



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

ISABELA REGINA ALVARES DA SILVA LIRA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSURFACTANTES PARA USO EM MOLHOS
PARA SALADA**

**Recife
2020**

ISABELA REGINA ALVARES DA SILVA LIRA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES PARA USO EM MOLHOS
PARA SALADA**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. **Juliana Moura de Luna**

Co-orientadora: Profa. Dra. **Leonie Asfora Sarubbo**

Profa. Dra. **Jenyffer Medeiros Campos (UFPE)**

Recife

2020

L768p Lira, Isabela Regina Alvares da Silva
Produção e aplicação de biossurfactantes para uso em molhos para
saladas / Isabela Regina Alvares da Silva Lira, 2020.
100 f. : il.

Orientador: Juliana Moura de Luna
Coorientadores: Leonie Asfora Sarubbo, Jenyffer Medeiros Campos
Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de Pernambuco.
Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos
Ambientais.
Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2020.

1. Biossurfactantes. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Bioemulsificantes.
I. Título.

CDU 574.6

Catarina Maria Drahomiro Duarte - CRB/4-463

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES PARA USO EM MOLHOS
PARA SALADA**

ISABELA REGINA ALVARES DA SILVA LIRA

Examinadores:

Profa. Dra. Juliana Moura de Luna (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Profa. Dra. Raquel Diniz Rufino
Faculdade de Integração do Sertão - FIS

Defendida em:

Coordenador (a): Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia. Aos meus pais, irmãos, meu esposo que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida, por toda a força, amor e misericórdia, principalmente pela capacidade que me permitiu ir em busca de um sonho. Também à Nossa Senhora por toda intercessão e proteção durante esta caminhada.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudos para realização desta pesquisa.

À Universidade Católica de Pernambuco, pela oportunidade de participar de um excelente programa de Pós-graduação, por ser minha segunda casa e me conceder estrutura necessária para a conclusão do trabalho, e ter possibilitado meu crescimento científico.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Juliana Moura Luna por inicialmente me aceitar no grupo de pesquisa e me dar um voto de confiança para a construção deste trabalho. Pela sua dedicação e compressão, como também pela paciência e garra em querer sempre o melhor, por acreditar no meu trabalho e na minha vontade de aprender. E por confiar acima de tudo, no meu potencial.

Às minhas co-orientadoras, Prof^ª. Dr^ª. Leonie Asfora Sarubbo e Prof^ª. Dr^ª. Jenyffer Campos Guerra, que foram fundamentais para realização desse trabalho, pela ajuda, apoio, conhecimentos compartilhados, compreensão e por todas as dúvidas tiradas ao longo deste período.

À equipe do laboratório da UNICAP, em especial ao técnico Lucas pela colaboração e auxílio no desenvolvimento das atividades.

A todos que fazem parte do Grupo de Pesquisa Biossurfactantes, por toda a colaboração e contribuição científica durante o tempo de pesquisa, carinho, compreensão e disponibilidade em me ajudar nos experimentos, pelo apoio e companheirismo de todos.

Aos colegas do Laboratório de Origem Animal – Leite e Carnes (UFPE) que me ajudaram bastante no andamento dos experimentos, bem como ao Departamento de Química Fundamental (UFPE), pelas análises de caracterização da biomolécula.

À minha amiga Emília Mendes, por sua amizade, por sempre me incentivar e me ajudar no que precisava. Por todos os ensinamentos sem medida na área de microbiologia que me ajudaram na conclusão deste trabalho.

À toda minha família, em especial meus pais, Edvaldo Alvares e Silvaneide Alvares, pelo incentivo aos meus estudos e por acreditarem na minha capacidade de ir além. Serei sempre grata a Deus por me presentear essa família! Amo vocês!

À meu esposo Erick Wayne, por sempre acreditar em mim e me apoiar, pela compreensão, companheirismo e amor nos momentos de ausência, pelo amor, incentivo e por compartilhar comigo todas as alegrias e dificuldades de todo esse tempo em que estamos juntos.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram e estiveram na torcida por mais uma conquista minha. E que tornaram esse caminho mais fácil de ser percorrido.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
CAPÍTULO I	
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1. Surfactante.....	19
3.1.1. Definições e Propriedades.....	19
3.2. Biossurfactantes.....	23
3.3. Micro-organismos Produtores de Biossurfactantes.....	25
3.4. Fatores que afetam a produção de biossurfactante.....	27
3.5. Resíduos industriais utilizados na produção do biossurfactantes.....	29
3.6. Principais Aplicações dos Biossurfactantes.....	35

3.7. Aplicação do Biossurfactante na Indústria Alimentícia.....	40
3.8. Aditivos Alimentares.....	43
3.9. Emulsificantes	44
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

