of diazinon using a novel strain of *Candida pseudolambica*. **Environmental Technology e Innovation**, v. 25, 2022.

EI-SHEEKH; M. M.; HAMOUDA, R. A.; NIZAM, A. A. Biodegradation of crudeoil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 82, p. 67–72, 2013.

ELIZONDO, E. B. *et al.* High Productivity Makes Mangroves Potentially Important Players in the Tropical Silicon Cycle. **Frontiers in Marine Science**, v. 12, 2021.

ELDIN, A. M.; KAMEL, Z.; HOSSAM, N. Isolation and genetic identification of yeast biosurfactant producers, evaluated by different screening methods. **Microquímica Journal**, v. 146, p. 309-314, 2019.

FAKRUDDIN, M. Biosurfactant: production and application. **Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology**, v. 3, n. 124, p. 2, 2012.

FARAG, S.; SOLIMAN, N. A. Biodegradation of crude petroleum oil and environmental pollutants by *Candida tropicalis* strain. **Brazilian Arch. Biol. Technology**, v. 54, p. 821–830, 2011.

FRANÇA, I. W. L. Estudo da produção e aplicabilidade de biossurfactante bacteriano produzido por Cepa isolada de manguezal cearense. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 136, 2014.

FELSE, P. A. *et al.* Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme Microbiology Technology** v. 40, p. 316–323, 2007.

FELIPE, L O.; DIAS, S. C. Synthetic surfactants and biosurfactants: advantages and disadvantages. **Chemistry and Society**, v. 39, n 3, p. 228-236, 2017.

FELIX, A. K. N. Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Fortaleza, p. 103, 2012.

FENN, J. B. *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

FENIBO E. O.; DOUGLAS S. I.; Stanley H. O.; A review on microbial surfactants: production, classifications, properties and characterization. **Journal of Advances in Microbiology**, 1-22, 2019.

FLEET, G. H. Composition and Structure of Yeast Cell Walls. **Current Topics in Medical Mycology**, M. R. McGinnis, p. 1-33, 1985.

FELLIPE-OLIVEIRA, L.; DIAS, S. C. Synthetic surfactants and biosurfactants. **Química nova escola**. v. 39, n. 3, p. 228-236, São Paulo – BR, 2017.

FERRASOLI, K. P. Produção de biossurfactantes por *Candida tropicalis* utilizando resíduos do processamento do abacaxi (*Ananas comosus*) como substrato. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, p. 96, 2019.

FELIX, A.K.N. Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p. 21-23, 2012.

FREITAS, O. D. W. *et al.* Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI 005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and surfaces Biointerfaces**, v. 101, p. 34-43, 2013.

FILHO, S. A.; SILVA, C. G. N.; BIGI, M. F. M. A. Bioprospecção e biotecnologia. *Parceria Estratégica*. Brasília-DF, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2014.

FONSECA, T. C. S. Sustainable production of biosurfactant by *Issatchenkia orientalis* UCP 1603 using renewable substrates. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 4, p. 10, 2022.

GANJI, Z. *et al.* A novel sophorolipid-producing *Candida keroseneae* GBME-IAUF-2 as a potential agent in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **FEMS Microbiology Letters**, v. 367, n. 17, p. fnaa144, 2020.

GASPARIN, F. G. M. *et al.* Production of Lipase and Biosurfactant by a Dairy Wastewater Isolate. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, p. 28-31, 2012.

GRAN-SCHEUCH A.; FUENTES E.; BRABO D. M; JIMÉNEZ J. C.; PÉREZ-DONOSO J. M. Isolation and characterization of phenanthrene degrading bacteria from diesel fuel-contaminated Antarctic soils. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1634, 2017.

GODOY, D. P., LACERDA, L. D. Mangroves Response to Climate Change: A Review of Recent. *Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, n. 2, p. 651-667, 2015.

GOGOTOV, I. N. KHODAKOV, R. S. Surfactant production by the *Rhodococcus erythropolis* sH-5 bacterium grown on various carbon sources. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 207-12, 2008.

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, L. R.; Production of Lipase and Biosurfactant by Dairy Wastewater Isolate. **Methods in Molecular Biology**, p. 383-393, 2019.

GUEDES, E. H. S. *et al.* Agroindustrial wastes as substrate for microbial lipase production: a review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 1-10, 2021.

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

HAMZA, F. *et al.* Biosurfactant from a marine bacterium disrupts biofilms of pathogenic bacteria in a tropical aquaculture system. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, 2017.

HASHEM, M. *et al.* Biodegradation and detoxification of aliphatic and aromatic hydrocarbons by new yeast strains. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 151, p. 28-34, 2020.

HAPALA, I. *et al.* Yeast membranes and cell wall: from basics to applications. **Current Genetics**, v. 57, p. 167-169, 2013.

HOLGUIN, G. *et al.* Mangrove health in an arid environment encroached by urban development a case study. **Science of The Total Environment**, v. 363, n. 1 3, p. 260 274, 2006.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 265-278, 2001.

