

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIAS
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

KELLI CRISTINA PASA

**RECUPERAÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Kluyveromyces
marxianus***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Francisco Beltrão

2019

KELLI CRISTINA PASA

RECUPERAÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Kluyveromyces marxianus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dra.
Claudia Eugênia Castro Bravo
Coorientadora: Prof.^a Dra.
Elisete Guimarães

FRANCISCO BELTRÃO
2019

TERMO DE APROVAÇÃO
Trabalho de Conclusão de Curso – TCC2
RECUPERAÇÃO DE BISSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Kluyveromyces*
marxianus
por
Kelli Cristina Pasa

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado às 09:30 horas, do dia 27 de Novembro de 2019, como requisito para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão. A candidata foi arguida pela Banca Avaliadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Avaliadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca Avaliadora:

Wagner de Aguiar

Coordenador do Curso de
Engenharia Ambiental

**Claudia Eugênia Castro
Bravo**

Professora Orientadora

Ellen Porto Pinto

Membro da Banca

Elisete Guimarães

Professora
Coordenadora

Denise Andréia Szymczak

Professor do TCC2

“A folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do
Curso.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por permitir a conclusão do presente trabalho e pela oportunidade de estudar em uma universidade pública.

Agradeço a minha mãe por ser meu alicerce, pelos conselhos, pelas palavras de conforto e pela força que me deu por toda esta caminhada, que foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus irmãos Joel, Gizele, Josiane e Ana, pelas palavras de conforto, pela paciência, pelo carinho, pelos momentos de descontração e pela parceria durante todo este caminho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná e aos professores do curso de engenharia ambiental, que me proporcionaram um curso de excelente qualidade.

À minha orientadora Claudia, pela paciência, pelos materiais indicados pra estudo, pela ajuda em laboratório, pelo tempo dedicado, pelas risadas, e pelo grande aprendizado nesta etapa.

À minha coorientadora Elisete, pela paciência, pelo tempo dedicado, pela literatura indicada, pela ajuda em laboratório, pelas risadas, e pelo grande aprendizado nesta etapa.

Ao Professor Claudio que disponibilizou um aparelho de grande importância para minhas análises. E aos técnicos de laboratório que disponibilizaram tempo, reagentes e aparelhos para que fosse possível a realização das análises.

Aos meus amigos que caminharam junto comigo desde o início da graduação, em especial à Gabrielli e Suelen, que me acompanharam desde o início, e aos que conquistei ao longo desse percurso, obrigada pelos conselhos, conversas, descontração e momentos de parceria.

RESUMO

PASA, KELLI CRISTINA. **Recuperação de Biossurfactante Produzido por *Kluyveromyces marxianus***. 2019. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2019.

Os surfactantes de origem biológica, também chamados de biossurfactantes são produzidos a partir de microrganismos, e apresentam vantagens em relação aos de origem química, como biodegradabilidade em solo e água. Apresentam também, baixa toxicidade, sendo possível utilizá-los na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi recuperar o biossurfactante produzido por *Kluyveromyces marxianus*, bem como determinar a biomassa e o índice emulsificante. Para a recuperação do biossurfactante foram testados os métodos de precipitação com sulfato de amônio e precipitação com etanol. A produção de biomassa foi determinada por gravimetria em balança analítica e o índice emulsificante foi verificado utilizando dois hidrocarbonetos, a gasolina e a querosene. Com base nos resultados experimentais, a técnica de extração por precipitação com sulfato de amônio não produziu nenhum precipitado. Já a recuperação utilizando o etanol, na proporção de 5:1, mostrou-se eficiente para a recuperação do biossurfactante produzido, porém com baixo rendimento. O índice emulsificante foi determinado pela altura da emulsão formada, sendo o resultado expresso em porcentagem, onde a querosene (44,64%) apresentou maior índice emulsificante quando comparada à gasolina (1,92%). A média da produção de biomassa foi de 5,4 g L⁻¹. Os resultados apresentados mostraram que é possível recuperar o biossurfactante produzido pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, mas é indicado que se utilize maiores concentrações de sulfato de amônio, bem como maiores volumes de etanol, para extração do biossurfactante.

Palavras-chave: Microrganismo, Hidrocarboneto, Indústria, Biodegradabilidade, Renováveis.

ABSTRACT

PASA, KELLI CRISTINA. Biosurfactant Recovery Produced by *Kluyveromyces marxianus*. 2019. 34 f. Course Conclusion Paper (Undergraduate) - Degree in Environmental Engineering. Federal Technological University of Paraná. Francisco Beltrão, 2019.

Surfactants of biological origin, also called biosurfactants are produced from microorganisms, and have advantages over those of chemical origin, such as biodegradability in soil and water. They also have low toxicity and can be used in the food, cosmetics and pharmaceutical industry. The objective of this work was to recover the biosurfactant produced by *Kluyveromyces marxianus*, as well as to determine the biomass and emulsifying index. For biosurfactant recovery, the methods of ammonium sulfate precipitation and ethanol precipitation were tested. Biomass production was determined by analytical scale gravimetry and the emulsifying index was verified using two hydrocarbons, gasoline and kerosene. Based on the experimental results, the ammonium sulfate precipitation extraction technique produced no precipitate. The recovery using ethanol, in the ratio of 5: 1, was efficient for the recovery of biosurfactant produced, but with low yield. The emulsifying index was determined by the height of the emulsion formed, being the result expressed as a percentage, where kerosene (44.64%) presented higher emulsifying index when compared to gasoline (1.92%). The average biomass production was 5.4 g L⁻¹. The presented results showed that it is possible to recover the biosurfactant produced by the yeast *Kluyveromyces marxianus*, but it is indicated that higher concentrations of ammonium sulfate as well as larger volumes of ethanol are used for biosurfactant extraction.