CAPÍTULO II

1. Introdução.....	61
2. Materiais e métodos.....	62
2.1 Micro-organismo.....	62
2.2 Meio de Manutenção.....	62
2.3. Meio de crescimento do inóculo	62
2.4. Preparação do inóculo.....	62
2.5. Meios de Produção de biossurfactante.....	63
2.6. Produção do biossurfactante.....	63
2.7. Curva de Crescimento e produção do biossurfactante.....	63
2.8. Determinação da tensão superficial.....	63
2.9. Determinação da atividade de emulsificação.....	64
2.10. Isolamento do biossurfactante.....	64
2.11. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	65
2.12. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	65
2.13. Espectroscopia de infravermelho	65
2.14. Cromatografia gasosa (GC).....	65
2.15. Teste de fitotoxicidade.....	65
2.16. Ensaio com <i>Artemia salina</i>	66
2.17. Teste de toxicidade com cebola (<i>Allium cepa L.</i>).....	66
2.18. Aplicação de biossurfactante como aditivo alimentar	66
2.19. Determinação da viscosidade dos molhos tipos maionese.....	67

2.20. Análises microbiológicas.....	67
3. Resultados e Discussão.....	67
3.1. Seleção de meio de cultura e micro-organismo produtor de biossurfactante.....	67
3.2. Curvas de Crescimento e de produção de biossurfactante.....	68
3.3. Índice de Emulsificação.....	70
3.4. Métodos de extração e rendimento do biossurfactante.....	71
3.5. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	71
3.6. Teste de Fitotoxicidade.....	72
3.7. Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	73
3.8. Teste de toxicidade com cebola (<i>Allium cepa</i> L.).....	73
3.9. Análise Estrutural.....	74
3.10. Aplicação do biossurfactante como aditivo alimentar e formulação dos molhos tipo maionese.....	76
3.11. Análises microbiológicas.....	79
4. Conclusões.....	80
5. Referências.....	80
CAPÍTULO III	
Considerações Finais.....	98
Anexos.....	99

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Representação esquemática da molécula do surfactante, com cauda hidrofóbica e cabeça hidrofílica.....	20
Figura 2 – Esquema ilustrativo mostrando a organização molecular de um surfactante em uma micela direta (A) e uma micela inversa (reversa) (B).....	21
Figura 3 – Representação esquemática de um tensoativo e formação de micela.....	22
Figura 4 – Ação do surfactante e formação de micelas (Concentração Micelar Crítica, CMC).....	22
Figura 5 – Resíduos de óleo de fritura.....	32
Figura 6 – Resíduo de licor de maceração de milho (milhocina).....	33
Figura 7 – Resíduo subproduto do processamento da cana-de-açúcar (melaço).....	34
Figura 8 – Resíduos da indústria de laticínios: (A) resíduo de soro de queijo e (B) resíduo de soro de leite.....	35
Figura 9 – Emulsões óleo-em-água e água-óleo.....	45

CAPÍTULO II

Figura 1 – Gráfico da CMC do biossurfactante de <i>C. guilliermondii</i> UCP0996 cultivado em meio contendo 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.....	89
Figura 2 – Espectro de ¹ H RMN registrado em DCCL ₃ do biossurfactante produzido por <i>C. guilliermondii</i> com meio suplementado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.....	90
Figura 3 – Espectro de ¹³ C RMN registrado em DCCL ₃ do biossurfactante produzido por <i>C. guilliermondii</i> com meio suplementado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de	

fritura residual.....91

Figura 4: Espectro de ¹³CRMN registrado em DCCL₃ do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melação, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.....92

Figura 5: Espectro FIT-IR do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melação, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.....93

Figura 6: Cromatograma do perfil de ácidos graxos do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melação, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.....94

Figura 7: Formulações do molho tipo maionese nas diferentes concentrações com adição do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melação, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.....95

Figura 8: Formulações do molho tipo maionese, na aplicação do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melação, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual, como aditivo alimentar.....96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Produção de biossurfactantes por <i>Candida</i> relatados em literatura.....	26
Tabela 2 – Resíduos alternativos para a produção de biossurfactantes, relatados na literatura.....	30
Tabela 3 – Aplicações dos biossurfactantes para uso comercial.....	38

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Formulações das emulsões.....	84
Tabela 2 – Tensão superficial como parâmetro de seleção do micro-organismo e do meio de produção de biossurfactante.....	85
Tabela 3 – Rendimento e tensão superficial do biossurfactante de <i>C. guilliermondii</i> UCP0996 cultivado em meio contendo 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual solado por duas metodologias de extração.....	86
Tabela 4 – Fitotoxicidade do biossurfactante isolado de <i>C. guilliermondii</i> cultivado em meio formulado com 5% de melaço, 5% de óleo vegetal e 5% de maceração de milho (milhocina) em três sementes de espécies vegetais.....	87