HURTADO-GUERRERO, R. *et al.* Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 8461–8469, 2009.

IHEANACHO, C. C. *et al.* Hydrocarbon degradation potentials of indigeneous fungal isolates from a petroleum hydrocarbon contaminated soil in Sakpenwa community, Niger Delta. **Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology**, v. 3, p. 1-6, 2016.

IQBAL, S.; KHALLD, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 176-179, 1995.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985-992, 2005.

ISLAS, D. J.; MORENO, S.A. M.; RODRÍGUEZ, J.N.G. Biosurfactant properties, applications and production: A review. *Revista internacional de contaminação ambiental*, v. 26, n. 1, p. 65–84, 2010.

IBRAHIM, H. A. H. Bio-surfactants: a package of environmental and industrial benefits. **International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research**, Issue 12, p. 4275-4291, 2018.

JEZIERSKA, S.; CLAUS, S.; BOGAERT, I. V. Glycolipidic biosurfactants from yeast. **FEBS Letters**, v. 594, p. 1312-1329, 2017.

JIA, S. L. *et al.* Fungi in mangrove ecosystems and their potential applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 6, p. 852-864, 2020.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. p. 184, 2019.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: some hot issues and Kasturi Joshi-Navare¹, Pradeep Kumar Singh^{1, 2} and Asmita A. Prabhune¹ recent developments. **Biotechnology Advances**, v.26, p.457–70, 2008.

JOSHI-NAVARE, K.; SINGH, P. K.; PRABHUNE, A. A. New yeast isolate *Pichia caribbica* synthesizes xylolipid biosurfactant with enhanced functionality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 1-10, 2014.

JUNIOR, N. L. S. Bioprospecção e desenvolvimento sustentável. **Revista Desafios do Desenvolvimento**, v. 9, Edição 73, 2012.

KALOGIANNIS, S. *et al.* Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 249–256, 2003.

KAMAT S. *et al.* Coupled production of single cell oil as biodiesel feedstock, xylitol and xylanase from sugarcane bagasse in a biorefinery concept using fungi from the tropical mangrove wetlands. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 246–253, 2013.

KAUR, K.; SANGWAN, S.; KAUR, H. Production of biosurfactant by yeasts isolated from hydrocarbon-polluted environments. **Evaluation of environmental monitoring**, v. 189, p. 603, 2017.

KREISCHER, A. C.; SILVA, L. P. Bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes a partir de solo contaminado por agrotóxicos. **Revista Estácio Saúde**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2017.

KRELING, N. E. *et al.* Biosurfactant production: intracellular manoproteins and extracellular sophorolipids by *Saccharomyces cerevisiae*. **Environmental Sanitary Engineering**. v. 24, p. 1209-1219, 2019.

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

KIM, H. S. *et al.* Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 8, n. 1, p. 41-46, 1997.

KONISHI, M. *et al.* Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calyptogena soyo* (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 169-175, 2010.

KUBICKI, S. *et al.* Marine biosurfactants: biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. **Marine Drugs**, v. 17, n. 7, p. 408, 2019.

KUNTHIPHUN, S. *et al.* Diversity and characterization of cultivable oleaginous yeasts isolated from mangrove forests. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 125, 2018.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among *Pichia*, *Issatchenkia*, and *Williopsis* species determined from multigene sequence analysis and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov., and *Wickerhamomyces* gen. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 939–954, 2008.

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W. The yeasts, a taxonomic study. 4. ed. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**, p. 1888, 1998.

KAUR H. *et al.* Biosurfactant production prospects of a Gram-negative bacterium-*Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae* BK34. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, p. 374, 2022.

KURTZAMAN, C. P.; BOEKHOUT, T. Yeast as Distinct Life Forms from Fungi. **Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology**. p. 1-37, 2017.

LAWNICZAK, L.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Application Microbiology Biotechnology**. v. 97, p. 2327–2339, 2013.

LASS-FLORL, C.; MAYR, A. Human Protothecosis. **Clinical Microbiology Reviews**. Innsbruck, p. 230-242, 2007.

LIMA, L. B. Frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Ceará. Ceará, p. 67, 2013.

LI, Q.; LIU, J.; GADD, G. M. Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 899-9008, 2020.

LIMA, C. J. B. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. Uberlândia, p. 190, 2007.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes*. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, p. 267-298), 2017.

LOPES, M. *et al.* Simultaneous degradation of hydrocarbons and production of valuable compounds by *Yarrowia lipolytica*. **CHEMPOR**, 2018.

LÓPES-PRIETO, A. *et al.* Characterization of extracellular and cell bound biosurfactants produced by *Aneurinibacillus aneurinilyticus* isolated from commercial corn steep liquor. **Microbiological Research**, v. 242, 2021.

LUNA, J. M. *et al.* Evaluation Antimicrobial and Antiadhesive Properties of the Biosurfactant Lunasan Produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1527-34, 2011.