Keywords: Microorganism, Hydrocarbon, Industry, Biodegradability, Renewables.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01- Amostra centrifugada - formação do pellet celular.....	21
Figura 02- <i>Pellet</i> após 24 horas na estufa de secagem.....	21
Figura 03- Teste de índice emulsificante com gasolina.....	22
Figura 04- Teste de índice emulsificante com querosene.....	23
Figura 05- Amostras de $1,5 \text{ molL}^{-1}$ e $3,0 \text{ molL}^{-1}$, que não precipitaram o biossurfactante.....	25
Figura 06- Etanol e meio fermentado da proporção de 1:1.....	25
Figura 07 - Etanol e meio fermentado da proporção de 5:1.....	26
Figura 08- Biossurfactante depois de liofilizado.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 BIOSURFACTANTES.....	12
3.2 VANTAGENS DOS BIOSURFACTANTES EM RELAÇÃO AOS SURFACTANTES QUÍMICOS.....	13
3.3 LEVEDURA DA ESPÉCIE <i>Kluyveromyces marxianus</i>	14
3.4 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS.....	15
3.5 HIDROCARBONETOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODO.....	18
4.1 MICRORGANISMO.....	18
4.2 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DA LEVEDURA.....	18
4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	19
4.3.1 Determinação da biomassa.....	19
4.3.2 Índice emulsificante.....	19
4.3.3 Recuperação do biossurfactante.....	20
4.3.3.1 Técnica de extração por precipitação com sulfato de amônio e pré- purificação por diálise.....	20
4.3.3.2 Técnica de Precipitação de Biossurfactante com Solvente Etanol (20° e -4°c) 98,8%.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA.....	21
5.2 ÍNDICE EMULSIFICANTE.....	22
5.3 RECUPERAÇÃO DO BIOSURFACTANTE.....	24
5.3.1 Técnica de extração por precipitação com sulfato de amônio e pré- purificação por diálise.....	24
5.3.2 Técnica de precipitação de biossurfactante com solvente etanol (20° e -4°) 98,8%.....	25
6. CONCLUSÃO.....	28
7. REFERÊNCIA.....	29

1. INTRODUÇÃO

Várias são as áreas do conhecimento que integram a biotecnologia, como a bioquímica, microbiologia, genética, engenharia genética, engenharia química, zootecnia, entre outras (GUSMÃO; SILVA; MEDEIROS, 2017), e por isso é considerada uma ciência multidisciplinar. Por ser uma ciência que abrange diversas áreas, possui também inúmeras aplicações na área industrial, farmacêutica, saúde, pecuária, agrícola, mineração e meio ambiente.

A obtenção de produtos biotecnológicos pode ser oriunda de processos fermentativos, a partir dos mesmos podem ser obtidos cervejas, pães, iogurtes, vinhos, queijos, leite fermentado, provenientes da indústria alimentícia, podendo ser obtidos também produtos relacionados a área da saúde, como o caso de antibióticos, vacinas para prevenção e controle de doenças.

Na produção de determinados produtos de origem biotecnológica, são utilizados os biossurfactantes, que são oriundos de microrganismos, sendo que grande parte destes biossurfactantes são produzidos por bactérias. As bactérias que têm sido mais estudadas são: *Corynebacterium*, *Corynebacterium lepus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter paraffineus*, *Kluyveromyces marxianus* (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

A utilização de biossurfactantes nas indústrias pode ser custoso, devido a utilização de substratos com custo elevado, por conta disso é muito importante a utilização de fontes alternativas de nutrientes, como o caso de produtos oriundos da agroindústria, pois se tornam mais baratos e apresentam alto rendimento, tendo como resultado a produção de biossurfactantes com baixo custo, e assim reduzido a poluição que seus rejeitos causam (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Alguns dos substratos utilizados para produção de surfactantes biológicos são: óleo de soja queimado, que é resultante de processos de fritura, este é utilizado como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes glicolipídicos por *Candida ishwardae*; a manipueira, que é a água oriunda da prensagem da mandioca, que possui alta toxicidade ao meio ambiente e uma grande fonte de carbono para a produção de biossurfactante a partir de *C. lipolytica*; Resíduos de milhocina (proveniente do processamento do milho) e da refinaria de óleo soja, substrato de

baixo custo, utilizado para produzir biossurfactante a partir de *Candida sphaerica*; Melaço de soja (que é um subproduto da produção do óleo de soja), que é uma grande fonte carbono utilizado para produção de biossurfactante, pela levedura *C. bombicola* (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Em um processo biotecnológico, é necessário seguir etapas para que o experimento seja realizado com sucesso, dentre eles os processos de *upstream* e *downstream*. *Upstream* envolve a caracterização e o preparo do substrato a ser utilizado no processo e *downstream* corresponde aos processos de recuperação dos bioprodutos formados, sendo que a etapa de recuperação do produto é a mais onerosa, por conta disso é importante testar diferentes metodologias (MANO, 2008).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi recuperar biossurfactante produzido por *Kluyveromyces marxianus* utilizando diferentes métodos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Recuperar o biossurfactante produzido por *Kluyveromyces marxianus*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar bioensaios para produção do biossurfactante e quantificar a biomassa;
- ✓ Verificar o índice emulsificante frente a hidrocarbonetos;
- ✓ Testar dois métodos para recuperação do biossurfactante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOSSURFACTANTES

Grande parte dos surfactantes produzidos comercialmente, são obtidos a partir de derivados de petróleo. Com a crescente preocupação com o meio ambiente, juntamente com leis de proteção ao mesmo, teve-se a necessidade da procura por surfactantes naturais. Estes surfactantes naturais são moléculas anfipáticas, que possuem uma parte hidrofóbica (apolar) e outra hidrofílica (polar), a parte apolar geralmente é uma cadeia hidrocarbonada, e a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica) e não-iônica (DECESARO *et al.*, 2013).

Biossurfactantes ou surfactantes biológicos são obtidos a partir de microrganismos, e apresentam as mesmas propriedades que os surfactantes sintéticos, ou seja, desempenham alta capacidade emulsificante e diminuem a tensão superficial. Os microrganismos produtores destes podem ser bactérias, fungos e leveduras (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

Grande parte dos surfactantes biológicos apresentados na literatura, são de origem bacteriana. As bactérias mais mencionadas são do gênero *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Arthrobacter sp.*, e *Pseudomonas sp.*, porem grande parte dos biossurfactantes produzidos por bactérias não são utilizados na indústria de alimentos, devido sua possível patogenicidade. Já as leveduras apresentam grandes vantagens quanto utilizadas para a produção de biossurfactantes, como o caso das status GRAS (*generally regarded as safe*) que são as leveduras que não apresentam riscos de patogenicidade ou toxicidade, como o caso das espécies *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Os surfactantes biológicos podem ser classificados de acordo com a origem microbiana e sua composição química, as principais classes incluem: glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados, já os surfactantes sintéticos, são classificados de acordo com seus grupos polares (PIRÔLLO, 2006).

As fontes de nitrogênio e carbono utilizadas podem influenciar nas características e na composição do biossurfactante produzido, bem como a

presença de ferro, fósforo, magnésio e manganês. Outros fatores como o caso da temperatura, agitação, pH e forma de condução do processo, são importantes para a qualidade e quantidade de biossurfactantes produzidos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

A produção dos surfactantes biológicos pode ser de forma espontânea ou induzida pela existência de compostos lipofílicos, que são óleos vegetais, gorduras ou lipídios, e também por variação de temperatura, pH, velocidade de agitação e aeração, ou também por manter sob condições de estresse o crescimento celular, como o caso de concentrações baixas de nitrogênio. A produção pode ser feita também por *resting cells* neste método não é feita a multiplicação celular, porém a fonte de carbono continua sendo utilizada pelas células para a produção do biossurfactante. Alguns exemplos de produção de surfactantes biológicos por leveduras é utilização de *Candida apícola* e *Torulopsis bombicola* para produzir soforolipídeos, e utilização de *Candida antarctica* para produção de manosileritritol (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

3.2 VANTAGENS DOS BIOSSURFACTANTES EM RELAÇÃO AOS SURFACTANTES QUÍMICOS

Os biossurfactantes apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes químicos, como baixa toxicidade, estabilidade térmica, solubilidade em água alcalina, biodegradabilidade, estabilidade de pH e reprodução a partir de substratos renováveis, o que torna o processo mais barato (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013). Ao contrário dos surfactantes químicos, os surfactantes biológicos são de fácil degradação, ou seja, são biodegradáveis em solo e água, e por conta disso são utilizados em tratamento de resíduos e aplicados em processos de biorremediação (DECESARO *et al.*, 2013).

Os biossurfactantes apresentam-se mais eficientes do que os surfactantes convencionais, visto que produzem tensão superficial menor em concentrações menores de biossurfactantes. A tensão superficial e interfacial (óleo/água), varia entre 1 e 30 mN/m e a CMC (concentração micelar crítica) dos biossurfactantes, que corresponde a medida de eficiência dos mesmos, varia entre 1-2000mg/L (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

Apresentam também baixa toxicidade, por conta disso podem ser utilizados nas indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticos. Estes vem ganhando mais atenção pelo fato da crescente população alérgica a produtos artificiais (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Os surfactantes de origem microbiana são tolerantes a alguns fatores, como o caso do pH, temperatura e força iônica, ou seja, apresentam estabilidade térmica e de pH elevadas, sendo assim podem ser utilizados em condições agressivas. Um exemplo disso é o lipopeptídeo de *B. licheniformis* que em temperaturas em torno de 75 °C por até 140 h e pH entre 5 e 12 se mantém estável. São tolerantes também a concentrações de NaCl elevadas, enquanto os surfactantes químicos uma concentração de 2-3% já é suficiente para inativa-los, enquanto que os biossurfactantes suportam concentrações de até 10% de concentração salina (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

Outra vantagem que os biossurfactantes apresentam é o fato de possuírem diversidade química grande, e se tem a possibilidade de serem sintetizados por substratos renováveis, sendo assim possível realizar as aplicações específicas para cada caso particular, visto que suas propriedades físicas e características estruturais são diferentes umas das outras. Outro fato de grande importância econômica, é que não são derivados de petróleo, como o caso dos convencionais, pois na medida que o valor do petróleo aumenta, os surfactantes convencionais tendem a aumentar também. É possível também a modificação das propriedades físicas e da estrutura química dos biossurfactantes, por meio de manipulação biológica, química e genética, permitindo assim, para cada necessidade específica o desenvolvimento de produtos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