RESUMO

O rápido desenvolvimento da biotecnologia e o aumento da consciência ambiental entre os produtores e consumidores estão colocando os produtos biológicos na preferência do mercado. Devido suas propriedades físico-químicas, os biossurfactantes tornam-se um grupo atrativo de compostos com uso potencial em uma variedade de aplicações industriais e biotecnológicas, como aditivos em alimentos, cosméticos e detergentes. Em comparação com os surfactantes químicos têm muitas vantagens, pois são, biodegradáveis e menos tóxicos. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo a selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes a partir de duas espécies de *Candidas* (*C. guilliermondii* e *C. lipolytica*) cultivadas em diferentes fontes de carbono (glicose, melão de cana e óleo residual de fritura) e nitrogênio (extrato de levedura, ureia e milhocina) e produzir biossurfactante com propriedades emulsificantes para aplicação como aditivo em sistemas alimentares. Para a seleção do micro-organismo e do meio de produção, os biossurfactantes produzidos foram testados quanto à tensão superficial, atividade de emulsificação e rendimento. O biossurfactante selecionado foi avaliado quanto à toxicidade usando o microcrustáceo *Artemia salina*, sementes de vegetais (*Brassica oleracea*, *Solanum lycopersicum* e *Cucumis anguria*) e da cebola (*Allium cepa*) como bioindicadores. Em seguida, análises por Cromatografia Gasosa (GC), Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram conduzidas para a caracterização estrutural da biomolécula. A propriedade emulsificante do biossurfactante foi testada na formulação de sete tipos diferentes de molhos (tipo maionese). De acordo com os resultados obtidos foi observado que a *Candida guilliermondii* cultivada em meio contendo 5,0% de melão, 5,0% de milhocina e 5,0% do óleo de fritura residual foi selecionado como o melhor produtor de biossurfactante, apresentando uma redução da tensão superficial da água de 71 mN/m para de 28mN/m e um rendimento de 21g/L com uma Concentração Micelar Crítica de 0,7 g/L. O biossurfactante isolado não apresentou toxicidade frente aos bioindicadores. A caracterização estrutural revelou que o biossurfactante estudado é um glicolipídeo. Todas as maioneses analisadas, contendo biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* após um mês de armazenamento refrigerado mantiveram-se estáveis, com ausência de micro-organismos patogênicos. O biossurfactante isolado a partir de *C. guilliermondii* apresentou potencial como bioemulsificante para aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chaves: Biotensoativos, Resíduos agroindustriais, Bioemulsificantes.

ABSTRACT

The rapid development of biotechnology and increasing environmental awareness among producers and consumers are using organic products in the market's preference. It considered their physical-chemical properties to be the use of biosurfactants that are part of these potential compound groups in a variety of industrial and biotechnological applications, such as food additives, cosmetics and detergents. Compared to chemical surfactants they have many advantages as they are biodegradable and less toxic. In this sense, the present study aimed to select biosurfactant-producing microorganisms from two *Candidas* species (*C. guilliermondii* and *C. lipolytica*) cultivated in different carbon sources (glucose, sugar cane honey and frying residual oil)) and nitrogen (yeast extract, urea and millocin). After selection of the microorganism and production medium, the bio-surfer was tested for surface tension, emulsion activity and toxicity using the *Artemia salina* microcrustacean, vegetable seeds and onion (*Allium cepa*) as bioindicator. Then, Gas Chromatography (GC), Infrared (IR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyzes were conducted for structural characterization of the biomolecule. According to the results obtained, it was observed that in *Candida* models cultivated in 5.0% oil, 5.0% milk and 5.0% residual frying oil were selected as the best biosurfactant producer after a reduction of water surface tension from 71 mN / m to 30mN / m and a yield of 21g / L with a Critical Micellar Concentration of 0.7 g / L. Isolated biosurfactant has no toxicity on microcrustaceans *Artemia salina*, *Allium cepa* and neither as vegetable seeds tested. Regarding the characterization revealed that the biosurfactant studied is a glycolipid. All the mayonnaise analyzed remained stable, with no pathogenic microorganisms. Biosurfactant isolated from *C. guilliermondii* has potential as a bioemulsifier for application in the food industry.

Keywords: Biotensive, Agroindustrial waste, Bioemulsifiers.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Na era da globalização muitas indústrias clássicas estão sendo inovadas e redirecionadas para novas tecnologias, onde a biotecnologia tem um desafio que permite diversas oportunidades de pesquisas sem alterar a produtividade. Por outro lado, rápido desenvolvimento da biotecnologia e o aumento da consciência ambiental entre os produtores e consumidores estão colocando os produtos biológicos na preferência do mercado (CAMPOS et al., 2016).

Surfactantes produzidos biologicamente - biossurfactantes - são uma opção atraente em vez de contrapartes químicas. Essas biomoléculas têm várias vantagens sobre os surfactantes químicos já podem ser produzidos a partir de resíduos e de subprodutos, tornando viável a produção em escala industrial. Adicionalmente, biossurfactantes são biodegradáveis, atuam sob ampla gama de condições ambientais e apresentam toxicidade comparativamente menor. Além disso, são compostos amplamente utilizados em diferentes tipos de setores industriais (GEETHA, IBRAHIM, SANKET, 2018; DAS et al., 2018).

A produção industrial em grande escala de biossurfactantes é um desafio, por causa de problemas associados aos processos de produção, substratos, processamento e purificação, que pode representar aumento no custo de produção (GEETHA, IBRAHIM, SANKET, 2018). Serão necessárias estratégias econômicas para otimização do processo, visto que, eles apresentam muitas características desejáveis, por serem produzidos por micro-organismos, a partir de matérias renováveis, podem ser utilizados em uma ampla variedade de aplicações (PERFUMO, BANAT, MARCHANT, 2017; RIBEIRO et al., 2019). Assim, a fim de reduzir o emprego de tensoativos sintéticos na indústria alimentar, o uso de biossurfactantes vem se tornando de grande interesse industrial (CAMPOS et al., 2013). A emulsificação é especialmente muito útil na indústria de alimentos na obtenção de emulsões óleo/água (CAMPOS et al., 2013).