LUNA, J. M.; RUFINO R. D.; JARA, A. M. A. T.; BRASILEIRO, P. F.; SARUBBO, L. A. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids Surf A Physicochem Eng Asp**, v. 480, p. 413–418, 2015.

MAHJoubi, M. *et al.* Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. **New Biotechnology, Elsevir**. p. 1-11, 2013.

MARCHANT, R. *et al.* Biosurfactants: Production and Utilization-Processes, Technologies, and economics. Taylor and Francis Group, Nova York, EUA, v. 159, p. 3-371, 2015.

MARQUES, L. G. *et al.* Redes de bioprospecção no brasil: cooperação para o desenvolvimento tecnológico. **Revista de Desenvolvimento Econômico**, v. 15, n. 28, p. 9, 2014.

MARQUES N. S. A. A. *et al.* Eco-Friendly Bioemulsifier Production by *Mucor circinelloides* UCP0001 Isolated from Mangrove Sediments Using Renewable Substrates for Environmental Applications. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 1-15, 2020.

MARTINS, C. V. B.; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Protoplast fusion of *Saccharomyces cerevisiae* evaluated by flocculation and H₂S production. **Scientia Agricola**, v. 55, 1998.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-production of lipase and biosurfactant in solid state for use in bioremediation of vegetable oils and hydrocarbons. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 6, 2008.

MARTINS, S. C. S.; ARAGÃO, V. O.; MARTINS, C. M. *Pichia* spp. yeasts from Brazilian industrial wastewaters: Physiological characterization and potential for petroleum hydrocarbon utilization and biosurfactant production. **Jornal Africano de Pesquisa em Microbiologia**, v. 8, pp. 664-672, 2014.

MARCHI, D. D.; CARVALHO, D. F.; DURRANT, L. R. Produção de biosurfactantes bacterianos em óleos vegetais e derivados de petróleo. *Microbiologia aplicada ao Meio Ambiente*, Florianópolis. 1998.

MARTINHO, V. *et al.* Enzymatic potential and biosurfactant production by endophytic fungi from mangrove forest in southeastern Brazil. **AMB Express**, v. 9, n. 130, 2019.

MANOUSI, N. ZACHARIADIS G. A. Recent Advances in the Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Environmental Samples. **Molecules**, v. 25, p. 2182, 2020.

MATATKOVA, O *et al.* Using Odd-Alkanes as a Carbon Source to Increase the Content of Nutritionally Important Fatty Acids in *Candida krusei*, *Trichosporon cutaneum*, and *Yarrowia lipolytica*. **International Journal of Analytical Chemistry**, p. 9, 2017.

MATSUURA, A. B. J. Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação. 2004. 98 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

MIRANDA, M. L. P. *et al.* Avaliação da produção de lipases e biossurfactante por microrganismos isolados de sedimentos do manguezal da Baía Babitonga em Santa Catarina, Brasil. **Revista NBC**, v. 9, n. 18, 2019.

MORITA, T. *et al.* Isolation and Screening of Glycolipid Biosurfactant Producers from Sugarcane. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, p. 1788-1791, 2012.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1488, n. 3, p. 211-218, 2000.

MOTA, A. C.; LISBOA, L. A. M. Soil contamination by hydrocarbons: an assessment in rice development. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. 1-12, 2022.

MUJUMDAR, S.; JOSHI, P.; KARVE, N. Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: A review. **Journal of basic microbiology**, p. 1-11, 2018.

NANDY, S. K.; SRIVASTAVA, R. K. A review on sustainable biotechnological processes and applications of yeasts. **Research in Microbiology**, v. 207, p. 83-90, 2018.

NETA, M. R. A. V. Produção de biossurfactante por *Rhodotorula mucilaginosa*, em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte. Tese (Doutorado em Recursos Renováveis) Universidade Federal de Sorocoba. Sorocoba, p. 137, 2021.

NETO, W. R. N. *et al.* Detecting microorganisms producing surface active compounds in mangrove sediments in São Luís, Maranhão. **Ciência e Natura**, v. 42, p. 1-15, 2020.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Journal of Life Sciences**, v. 7, n. 6, p. 559-569, 2013.

NIMKANDE, V. D.; BAFANA, A. A review on the usefulness of microbial lipases in wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**. v. 46, p. 1-32, 2022.

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

NOGUEIRA, K. P. M. Produção de Biossurfactantes por bactérias isoladas do solo de meloeiro. 2019. Monografia (Curso de Biotecnologia) – Universidade Federal Rural do Semi-árido. Mossoró, Rio Grande do Norte, p. 39, 2019.

NGUYEN, V. P. Ecophysiological responses of young mangrove species *Rhizophora apiculata* (Blume) to different chromium contaminated environments. **Science of The Total Environment**, v. 574, p. 369–380, 2017.

NWAGUMA, I. V.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Isolation and molecular characterization of biosurfactant-producing yeasts from saps of *Elaeis guineensis* and *Raphia africana*. **Microbiology Research Journal International**, p. 1-12, 2019.

OCAMPO, G. Y. Role of biosurfactants in nature and biotechnological applications. **Journal Bacteriology Mycology Ope**. v. 2. p. 95-96, 2016.