3.3 - LEVEDURA DA ESPÉCIE *Kluyveromyces marxianus*

A *Kluyveromyces marxianus* apresenta diversas características ideais para utilização na indústria como; capacidade de ser cultivadas em elevadas temperaturas, entre 40 a 45° C, e em ampla faixa de pH (2,6 a 6), apresenta altas taxas de crescimento, além de utilizar grande variedade de açúcares como fonte de carbono (JÚNIOR, 2006).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é classificada como GRAS (*Generally Regarded as Safe*), sendo bastante atrativa como fonte alternativa de nutrientes na

dieta, por conta da produção de uma grande variedade de compostos orgânicos (VERAS, 2009).

Segundo Veras (2009), a *K. marxianus*, ganha destaque por possuir grande capacidade de crescer em uma ampla variedade de substratos de baixo custo, como o caso de substratos oriundos das indústrias de alimentos, que geralmente são ricos em nutrientes e se apresentam em grande disponibilidade.

De acordo com Burlani (2014), o gênero *Kluyveromyces* spp tem ganhado atenção, por apresentar leveduras como *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces Lactis*, que apresentam capacidade de hidrolisar lactose, produzindo etanol, oligossacarídeos, aromas e biomassa. A capacidade desta levedura em utilizar a lactose proveniente do soro de queijo, como fonte de carbono, é muito importante no ponto de vista ambiental, pois o mesmo é considerado um poluente ao meio ambiente (JÚNIOR, 2006).

3.4 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Os biossurfactantes produzidos pelos microrganismos possuem propriedades funcionais de emulsificação, umedecimento, separação, inibição de corrosão, solubilização, redução da tensão superficial e da viscosidade de líquidos. Por conta destas propriedades, são utilizados em diversas áreas, como o caso da agricultura, indústria de bebidas, alimentícia, fármacos, têxtil, papel, cosméticos e ambientais, como o caso da biorremediação (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Segundo Barros et al. (2007) os biossurfactantes possuem uma gama ampla de aplicações, pois apresentam algumas propriedades de grande interesse industrial como: emulsificação, detergência, capacidade emulsificante, lubrificante, capacidade molhante e dispersão de fases.

A emulsificação apresenta grande importância na formação de textura e consistência, e também na solubilização de aromas, e por conta disso os biossurfactantes são bastante empregados como emulsificantes no processamento de matérias primas, e por isso podem ser utilizados na panificação e em produtos derivados de carnes. Também são utilizados na produção de molhos prontos para saladas, como o caso do bioemulsificante produzido por *Candida utilis* (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

Com o modelo de agricultura adotado, a crescente população e a necessidade de se produzir mais alimentos, são adotadas medidas para o controle de pragas, que consiste na aplicação de pesticidas e herbicidas, para controle das mesmas e para obter maior produção. Os biossurfactantes são bastante utilizados na formulação de pesticidas e herbicidas, geralmente os compostos tensoativos das formulações destes produtos são hidrofóbicos, por isso tem-se a necessidade de emulsificantes para realizar a dispersão em soluções aquosas, e surfactantes de *Bacillus* foram aplicados para realizar a emulsificação de pesticidas organofosforados imiscíveis (DECESARO et al., 2013).

São bastante utilizados na indústria petrolífera, as frações de óleo são mais viscosas e pesadas e por conta disso formam depósitos no fundo dos tanques, e a aspiração por bombas é difícil e para fazer esta lavagem é necessário a utilização de solventes e a limpeza é feita manualmente. A realização da limpeza é basicamente formação de emulsões concentradas de óleo em água, por meio de agentes de superfície, logo após esta limpeza é feito o bombeamento da emulsão que formou, seguido da quebra da mesma e por fim o recolhimento do óleo (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

A dependência pelo petróleo e seus derivados, é muito grande em razão de seus usos na produção de combustíveis, plásticos, tecidos, calçados, tintas, inseticidas, além de possuir também alto potencial energético. O petróleo é constituído por uma mistura de compostos sendo a maior porção desta mistura os hidrocarbonetos (MARTINS et al., 2015). Considerando que a maior demanda para os biossurfactantes vem da indústria petrolífera, onde eles são utilizados na recuperação de petróleo e são incorporados nas formulações de diversos óleos, a aplicação mais atrativa num futuro próximo é a biorremediação ambiental (LIMA, 2013).

Tanto nas etapas de extração, quanto de refino, armazenamento ou transporte do petróleo, pode ocorrer o derramamento do mesmo, e causar danos ao meio ambiente. Uma das formas de tratamento é a utilização da biorremediação, os biossurfactantes degradam vários óleos, por meio dos microrganismos, pois aumentam a interação superficial, promovendo assim a biorremediação dos solos e da água (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

Os surfactantes biológicos são capazes de emulsificar misturas de hidrocarbonetos em água, isso pode ser notado através do aumento significativo da

degradação de hidrocarbonetos existentes no meio. Por conta disso podem ser utilizadas em técnicas de biorremediação de mananciais e solos contaminados por hidrocarbonetos. O processo em questão é baseado na habilidade que os biossurfactantes têm em diminuir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, por meio do acúmulo de compostos insolúveis em superfície, assim influenciando nas interações hidrofílicas-hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, conseqüentemente a área superficial aumenta, o que acaba promovendo uma maior biodisponibilidade e proporcionando assim o aumento da biodegradabilidade (CASTIGLIONI; BERTOLIN; COSTA, 2009).