Nesse contexto destacam-se os aditivos naturais produzidos por micro-organismos e conhecidos como bioemulsificantes, que são surfactantes com excelentes propriedades emulsificantes (CAMPOS et al., 2014; CAMPOS et al., 2019). O uso de bioemulsificantes na indústria de alimentos é conferido às propriedades emulsificantes, espumantes, umectantes e solubilizantes. Podendo ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, no controle da aglomeração de glóbulos de gordura, na estabilização de sistemas

aerados e para melhorar a consistência de produtos gordurosos (PACWA-PLOCINICZAC et al., 2011).

Considerando a importância na proteção do meio ambiente e a legislação de controle ambiental, junto à motivação no desenvolvimento de compostos naturais como uma alternativa aos produtos existentes, tem despertado o interesse pela produção de tensoativos por micro-organismos tais como bactérias, fungos e leveduras (FREITAS et al., 2016; GAUR et al., 2019).

O interesse em espécies de *Candida* tem crescido nos últimos anos devido a sua atuação biotecnológica diversificada. O uso de resíduos agroindustriais para a produção de biossurfactante por espécies do gênero *Candida* já foi descrito por diversos pesquisadores. Diante da importância das leveduras e sua potencialidade na produção de biossurfactantes, estes micro-organismos tem sido tema de várias pesquisas (RUBIO-RIBEAUX et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2019 GAUR et al., 2019).

Um bioemulsificante produzido por *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (KIM et al., 2000). Outras pesquisas descrevem a combinação entre óleos vegetais e carboidratos como substratos para a produção de bioemulsificantes por leveduras do gênero *Candida* (GAO et al., 2013), enquanto outras descrevem a utilização de resíduos industriais (RUFINO et al., 2013; LUNA et al., 2014). O biossurfactante de *C. utilis* demonstrou adequação como emulsificante em molhos para saladas (CAMPOS et al., 2014; 2015). A *C. bombicola* e a *C. lipolytica* estão entre as leveduras mais comumente estudadas para a produção de biossurfactantes (SANTOS et al, 2017).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar o meio de produção e o micro-organismo produtor de biossurfactante, com propriedades emulsificantes, caracterização química e avaliar a toxicidade para aplicação como aditivo em sistemas alimentares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Selecionar micro-organismo e produzir biossurfactante com propriedades emulsificantes para aplicação como aditivo em sistemas alimentares.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar micro-organismo específico para a produção de biossurfactante;
- Selecionar meio de cultivo para a produção de biossurfactante;
- Determinar a atividade de emulsificação dos biossurfactantes;
- Determinar a tensão superficial dos biossurfactantes;
- Isolar o biossurfactante;
- Determinar a toxicidade do biossurfactante;
- Caracterizar o biossurfactante;
- Avaliar a viscosidade da formulação contendo o biossurfactante;
- Propor formulações para aplicação do biossurfactante como agente emulsificante de molhos para saladas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SURFACTANTES

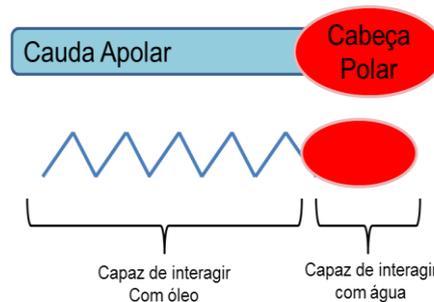
3.1.1 Definições e Propriedade

O emprego de surfactantes foi descrito desde o ano 2800 AC, com antigas civilizações para o processo de fabricação de sabão, a partir da saponificação de gorduras de animais ou vegetais. No decorrer dos anos, a produção dos surfactantes por este método foi dificultada, em razão da restrição de produtos de origem animal e vegetal, em consequência gerando-se os surfactantes sintéticos. Com isso aumentou-se expressivamente o mercado destes produtos, de forma que, houve também um aumento dos efeitos ambientais negativos devido à resistência à degradação que estes surfactantes apresentavam (WILLIAMS; TRINDADE, 2017).

Diante deste cenário, a busca por agentes mais sustentáveis e menos agressivos ao ambiente, resultou no maior interesse por surfactantes de origem biológica, mais conhecidos como biossurfactantes. Que são compostos oriundos do metabolismo secundário de micro-organismos, cuja atividade demonstra um desempenho equivalente ao dos surfactantes sintéticos (SANTOS et al., 2018).

Surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem uma fração polar (cabeça), também denominada hidrofílica, e outra apolar (cauda), hidrofóbica (Figura 1). A parte apolar é formada por hidrocarbonetos de cadeia alifática, grupos aromáticos e policíclicos, que pode variar de 8 a 18 átomos. A parte polar, é quem determina se o surfactante é iônico, não iônico e anfotérico ou catiônico. Quanto à característica iônica, pode ser catiônica ou aniônica. Que agem entre as interfaces de líquidos com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, tendem a se concentrar na interface de dois líquidos imiscíveis, tais como ar/óleo e água/óleo, ou a interface ar/água, atuando nas tensões superficiais e interfaciais, formando microemulsões (BANAT, MAKKAR, CAMEOTRA, 2000; MANIASSO, 2001; SOURAV et al., 2015; MAO et al., 2015; SANTOS et al., 2016; CAMPOS et al., 2019).