ORTIZ, J et al. Effect of pH and temperature on the aggregation behavior of dirhamnolipid biosurfactant: An experimental and molecular dynamics study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 597, p. 160-170, 2021.

OLIVEIRA, T. S.; et al. Antimicrobial activity of biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. CCMICS 105. **Scientia Plena**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2022.

OLIVEIRA, E. M. Different strategies to increase the biosurfactant production of a *Paenibacillus* sp. isolate (BR13834). **Research Society and Development**, v. 10, n. 17, p. 1-11, 2021.

PATEL, K.; PATEL, F. R. Screening of biosurfactant producing yeasts isolated from mangrove ecosystem of Surat region of Gujarat, India. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 13, p. 1927-1934, 2020.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 91-94, 2003.

PATRA, J. K.; MISHRA, R. R.; THATOI, H. Biotechnological Utilization of Mangrove Resources. **Elsevier Books**. 1^a Ed. p. 512, 2020.

PÉREZ-ARMENDÁRIZ, B. et al. Emulsification of hydrocarbons using biosurfactant-producing strains isolated from contaminated soil in Puebla, Mexico. **Engineering and Technology**, p. 22, 2013.

PEREIRA, J. F. et al. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolate towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259-268, 2013.

PETROBRAS. Manuais técnicos de hidrocarbonetos, informações técnicas. 2021.

PINTO, M. I. S. et al. A biosurfactant from *Candida bombicola*: its synthesis, characterization, and application as food emulsions. **Foods**, v. 11, n. 4, p. 561, 2022.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Bacteria biosurfactants production kinetic evaluation. **Químico New**, v. 32, p. 1-5, 2009.

PINHEIRO, T. M. A. Produção de biossurfactantes e l-asparaginase pelo uso de fungos. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 88, 2017.

PRIYA, A.; SAMA, M.; LAB, B. Isolation and characterization of *Candida vishwanathii* strain TERI MS1 for degradation of petroleum hydrocarbons in marine environment. **Desalination and Water Treatment**. v. 57, p. 22099–22106, 2016.

QAZI, M. A.; WANG, Q.; DAI, Z. Sophorolipids bioproduction in the yeast *Starmerella bombicola*: Current trends and perspectives. **Bioresourch Technology**, v. 346, 2022.

RAMKRISHNA, S. Biosurfactants. Springer Science e Business Media, 2010.

REBELLO, S. *et al.* Biosynthesis and Technological Advancements of Biosurfactants. In: Biosynthetic Technology and Environmental Challenges. **Singapore: Springer**, p. 167–183, 2018.

RIBEAUX, D. R. Produção, otimização, caracterização e atividade antifúngica do biossurfactante produzido por *Candida Tropicalis* UCP 1613. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco, p. 109, 2020.

RODRÍGUEZ-SALARICHS, J. *et al.* Versatile Lipases from the *Candida rugosa*-like: A Mechanistic Insight Using Computational Approaches. **Journal of Chemical Information**, v. 61, p. 913-920, 2021.

VARGAS, K. C. Estudo dos efeitos da radiação ultravioleta C e TFD em células de *Saccharomyces boulardii* e *Candida albicans*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de pós-graduação em Engenharia elétrica e informática industrial. Paraná, p.78, 2011.

RAM, H. *et al.* A novel fatty alkene from marine bacteria: A thermo stable biosurfactant and its applications. **Journal of Hazardous Materials**, v. 380, p. 1-10, 2019.

RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 434, 2020.

ROY, A. Biosurfactant Producing Microbe Isolation and Effect of Different pH on its Growth. **Research and Reviews in BioSciences**, v. 12, p. 135, 2017.

RON, E.; ROSEMBERG, E.; Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3. p. 229-246, 2001.

RUFINO, R. D. *et al.* Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 17, p. 34-38, 2014.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.23, p. 729-734, 2007.

RUFINO, R.D. *et al.* Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 907–914, 2008.

RUBIO-RIBEAUX, D. S. A. *et al.* Promising biosurfactant produced by a new *Candida tropicalis* UCP 1613 strain using substrates from renewable resources. **African Journal of Microbiology Research**. v. 11, p. 981-991, 2017.

SABU, C.; MUFEEDHA, P.; PRAMOD, K. Yeast-inspired drug delivery: biotechnology meets bioengineering and synthetic biology. **Expert Opinion on drug Delivery**, v. 16, p. 27-41, 2019.

SAIMMAI, A.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. Production of biosurfactants from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. **Annals Microbiology**, n. 62, v. 1, p. 391–402, 2011.

SAIMMAI, A. *et al.* An efficient biosurfactant producer bacterium *Selenomonas ruminantium* CT2 isolated from mangrove sediment in southern Thailand. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 87-102, 2012.

SALLADA, N. D.; HARKINS, L. E.; BERGER, B. W. Effect of gene copy number and chaperone coexpression on recombinant hydrophobin HFBI biosurfactant production in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, p. 2029-2040, 2019.