3.5 HIDROCARBONETOS

A dependência do mundo pelo petróleo e seus derivados está cada vez maior, tanto quando se trata de transporte, quanto na manutenção das atividades industriais. Durante as etapas de extração, refino e transporte do petróleo e seu derivados, podem ocorrer acidentes como derramamento do mesmo, causando a contaminação de corpos hídricos e do solo. O petróleo é constituído por uma mistura complexa de compostos, sendo que a maior fração é constituída por hidrocarbonetos (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Hidrocarbonetos são compostos orgânicos que possuem somente carbono e hidrogênio em sua cadeia, e são divididos em dois grupos: alifáticos e aromáticos. Os hidrocarbonetos aromáticos são os que apresentam pelo menos um anel aromático, já os alifáticos apresentam características oleosas. São encontrados vários grupos dentro do grupo dos alifáticos, que são caracterizados pelo tipo de ligação e pela cadeia (FONSECA, 2013).

A gasolina e a querosene são compostos orgânicos hidrofóbicos (apolares), são produtos derivados de petróleo. A gasolina é formada por uma mistura de hidrocarbonetos (átomos de carbono estruturais em cadeias abertas e fechadas, não aromáticas) que possuem de 5 a 8 carbonos em sua cadeia, a mesma é bastante utilizada como combustível para motores. A querosene é um composto formado por uma mistura de hidrocarbonetos naftalênicos e aromáticos (contêm anéis benzênicos), contendo de 11 a 12 carbonos em sua cadeia, é bastante utilizada como combustível para turbinas de jatos, além de possuir outras aplicações (BRANDÃO, 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

A levedura *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172) utilizada nesta pesquisa foi cedida gentilmente pelo professor Dr. Raúl Jorge Hernán Castro Gómez da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Esta foi mantida em tubos de ensaio contendo meio de cultura para levedura (MPL - Extrato de malte – 0,3 %; Extrato de levedura – 0,3 %; Peptona bacteriológica – 0,5 %; Glicose – 1 %; Ágar – 2,0 %), sob refrigeração a 4°C, passando por repiques periódicos para manter os microrganismos ativos.

4.2 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DA LEVEDURA

O preparo do inóculo ocorreu por meio do crescimento da levedura em meio de cultura MPL (Extrato de Malte – 0,3 %; Extrato de Levedura – 0,3 %; Peptona Bacteriológica – 0,5 %; Glicose – 1 %), incubada em BOD por 48 horas a 28°C. Após esse período, com auxílio de alça de platina o inóculo foi transferido para um erlenmeyer contendo 150 mL⁻¹ de caldo MPL previamente esterilizado, e incubado em mesa agitadora (shaker) a 180 rpm, durante um período de 24 horas a 28 °C.

Após este processo, foi realizada a metodologia de *Mc Farland*, para padronização do inóculo, onde em 1mL⁻¹ tem-se aproximadamente 1x10⁸ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia), e foi transferido 1mL⁻¹ de inóculo padronizado para o meio base.

Para o preparo do meio base, seguiu-se a metodologia proposta por Rufino (2006), com modificações de acordo com Strapazzon (2015). Alíquotas de 1% (v/v) de inóculo padronizado foram transferidas para o meio base composto por nitrato de amônio 0,1%; fosfato monopotássico 0,02%; sulfato de magnésio heptahidratado 0,02%, óleo de milho 20%, glicose 10% e extrato de levedura 0,2% (STRAPAZZON, 2015). Após esse procedimento os erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora (shaker) a 200 rpm e com controle de temperatura a 28°C por 144 horas.

4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

4.3.1 Determinação da biomassa

A biomassa foi determinada por gravimetria. O meio base fermentado foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, a massa celular (*pellet*) foi lavada com água destilada e colocada em placas de Petri com papel filtro previamente seco em estufa a 60°C por 24 horas. As placas de Petri contendo a massa celular (*pellet*) foram levadas à estufa a 60°C durante 24 horas. A biomassa foi determinada por gravimetria em balança analítica, pela diferença de peso inicial e peso final da placa de Petri (RUFINO, 2006).

4.3.2 Índice emulsificante

O índice emulsificante foi determinado seguindo a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987). Foram testados dois hidrocarbonetos: gasolina e querosene. Transferiu-se 5 mL do meio fermentado centrifugado para tubos de ensaio e acrescentou-se 5 mL gasolina e querosene (triplicata), separadamente. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e colocada de repouso em uma BOD a 28°C. Após 24 horas de incubação, com auxílio de uma régua, mediu-se a altura total da solução e a altura da emulsão, em intervalos de 24 horas, 48 horas, 96 horas e 120 horas. A porcentagem do índice emulsificante foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Índice emulsificante (\%)} = \frac{He}{Ht} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

He = altura de emulsão (cm).

Ht = altura total da solução (cm).

4.3.3 Testes de recuperação do biossurfactante

4.3.3.1 Técnica de extração por precipitação com sulfato de amônio e pré-purificação por diálise

De acordo com a metodologia proposta por Silva, Fontes e Coelho (2016), a extração por precipitação utilizando Sulfato de Amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), foi realizada com concentrações de $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ em temperatura de 4°C durante 48 horas, em 15 mL de meio fermentado livre de células. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm em centrífuga por 20 minutos. O precipitado formado no processo é dialisado em membrana submersa em água destilada por 24 horas e durante este período é realizada sete trocas de água. Posterior a estas 24 horas de diálise, o material é congelado a -5°C em tubos de falcon de 50 mL, por um período de 24 horas e liofilizado e assim mede-se o rendimento do biossurfactante obtido.