Figura 1: Representação esquemática da molécula do surfactante, com cauda hidrofóbica e cabeça hidrofílica

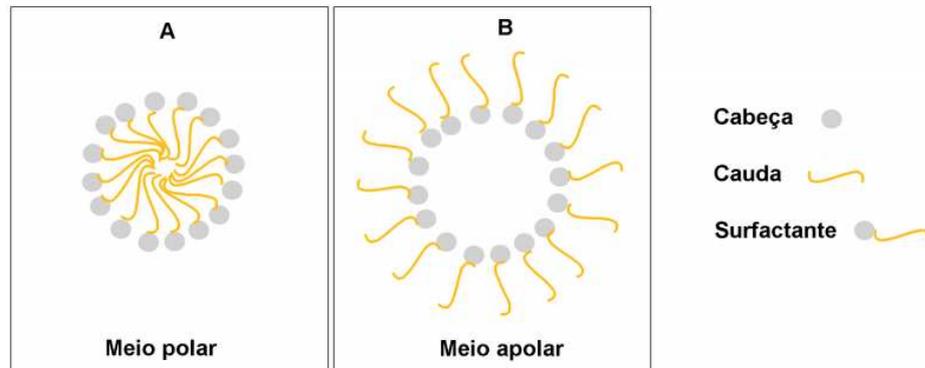


Fonte: Autor. Adaptado de (NAGY, 2018).

Os surfactantes são compostos caracterizados por apresentarem uma superfície ativa, capaz de interagir com as moléculas do líquido em que se encontram e de transformar as propriedades da tensão superficial e interfacial do líquido e, por isso, são também chamados de tensoativos ou compostos de superfície ativa (BARROS et al., 2008).

Quando a concentração de surfactante atinge um determinado número, as moléculas tendem a se auto associarem, com as caudas agregadas para dentro, formando uma estrutura micelar (Figura 2), a qual é favorecida termodinamicamente em solventes polares e corresponde ao ponto no qual o agente tensoativo atinge a menor tensão superficial. Em contrapartida, quando a porção exterior das micelas é composta por porção hidrofóbica e a porção hidrofílica fica no centro, é denominado micela inversa (reversa), em que é formada na fase oleosa (Figura 2). Uma das funções mais relevantes de um biossurfactante, consiste na capacidade deste reduzir a tensão superficial de um sistema, sendo essa redução proporcional à concentração no meio. O que ocorre a partir da formação de micelas, compostas de moléculas anfipáticas ligadas pelas porções hidrofílicas (na região externa da molécula) e às porções hidrofóbicas (região interna) (CAMPOS et al., 2013; BHAISARE et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Figura 2: Esquema ilustrativo mostrando a organização molecular de um surfactante em uma micela direta (A) e uma micela inversa (reversa) (B).



Fonte: Google imagens

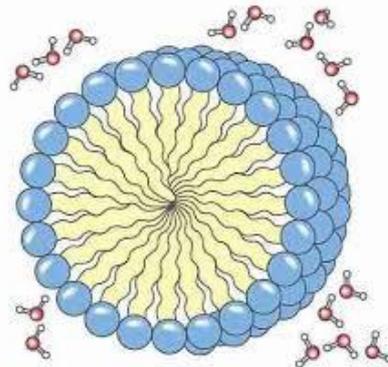
<http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160079>

A eficiência de um surfactante é determinada por sua habilidade em reduzir a tensão superficial, que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. Surfactantes aumentam a solubilidade aquosa de moléculas hidrofílicas, reduzindo a tensão superficial/interfacial de interfaces óleo/água. Bons surfactantes conseguem reduzir a tensão superficial da água destilada de 72mN/m para 35mN/m e a tensão interfacial (tensão entre líquidos polares e apolares). O que de acordo com a literatura quando se adiciona um biossurfactante na água esse valor tende a reduzir. Sendo assim, as tensões nas faixas de 35 mN/m a 40 mN/m, indicam que o micro-organismo é promissor na produção destes compostos e abaixo de 35 mN/m, indica que o micro-organismo pode ser considerado um eficiente produtor (BANAT et al., 2010; LUNA et al., 2011).

Além dessa propriedade, os tensoativos tendem a formar agregados, denominados micelas (Figura 3), que se formam espontaneamente em certas concentrações de água, propriedade que atribui à capacidade de detergência e solubilização dessas moléculas. Concentração Micelar Crítica (CMC) é a menor concentração na qual começa a ocorrer a formação das micelas (Figura 4), sendo muito importante para análise do surfactante, quanto menor a CMC, mais eficiente ele é, pois necessita de uma menor quantidade para reduzir a tensão superficial ao máximo (CAMPOS et al., 2013; BHAISARE et al., 2015).