SARMA, H.; BUSTAMANTE, K. L. T. PRASAD, M. N. V. Biosurfactants for oil recovery from refinery sludge: Magnetic nanoparticles assisted purification. **Industrial and Municipal Sludge**, p. 107-132, 2019.

SARI, C. N.; HERTADI, R.; GOZAN, M.; ROSLAN, A. M. Factors Affecting the Production of Biosurfactants and their Applications in Enhanced Oil Recovery (EOR). A Review. **Iop Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S.L.], v. 353, 31 out. 2019

SANTOS, R. G; ROSA, P. T. V; MARCONDELLI, A. C; HENRIQUES, C. M. T; MERLI, I. D; CAMARGO, M. G. B; MOURA, T. V. Soil remediation: removal of aromatic hydrocarbons. **Chemistry and derivatives**, p. 1-4, 2014.

SANTOS, C. V. M. *et al.* Biosurfactantes conceitos gerais e perspectivas. Editora científica, 2021.

SANTOS D. K. F.; *et al.* Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 17, p. 401, 2016.

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

SANTOS, A. P. P. *et al.* Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 11, n. 51, p. 1-10, 2018.

SANTOS, E. C. L. *et al.* Environmental Sciences Biosurfactant Production by *Bacillus* strains isolated from sugar cane mill wastewaters. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. 1-12, 2019.

SANTOS, D.K.F. *et al.* Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent, **Process Biochem**, p. 8, 2016.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 54, p. 68–73, 2007.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactantes, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 436-450, 2010.

SHANKAR, T. *et al.* Biomedical and therapeutic potential of exopolysaccharides from *Lactobacillus paracasei* isolated from sauerkraut: screening and characterization. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 2943-2950, 2021.

SHARMA, P.; SANGWAN, S.; KAUR, H. Process parameters for biosurfactant production using yeast *Meyerozyma guilliermondii* YK 32. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 191, n. 9, p.531, 2019.

SHE, A. Q.; GANG, H. Z.; MU, B. Z. Temperature influence on the structure and interfacial properties of surfactin micelle: A molecular dynamics simulation study. **Journal of Physical Chemistry**, v. 116, n. 42, p. 12735–12743, 2012.

SHOEB, E. *et al.* Screening and characterization of biosurfactant producing bacteria isolated from the Arabian Sea coast of Karachi. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, p. 210-216. 2015.

SILVA, E. J. *et al.* Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 127-135, 2018a.

SILVA, A. C. S. da *et al.* Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 85, 2018b.

SILVA, A. C. S. *et al.* Production of biosurfactant by fungi as a sustainable alternative. **Agricultural Microbiology**. Archive of the Biological Institute, 2018.

SILVA, R. C. F. S. *et al.* Applications of biosurfactants in the petroleum industry and oil spill remediation. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 15, p. 12523–12542, 2014.

SILVA, S.N.R.L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174-183, 2010.

SILVA, I. A. et al. Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as emulsifier. **PeerJ**, v. 8, p. 906, 2020.

SINDJUSAL. Manguezais de Alagoas pedem socorro. SindJus AL, 2014.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Production of biosurfactants: emerging trends and promising strategies. **Journal of applied microbiology**, v. 126, p. 2-13, 2018.

SOUSA, T.; BHOSLE, S. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB. MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. **Bioresourch Technology**. n. 123. p. 256–262, 2012.

SOUZA, M. V. D. et al. Bioconversion of biodiesel refinery waste in the bioemulsifier by *Trichosporon mycotoxinivorans* CLA2. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, p. 1–12, 2012.

SOBRINHO, H. B. S.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; PORTO, A. L. F.; SARUBBO, L. A. Application of Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 in Removal of Petroleum Derivative from Soil and Sea Water. **Journal of Life Sciences**, v. 7, p. 559-569. 2013b.

SOBRINHO, H.B.S.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; PORTO, A.L.F.; SARUBBO, L.A. Application of Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 in Removal of Petroleum Derivative from Soil and Sea Water. **Journal of Life Sciences**, v. 7, p. 559-569, 2013.

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

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. et al. Rhamnolipídios produzidos por *Pseudomonas*: da genética molecular ao mercado. **Microbiology Biotechnology**, v. 14, p. 136-146, 2021.

SPERB, J. G. C. et al. Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385-397, 2015.

STEINBÜCHEL, A. Biosurfactants: From genes to applications. **Springer**, 2011.

STARMER, W. T.; LACHANCE, M.A. Yeast ecology. **The yeasts**. p. 60-89, 2011.

TAVARES, T. C. L. et al. Microbiome Associated with the Mangroves of the Brazilian Semiarid as Reserves of Richness and Complexity in a Changing World. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

THANIYAVARN, J. *et al.* Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. **Bioscience Biotechnologyn Biochemistry**, v. 72, n. 8, p. 1-8, 2008.

TIRALERDPANICH, P; SONTHIPHAND, P; LUEPROMCHAI, E; PINYAKONG, O; POKETHITIYOOK. Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis. **Marine pollution bulletin**, v. 133, p. 595–605, 2018.