4.3.3.2 Técnica de precipitação de biossurfactante com solvente etanol (20° e -4°C) 98,8%

Conforme a metodologia adaptada por Ciapina (2008), foi utilizado para a precipitação do biossurfactante, misturas de solvente (etanol 98%) e meio fermentado livre de células nas proporções de 1:1 e 5:1, ou seja, foi utilizado 1 mL de etanol para 1 mL de meio fermentado livre de células, e 5 mL de Etanol para 1 mL meio fermentativo livre de células. Depois de um período de 24 horas de repouso em temperatura de 20°C as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. O precipitado formado neste processo, foi exposto a temperatura ambiente para que o etanol presente na amostra pudesse evaporar, posteriormente a este processo, o mesmo foi ressuspenso em 1 mL de água destilada, congelado a -5°C e liofilizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

Figura 01- Amostra centrifugada - formação do pellet celular



Fonte: Do autor (2019).

Figura 02- *Pellet* após 24 horas na estufa de secagem.



Fonte: Do autor (2019).

O valor da biomassa obtido foi $5,4 \text{ g L}^{-1}$. A biomassa de levedura é um subproduto importante das indústrias produtoras de álcool etílico e de cerveja, a quantidade de biomassa de gerada é grande, isso porque o Brasil é um dos maiores produtores desses produtos (LEIDIMARA, 2004).

Na indústria de alimentos, a produção de biomassa microbiana vem se destacando, pois, esta matéria seca resultante do crescimento do microrganismo, pode ser utilizada como fonte proteica destinada a formulação de alimentos para compensar a falta de aminoácidos essenciais e proteínas ou à suplementação (VERAS, 2006).

Segundo Dikit *et al.* (2010) se tem uma grande tendência em relação ao aproveitamento da biomassa de levedura, por conta de propriedades específicas que

alguns constituintes da parede celular das leveduras apresentam, como manoproteínas, que possuem propriedades bioemulsificantes.

Conforme a literatura consultada, Strapazzon (2015) determinou a biomassa produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, em condições semelhantes ao presente trabalho, onde utilizou 2% de óleo de soja, 20% de óleo de milho, 2% de glicerol, 1% de glicose, 0,1% de Sulfato de amônio, 2% de extrato de levedura, e obteve biomassa de 6,4 g L⁻¹.

Segundo Bravo-Martins *et al.* (2009) a produção de produtos biotecnológicos bem como a produção de biomassa, podem ser influenciadas por condições de cultivo como, tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pH e temperatura de cultivo.

5.2 - ÍNDICE EMULSIFICANTE (IE):

Nas Figuras 03 e 04, é possível visualizar as emulsificações formadas pela gasolina e querosene, respectivamente.

Figura 03- Teste de índice emulsificante com gasolina



Fonte: Do autor (2019).

Figura 04- Teste de índice emulsificante com querosene



Fonte: Do autor (2019).

Observa-se que a querosene, obteve maior índice emulsificante. Já a gasolina obteve índice emulsificante menor, quando comparada com a querosene. Para cada hidrocarboneto analisado calculou-se a média do índice emulsificante, como mostra a tabela 1.

Tabela 01- Índice emulsificante de cada hidrocarboneto

IE (horas)	IE Gasolina	IE Querosene
IE ₂₄	1,92 %	44,64 %
IE ₄₈	1,92 %	44,64 %
IE ₉₆	1,92 %	44,64 %
IE ₁₂₀	1,92 %	44,64 %

Fonte: Do autor (2019).

Observa-se na Tabela 01, que a querosene obteve maior índice emulsificante, 44,64 %, enquanto que a gasolina apresentou o menor índice, 1,92 %. Isso pode ser explicado pelo fato de que quanto maior for a cadeia apolar do hidrocarboneto, maior será a capacidade de redução da tensão superficial de emulsões (FRANZOL, REZENDE, 2015). Como a querosene apresenta cadeia apolar maior, variando de 11 a 12 carbonos, obteve-se maior índice emulsificante, e a gasolina possui cadeia apolar menor de 5 a 8 carbonos, portanto, o seu índice emulsificante é menor.

Em literatura consultada, utilizando *K. marxianus* para produção de biossurfactante, as atividades emulsificantes foram maiores quando comparadas com as obtidas neste trabalho. Strapazzon (2015) obteve índice emulsificante de 60%. Fontes, Amaral e Coelho (2008) encontraram índices emulsificantes em torno de 76%.

Muitos microrganismos têm capacidade de assimilar ou degradar hidrocarbonetos, dentre estes microrganismos, alguns durante o processo de degradação do substrato são capazes de emulsificar estes hidrocarbonetos (BARBOSA, 2017).

Segundo Barros *et al.* (2008), o índice emulsificante pode ser influenciado, pelo tamanho da cadeia ou pela massa molecular, quando se utiliza-se compostos do grupo de hidrocarbonetos.