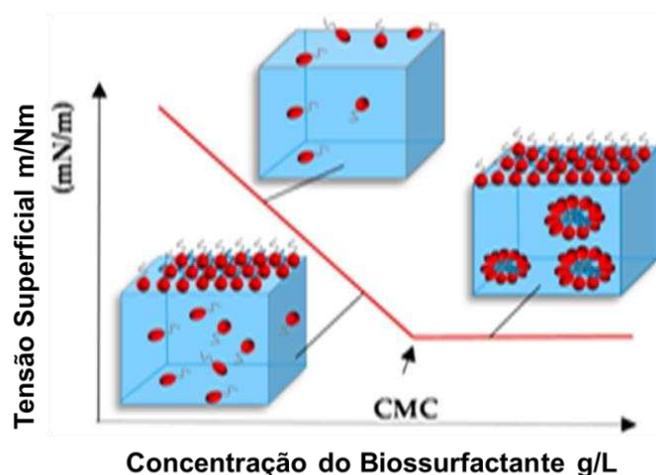
A tensão superficial de um sistema diminui, à medida que as micelas são formadas, e sua concentração está diretamente à CMC, o que corresponde à mínima concentração de surfactante ou biossurfactante necessária para que a tensão superficial e interfacial seja reduzida ao máximo (SANTOS et al., 2016).

Figura 3: Representação esquemática de um tensoativo e formação de micela



Fonte: Adaptado de <https://esquadraodoconhecimento.wordpress.com/ciencias-da-natureza/quim/shampoos-e-detergentes/>

Figura 4: Ação do surfactante e formação de micelas (Concentração Micelar Crítica, CMC)



Fonte: Adaptado de (SANTOS et al., 2016)

A CMC varia para cada biomolécula, dependendo da sua estrutura e das condições experimentais. De acordo com Banat et al. (2000), tais características fazem com que os surfactantes apresentem diferentes características, como: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases, o que os torna uma molécula versátil para diversas aplicações.

Os surfactantes sintetizados quimicamente são oriundos de petróleo ou fontes de oleoquímico, são compostos não biodegradáveis, ou seja, não se decompõe de forma natural, podendo ser tóxicos para o ambiente. No entanto, com a atual conscientização da população em relação à preservação do meio ambiente, observa-se o uso dos surfactantes sob uma nova ótica, juntamente com as novas leis de proteção ambiental, tem sido

estudada com a finalidade de substituir os surfactantes sintéticos por naturais, no que se refere ao seu uso de descarte nos ecossistemas. Sendo os surfactantes produzidos por micro-organismos uma alternativa viável, para a substituição daqueles oriundos do petróleo. Desta forma, torna-se viável a utilização de biossurfactantes, sendo eficaz e de baixa toxicidade.

3.2 Biossurfactantes

Biossurfactantes ou surfactantes microbianos são biomoléculas produzidas por uma grande variedade de micro-organismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), presentes na natureza (SOUZA et al., 2017). Ou seja, denomina-se biossurfactantes aqueles produzidos a partir do metabolismo dos micro-organismos. Subprodutos metabólicos, que exibem alta atividade surfactante e atividade emulsificante (BANAT et al., 2010).

As moléculas de biossurfactante apresentam um caráter anfipático, pois possuem uma parte polar ou hidrofílica e apolar ou hidrofóbica. São compostos tenso-ativos, assim como os surfactantes sintéticos, capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial nas interfaces entre sólidos, líquidos e gases, permitindo-lhes assim, misturar ou dispersar prontamente como emulsões em água ou em outros líquidos. Em função da presença desses dois grupos na mesma molécula, os biossurfactantes tendem a se distribuir preferencialmente nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, tais como óleo/água e ar/água. Esses biossurfactantes promovem a emulsificação dos hidrocarbonetos, tornando-os miscíveis em água, o que reduz a tensão superficial e eleva o deslocamento de compostos oleosos. Permitindo a biodegradação do contaminante por aumentarem o contato deste com os micro-organismos, o que torna o contaminante com maior disponibilidade (BANAT et al., 2000; CAMPOS et al. 2019).

Os biossurfactantes são moléculas complexas que possuem diferentes estruturas, a principal forma de classificação dos biossurfactantes está relacionado às suas propriedades físico-química, sendo elas, fosfolipídeos, lipopeptídeos e glicolipídeos (baixo peso molecular), lipossacarídeos, lipopeptídeos e biopolímeros complexos (alto peso molecular), fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeos neutros, além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. Dentre estes, os glicolipídeos são o grupo de biossurfactantes mais estudados, devido à alta produção e aplicações potenciais (CHANDRAN; DAS, 2011;

GHRIBI, 2017; SOUZA et al., 2017). *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., Leveduras (*Candida* sp.) e *Acinetobacter* sp., são alguns micro-organismos conhecidos pela produção de biossurfactantes (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018).

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, que são as mais estudadas, são descritas na literatura como importantes produtoras de biossurfactantes, porém, biossurfactante de origem bacteriana não são adequadas para a produção na indústria alimentícia, devido a sua possível natureza patogênica existente (SANTOS et al., 2017). Desta forma, tem-se um grande interesse em se estudar as leveduras produtoras de biossurfactantes, pois estas possuem baixo ou nenhum risco de toxicidade e patogenicidade. Algumas espécies de leveduras são muito estudadas e possuem positiva produção de biossurfactantes (AMARAL et al., 2010).