THATOI, H. *et al.* Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2013.

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; TEHRANI, H. A. Preparation and characterization of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae*. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, v. 29, p. 734–737, 1996.

TODD, J. R. *et al.* Micologia médica. **Micologia Médica**, ed. 1, v. 56, n. 1, p. 188-204, 2018.

TRINDADE, M. *et al.* Screening strategies for biosurfactant discovery in: HAUSMAN, R., HENKEL, M. Biosurfactants for bio-based economy. *Advances in Biochemical/Biotechnological Engineering*, vol 181. Springer, 2021.

UENO, R. *et al.* Optimization of heterotrophic culture conditions for the utilization of n-alkanes and phylogenetic position based on the 18S rDNA sequence of a thermotolerant *Prototheca zopfii* strain. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 160-165, 2002.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, v.57, p. 1139-1150, 2004.

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.

VAUGHN, S. F. *et al.* Utilization of sophorolipids as biosurfactants for postemergence herbicides. **Crop Protection**, v. 59, p. 29–34, 2014.

VAZ, A. K. *et al.* Mastite bovina por *Prototheca* sp. em Santa Catarina: Relato de caso. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 4, n.1, p.72-75, 2005.

VELIOGLU, Z.; UREK, R. O. Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems. **Jornal Turco de Biologia**, v. 39, p. 160-166, 2015.

VECINO, X. *et al.* Optimization of liquid–liquid extraction of biosurfactants from corn steep liquor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 1629–1637. 2015.

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

VYDIA, P.; SEBASTIAN, C. D. Yeast Diversity in the Mangrove Sediments of North Kerala, India. **European Journal of Biology**, v. 81, p. 50-57, 2022.

ZAMPOLLI J. Identification of a Novel Biosurfactant with Antimicrobial Activity Produced by *Rhodococcus opacus* R7. **Microorganisms**. v. 21, n. 10, p. 475, 2022.

ZADEH, P. H.; MOGHIMI, H.; HAMED, J. Production of biosurfactants by *Mucor circinelloides*: Environmental applications and surface-active properties. **Engineering in Life Sciences**, v. 22, n. 18, p. 317-325, 2018.

ZARINVIARSAGH, M.; EBRAHIMPOUR, G.; SADEGHI, H. Lipase and biosurfactant from *Ochrobactrum intermedium* strain MZV101 isolated by laundry detergent for detergent application. **Lipids Health**, v. 16, p. 177, 2017.

ZIENIUK, B; FABISZEWSKA, A. *Yarrowia lipolytica*: A beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a mini-review. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 100-117, 2018

WAGNER E. D.; MARENGO, M. S.; PLEWA, M. J.; Modulation of the mutagenicity of heterocyclic amines by organophosphate insecticides and their metabolites. *Mutation Research*, v. 536, p. 103-115, 2003.

WANG, J. *et al.* Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 1-8, 2018.

WALTON, J. D. Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. **Fungal Genetic Biology**, v. 30, p. 167-171, 2000.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant-producing microorganisms. Bioscience database Madame Curie, National Library of Medicine, **National Center for biotechnology information**, 2013.

WATSON, E. S.; O'NEILL, M. J. **Differential microcalorimeter**. U.S. Patent n. 3,263,484, 2 ago. 1966.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U., Screening of bacteria, isolated from PAH contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**. v. 7. p. 415-423, 1997.

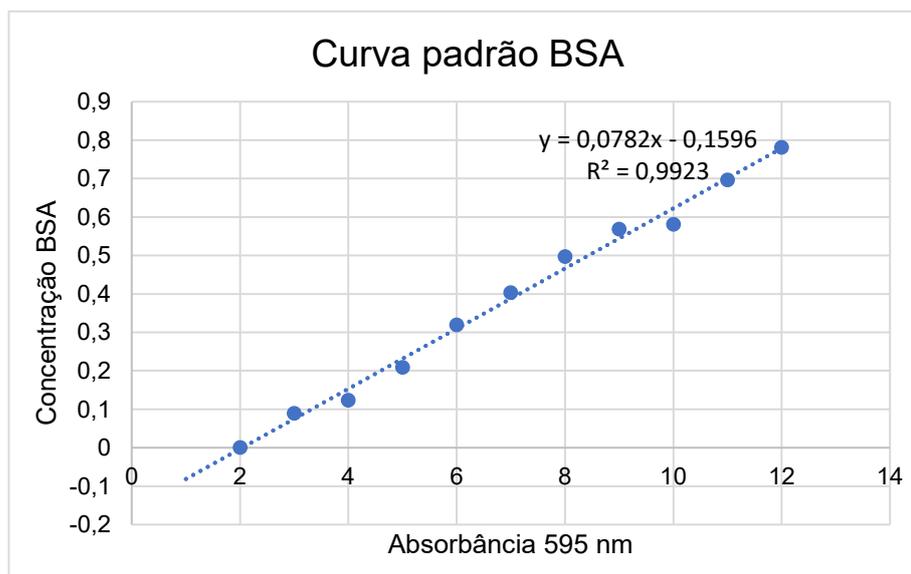
YALÇIN, H. T.; TEPEBAS, G. E.; UYAR, E. Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. **Journal of basic microbiology**, p. 1-11, 2018.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Bioreactor Design for Enhanced Carrier-assisted Surfactin Production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, v. 48, 2006.