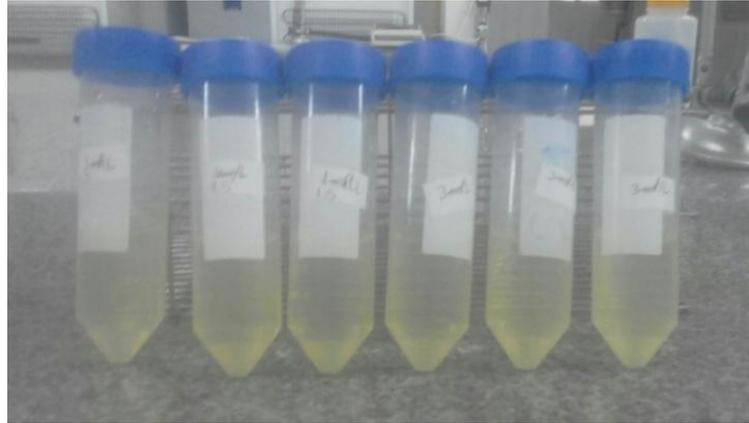
5.3- RECUPERAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO

5.3.1- Técnica de extração por precipitação com sulfato de amônio e pré-purificação por diálise.

As concentrações $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de amônio não foram capazes de precipitar o biossurfactante (Figura 05), indicando que o uso de sulfato de amônio deverá ser com concentrações mais elevadas.

Pesquisas indicam que concentrações de sulfato de amônio maiores que $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($4,0 \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \text{ mol L}^{-1}$, $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ e $7,48 \text{ mol L}^{-1}$) são utilizadas para precipitar o biossurfactante produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica* (SILVA; FONTES; COELHO, 2016).

Figura 05- Amostras de $1,5 \text{ molL}^{-1}$ e $3,0 \text{ molL}^{-1}$, que não precipitaram o biossurfactante



Fonte: Do autor (2019).

5.3.2- Técnica de precipitação de biossurfactante com solvente etanol (20° e -4°C) 98,8%

Durante a técnica de precipitação observou-se que, na proporção de 1:1 não ocorreu a formação de precipitado (Figura 06). Nas amostras utilizando as proporções de 5:1, evidenciou-se a presença do precipitado (Figura 07).

Figura 06- Etanol e meio fermentado da proporção de 1:1



Fonte: Do autor (2019).

Figura 07 – Etanol e meio fermentado da proporção de 5:1



Fonte: Do autor (2019).

Contudo é importante ressaltar que a quantidade de etanol necessária para se realizar a extração do biossurfactante é grande, pois para se extrair uma pequena quantidade de biossurfactante, são necessárias grandes quantidades de etanol.

Para a extração do biossurfactante produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica*, concentrações de 5:1, 7:1 e 9:1 (etanol/meio livre de células) foram utilizadas, sendo a proporção de 5:1 considerada como sendo a proporção de maior extração (SILVA; FONTES; COELHO, 2016).

A Figura 8 mostra as amostras liofilizadas. O pó de biossurfactante gerado após o processo de liofilização, apesar de apresentar baixo rendimento, pois o produto é muito leve, possui boa capacidade emulsificante, o que corroboram com nossos estudos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Figura 08- Biossurfactante Depois de Liofilizado



Fonte: Do autor (2019).

Existem vários processos de extração de biossurfactantes encontrados na literatura, e o método que fornecerá maior rendimento e qualidade, depende da característica química de cada biossurfactante (SILVA; FONTES; COELHO, 2016).

Segundo Mano (2008), os processos de recuperação de biossurfactantes são mais onerosos, ou seja é trabalhoso e em alguns casos bastante custoso, e por conta disso é importante testar diferentes metodologias.

A extração de biossurfactante produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica*, usando o sulfato de amônio, o ácido clorídrico e o etanol, foi indicada para substituir mistura de clorofórmio: metanol, em função da citotoxicidade, (SILVA; FONTES; COELHO, 2016).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho, mostraram que a levedura *K. marxianus* pode ser utilizada para produção de biomassa e biossurfactante. O índice emulsificante foi mais efetivo para a querosene (IE= 44,64%).

Em relação aos métodos de precipitação / extração testados, o mais indicado é a precipitação de biossurfactante com solvente etanol (20° e - 4°C) 98,8%, sendo que a proporção mínima para extração de biossurfactante deverá ser 5:1 (etanol/meio livre de células).

Estes resultados servem como base para trabalhos futuros, onde devem ser testadas soluções de sulfato de amônio em concentrações mais elevadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-WAHAIBI, Y., JOSHI, S., AL-BAHRY, S., ELSHAFIE, A., Al-Bemani, A., & Shibulal, B. (2014). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.022>.
- ANDRADE, J. D. A., AUGUSTO, F., & JARDIM, I. C. S. F. (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética química*, 35(3), 17-43.
- ANTUNES, A. A., ARAÚJO, H. W. C. D., SILVA, C. A. A. D., ALBUQUERQUE, C. D. D. C. Biosurfactant production by *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 using corn steep liquor and corn post-frying oil as nutrients. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 334-341, 2013.
- ANTUNES, A.A. Produção, caracterização e aplicação do biossurfactante isolado de *Chromobacterium violaceum* em meios alternativos e de baixo custo. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Pernambuco. 2010.
- ARAUJO, L. V. D., FREIRE, D. M. G., & NITSCHKE, M. (2013). Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Química Nova*, 36(6), 848-858.
- BARBOSA, F. W. (2017). *Produção de biossurfactantes por Bacillus subtilis* (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná).
- BARROS, F. F. C., de QUADROS, C. P., & PASTORE, G. M. (2008). Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(4), 979-985.
- BARROS, F. F. C., QUADROS, C. P. D., MARÓSTICA JÚNIOR, M. R., & PASTORE, G. M. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*.
- BARROS, F. F. C., Mano, M. C. R., Bicas, J. L., Dionísio, A. P., Quadros, C. P., Uenojo, M., ... & Pastore, G. M. (2007). Production and stability of *Bacillus subtilis* biosurfactants using cassava wastewater in a pilot scale. *Journal of Biotechnology*, 2(131), S172-S173.
- BARRETO, Luciani Tatsch Piemolini et al. Enzimas pectinolíticas de *Kluyveromyces marxianus*: seleção e aplicação em processos da indústria de alimentos. 2012.
- BEZERRA, M. S., HOLANDA, V. C. D., AMORIM, J. A., MACEDO, G. R., & SANTOS, E. S. (2012). Produção de biotenssoativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (PA) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. *Holos*, 1, 14-27.