Uma grande vantagem do uso de leveduras está o status GRAS (*Generally Regarded as Safe*), os quais não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, permitindo sua utilização na indústria e alimentos (CAMPOS et al., 2014; RUBIO-RIBEAUX et al., 2017; RIBEIRO et al., 2019). Um bioemulsificante produzido por *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (KIM et al., 2000). Existem pesquisas relacionadas à produção de bioemulsificantes a partir de substratos oleosos regionais ou glicose com *C. lipolytica* (SANTOS et al., 2013). Já *C. bombicola* e a *C. lipolytica* estão entre as leveduras mais comumente estudadas para a produção de biossurfactantes (SANTOS et al., 2017). Além da *Saccharomyces cerevisiae*, que produz uma nanoproteína capaz de estabilizar emulsões água/óleo para produção de maionese, biscoitos, sorvetes, entre outros (BENTO; GAYLARDE, 1996).

Estes compostos apresentam potencial considerável em aplicações comerciais em diversos setores. Têm vantagens sobre os surfactantes de origem sintética em relação à biodegradabilidade, por apresentar baixa toxicidade, melhor compatibilidade ambiental, atividades específicas sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade, além da capacidade de ser sintetizado a partir de matéria-prima renovável (CAMEOTRA et al., 2010; CHEN et al., 2015).

Podem ser aplicados em diferentes campos, como no aprimoramento da recuperação de óleo, bem como na biodegradação de poluentes insolúveis em água e materiais processados na indústria alimentícia, amplamente utilizados em diferentes tipos de setores como em saúde, papel e celulose, doméstico, limpeza, carvão têxtil, mineral,

biorremediação ambiental e campo de petróleo como agente EOR (recuperação aprimorada de petróleo) (MONTEIRO et al., 2010; PERFUMO; RANCICH; BANAT, 2010).

A utilização industrial dos biossurfactantes, entretanto, tem sido dificultada em virtude dos altos custos de produção associados à métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. Por outro lado, estes custos podem ser significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes de baixo custo, bem como através da obtenção de altos rendimentos em produto (GALLERT, WINTER, 2002). Entretanto, eles apresentam muitas características desejáveis, pois, são produzidos por micro-organismos a partir de matérias renováveis, podem ser utilizados em uma ampla variedade de aplicações e são ajustadas com liberação no meio ambiente (PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2017).

Considerando a importância na proteção do meio ambiente e legislação de controle ambiental, adequa-se a motivação no desenvolvimento de compostos naturais como uma alternativa aos produtos existentes, o que tem despertado o interesse pela produção de tensoativos por micro-organismos produzidos por bactérias e leveduras (FREITAS et al, 2016).

Diante das características apresentadas, os tensoativos microbianos apresentam inúmeras propriedades e funções fisiológicas, vem desempenhando um papel importante na solubilização de compostos hidrofóbicos, na ligação de metais pesados, na adesão e agregação celular e na produção de compostos antimicrobianos e antibióticos. Dentre outras propriedades como, ação antimicrobiana, hemolítica, antiviral, anticancerígena e imunomoduladora, sendo passíveis de utilização na biomedicina e na terapêutica. De forma que tais propriedades fazem dos biossurfactantes uma alternativa segura e importante para o combate de agentes patogênicos transmitidos pelos alimentos (MNIF; GHRIBI, 2016; SHARMA; SAHARAN, 2016; EKPENYONG et al., 2017).

3.3 Micro-organismos produtores de biossurfactantes

Os micro-organismos (bactérias, leveduras e fungos) são conhecidos por produzir biossurfactantes. São classificados como glicolipídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos, polímeros ou compostos particulados (LUNA et al., 2013; RUFINO et al., 2014). Embora a maioria dos biossurfactantes tenha sido relatada em bactérias, a natureza patogênica presente em alguns produtores, restringe a ampla aplicação desses compostos, principalmente na indústria alimentícia. Diante da importância industrial das leveduras e do

seu potencial na produção de biossurfactantes, um número crescente de aspectos relacionados à produção de biossurfactantes a partir de leveduras (Tabela 1) tem sido o tema de pesquisas durante muitos anos (ALMEIDA et al., 2017; GAUR et al. 2019).

Uma grande vantagem do uso de leveduras reside no status GRAS (*generally regarded as safe* – geralmente reconhecido como seguro) que muitas delas apresentam como *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. Organismos com “status” GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos (CAMPOS et al., 2013; CAMPOS et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

Tabela 1- Produção de biossurfactantes por *Candida* relatados na literatura

Classe/Tipos de Biossurfactante	Micro-organismo	Referencial
Soforolípídios	<i>Candida bombicola</i>	ROELANTS et al. (2013); LUNA et al. (2016)
Soforolipídeos	<i>Candida glabrata</i>	LUNA et al.(2009); GUSMÃO et al. (2010)
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	SANTOS et al. (2016); RUFINO et al. (2014)
Glicolipídeos	<i>Candida sphaerica</i>	SOBRINHO et al. (2013); LUNA et al. (2015); CHAPRÃO et al. (2015)
Glicolipídios	<i>Candida guilliermondii</i>	SITOHY et al. (2010)
Ácidos graxos	<i>Candida utilis</i>	CAMPOS et al. 2013)
Manosileritritol-lipídeos	<i>Candida antarctica</i>	KIM et al. (2002); HUA et al. (2003)
Manose-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>	BATISTA et al. (2010) ; PRIJI et al. (2013)