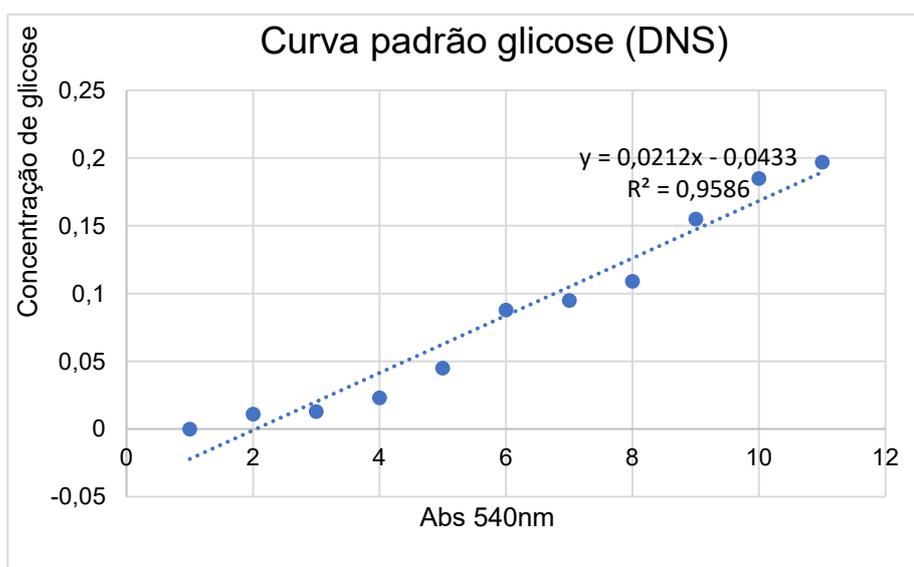
YOUSSEF, N. A. *et al.* Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 339- 347, 2004

APÊNDICES

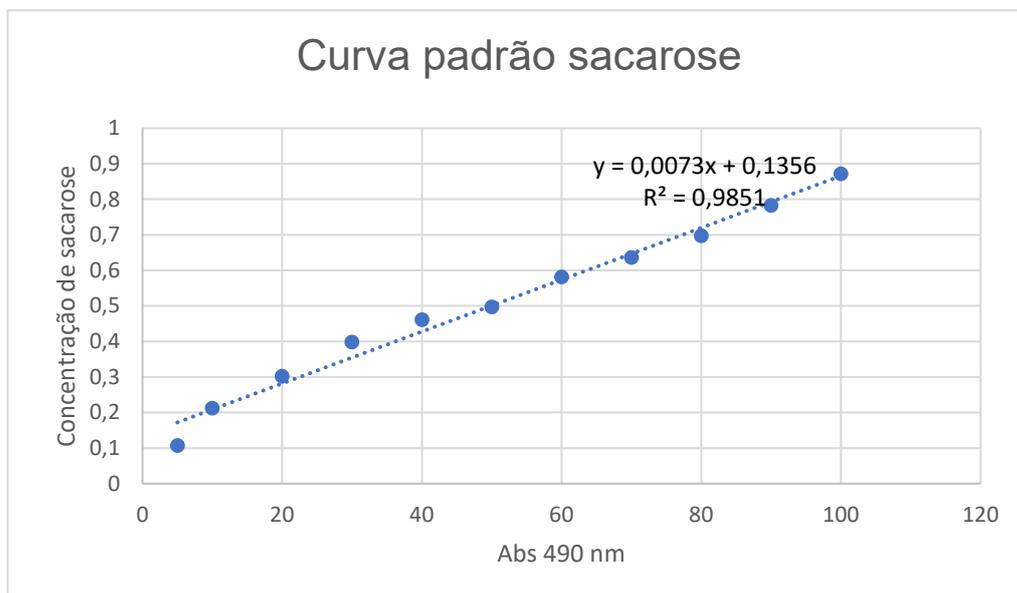
APÊNDICE A – Curva padrão de BSA (albumina sérica bovina) utilizada no teste de Bradford para quantificação de proteínas de *C. (Pichia) pseudolambica* em YEPD líquido a 26 ± 2 °C durante 168h.