BURLANI, E. L. (2014). *Avaliação do potencial da levedura Kluyveromyces Spp. para biotransformação da lactose do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol* (Master's thesis).

BRANDÃO, R. D. (2015). Hidroisomerização de n-parafinas de cadeia longa catalisada por metais platínicos depositados em silicoaluminofosfatos para produção de biocombustíveis.

BRAVO-MARTINS, Claudia E. C.; CASTRO-GÓMEZ, Raul J. H.; SARROUH, Boutros F.; SILVA, Silvio S. Production of cellulolytic enzymes by anaerobic fungi cultivated in different conditions. **International Journal of Food Engineering**, v.5, p.1/14-13, 2009.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M., Pacheco, M. T. B., & Sgarbieri, V. C. (1997). Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. *Food Science and Technology (Campinas)*.

CASTIGLIONI, G. L., BERTOLIN, T. E., & COSTA, J. A. V. (2009). Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

CIAPINA, E.M.P. Produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em biorreator de bancada e avaliação do efeito na biodegradação de borra oleosa da indústria do petróleo. Tese de doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. UFRJ/ EQ. 2008.

COOPER, D. G., & GOLDENBERG, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology.*, 53(2), 224-229.

COSTA, A. G., Magnani, M., & Castro-Gomez, R. J. H. (2012). Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 34(1), 77-84.

DE MEIRA GUSMÃO, A. O., DA SILVA, A. R., & MEDEIROS, M. O. (2017). A Biotecnologia e os Avanços Da Sociedade. *Biodiversidade*, 16(1).

DE ALMEIDA, D. G., da SILVA, R. S., BRASILEIRO, P. P. F., & SARUBBO, L. (2015). Utilização de planejamento experimental na produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* a partir de resíduos industriais. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1(2), 2686-2693..

DECESARO, A., RIGON, M. R., THOMÉ, A., & COLLA, L. M. (2013). Production of biosurfactants by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. *Química Nova*, 36(7), 947-954.

Dikit, P., Maneerat, S., Musikasang, H., & H-kittikun, A. (2010). Emulsifier properties of the mannoprotein extract from yeast isolated from sugar palm wine. *Science Asia*, 36, 312-318.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., & COELHO, M. A. Z. (2008). Biosurfactants production by yeasts. *Química Nova*, 31(8), 2091-2099.

FONTES, G. C. (2008). Produção de Biosurfactante por *Yarrowia lipolytica*. *Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UFRJ, Rio de Janeiro*.

PAIVA, G. H. G. D. (2015). A experimentação em química orgânica através de livros didáticos aprovados pelo PNL 2015.

FRANZOL, A., & Rezende, M. C. (2015). Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 25, 1-9.

HEIDTMANN, R. B., Duarte, S. H., Pereira, L. P. D., Braga, A. R. C., & Kalil, S. J. (2012). Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio.

LIMA, B. L. Frequência de bactérias produtoras de biosurfactantes *lipopeptídeos* em sedimentos de manguezais do Ceará. Dissertação, Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará/ FORTALEZA. 2013.

MANO, M. C. R. (2008). Estudo da recuperação, concentração e purificação de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis*.

MARTINS, S. S. D. S., SILVA, M. P., AZEVEDO, M. O., & SILVA, V. P. (2015). Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações. *Holos*, 6, 54-76.

MAKKAR, R., & Cameotra, S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(4), 428-434.

MOURA DE LUNA, J. (2010). Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas do biosurfactante de baixo custo Lunasan produzido por *Candida Sphaerica* UCP 0995.

NITSCHKE, M., & PASTORE, G. M. (2002). Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*.

PIRÔLLO, M. P. S. (2006). Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos.V- 61.

RUFINO, R. D. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2006.

SANTIAGO, P. A., Marquez, L. D., Cardoso, V. L., & Ribeiro, E. J. (2004). Synthesis of beta-galactosidase by fermentation of cheese whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Food Science and Technology*, 24(4), 567-572.

SILVA, K. A., FONTES, G. C e COELHO, M. A. Z. Avaliação de diferentes métodos de extração do biossurfactante produzido por *Yarrowia lipolytica*. ENBEQ-2016.

SOUZA JÚNIOR, C. G. D. (2006). Aplicação de células recombinantes da levedura *Kluyveromyces marxianus* em soro de queijo.

STRAPAZZON, R. (2015). *Determinação das condições ideais para produção de biossurfactante por Kluyveromyces marxianus* (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná).

VERA, E.C.S. Produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas propriedades. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.