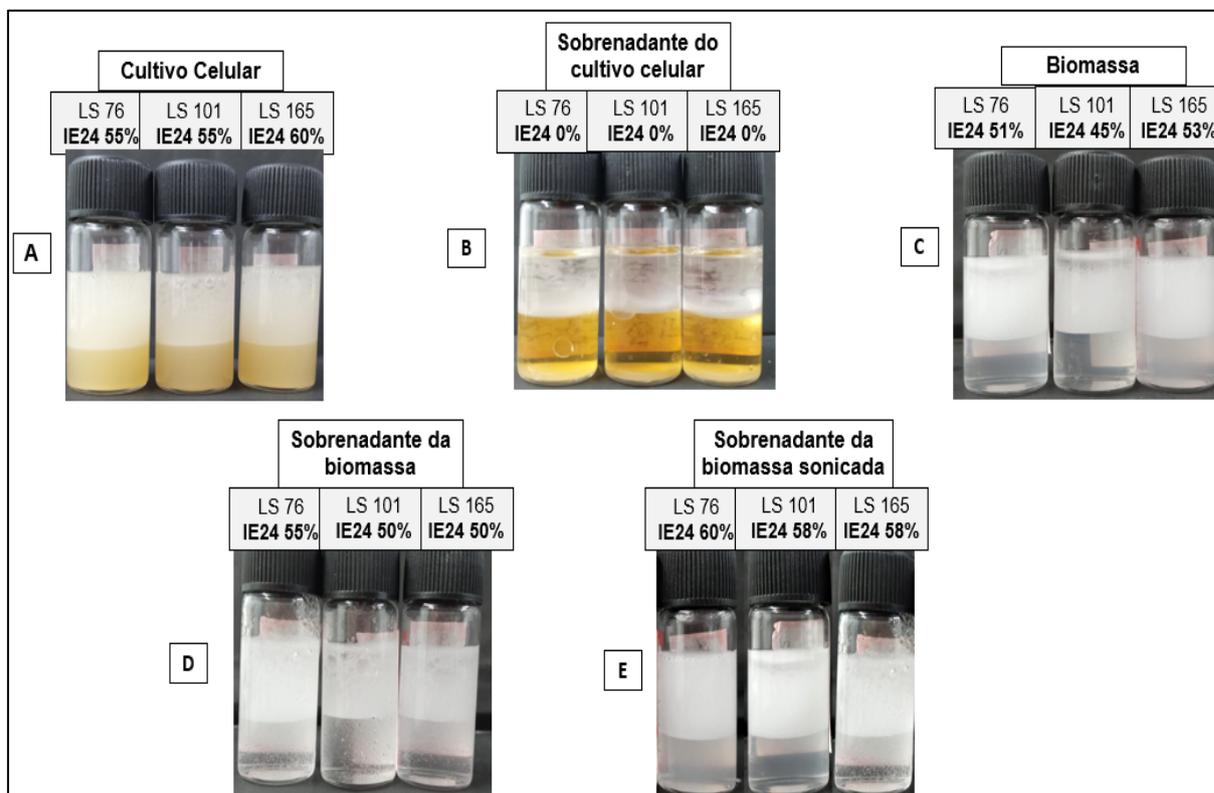
APÊNDICE B – Curva padrão de glicose para quantificação de açúcares redutores nos cultivos de *C. (Pichia) pseudolambica* em YEPD líquido a 26 ± 2 °C durante 168h.



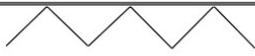
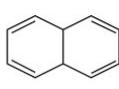
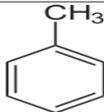
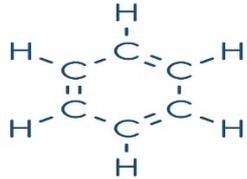
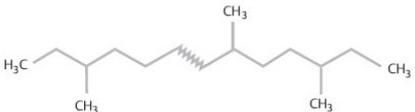
APÊNDICE C - Curva padrão de sacarose para quantificação de açúcares totais nos cultivos de *C. (Pichia) pseudolambica* em YEPD líquido a 26 ± 2 °C durante 168h.



APÊNDICE D – IE₂₄% em diferentes condições das linhagens de *C. (Pichia) pseudolambica* em YEPD líquido a 26±2 °C durante 168h. **A.** IE₂₄% do Cultivo celular; **B.** IE₂₄% do sobrenadante do cultivo celular; **C.** IE₂₄% da biomassa; **D.** IE₂₄% do sobrenadante da biomassa; **E.** IE₂₄% do sobrenadante da biomassa pós sonicção.



APÊNDICE E – Quantidade de carbonos na composição de diferentes hidrocarbonetos disponíveis na indústria.

Hidrocarbonetos	Quantidade de carbonos	Fórmula química
Querosene	$C_{11} - C_{12}$	 <p>Hidrocarboneto linear (estrutura aberta)</p>  <p>Hidrocarboneto naftênico (estrutura cíclica e saturada)</p>  <p>Hidrocarboneto aromático (estrutura cíclica e insaturada)</p>
Tolueno	C_7	
Hexano	C_6	
Petróleo	$C_1 - C_{38}$	
Diesel	$C_{14} - C_{20}$	
Óleo de motor	$C_{15} - C_{50}$	
Óleo Lubrificante	$C_{26} - C_{50}$	Não pertinente (mistura)

Fonte: Adaptado de Petrobras (2021).