Fonte: Próprio Autor

Pesquisas em todo o mundo tem sido direcionada a esses agentes microbianos desde que foram descobertos. Bem como, o potencial de fungos filamentosos na produção de biossurfactantes também foi relatado por algumas investigações. No entanto, a maioria

dos estudos utilizou a capacidade de bactérias e leveduras para sintetizar biossurfactantes usando substratos de baixo custo (PELE et al., 2019).

3.4. Fatores que afetam a produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, através de variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (DESAI; BANAT, 1997). Os vários fatores físico-químicos são discutidos a seguir (BHARDWAJ et al., 2013):

Fonte de carbono

A fonte de carbono desempenha um importante papel não só no crescimento microbiano, como também na produção de biossurfactantes por vários micro-organismos. Quando apenas a glicose ou óleo vegetal foram utilizados individualmente para a produção de biossurfactante por *T. bombicola*, rendimentos muito reduzidos foram obtidos, mas quando ambas as fontes de carbono foram usadas em conjunto, o rendimento aumentou para 70 g/L (COOPER; PADDOCK, 1984).

Quando concentrações de 80 e 40 g/L de glicose e óleo de soja foram usadas, atingiu-se o rendimento máximo de soforolípídeos pela *T. bombicola* (KIM et al., 1997); rendimentos ainda mais elevados, de 120 g/L de soforolípídeos foram obtidos por *C. bombicola* quando o açúcar e o óleo foram usados em conjunto (CASAS et al., 1997). Quando o óleo de canola e a glicose foram usados como as fontes de carbono por *C. Lipolytica* obteve-se 8 g/L de soforolípídeos (SARUBBO et al., 2007). Embora a maior produção de bioemulsificante tenha sido observada com *C. lipolytica* em meio contendo 1,5% de glicose (SARUBBO et al., 2001), a *C. antarctica* e a *C. Apicola* produziram 13,4 e 7,3 g/L de soforolípídeos, respectivamente, com a suplementação do meio comum resíduo da indústria de sabão a 5% de concentração (BEDNARSKI et al., 2004). As células de *Pseudozyma (C. antarctica)* na fase estacionária foram capazes de converter n-alcenos de C12 a C18 em lipídeos Manosileritritol (MEL). O rendimento de MEL foi de 140 g/L ao fim de 4 semanas (KITAMOTO et al., 2001).

Fonte de nitrogênio

É o segundo suplemento mais importante para a produção de biossurfactantes por micro-organismos. Em muitos processos de fermentação, a razão C/N é um parâmetro

extremamente sensível, afetando, a quantidade de metabolitos produzidos. Uma alta relação de C/N, isto é, níveis reduzidos de nitrogênio, limitam o crescimento de bactérias e direcionam o metabolismo celular para a produção de metabólitos. Em contrapartida, um excesso da fonte de nitrogênio direciona o substrato para a síntese de material celular, limitando relativamente o acúmulo de produtos (ROBERT et al., 1989). Várias fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio têm sido utilizadas na produção de biossurfactantes. Santa Anna et al. (2002), estudaram o efeito da fonte de nitrogênio na produção de um biossurfactante por *P. aeruginosa* PA1 cultivada em meio mineral contendo 3% de glicerol. Nesse trabalho, o NaNO_3 foi mais eficaz do que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, observando-se que as limitações nutricionais direcionaram o metabolismo para a formação de biossurfactante.

De acordo com Mulligan e Gibbs (1989), a *P. aeruginosa* utiliza amônia, nitratos e aminoácidos como fontes de nitrogênio. A amônia pode ser assimilada pela glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.4) para formar glutamato ou, com o glutamato, pela ação da glutamina sintetase (EC 6.3.1.2.) para formar glutamina. A glutamina e o α -cetoglutarato são então convertidos em glutamatos pela L-glutamina 2-oxiglutarato aminotransferase (EC 1.4.1.13). Os nitratos, por sua vez, devem ser reduzidos a nitrito e, em seguida, a amônia. Conseqüentemente, em comparação com a amônia, a assimilação de nitrato é mais lenta, simulando, assim, uma condição limitante de nitrogênio, que é favorável à produção do raminolipídeo. Por outro lado, durante a síntese de um raminolipídeo, a formação do lipídeo é a etapa determinante, e a limitação de nitrogênio pode promover o acúmulo de lipídeo. Portanto, em comparação com a amônia, a assimilação de nitrato como fonte de nitrogênio é mais lenta, simulando uma condição limitante de nitrogênio, que é favorável para a produção de raminolipídeo. Os rendimentos mais elevados de soforolipídeos são observados utilizando-se extrato de levedura e uréia como fontes de nitrogênio (DESPANDE; DANIELS, 1995; CASAS et al., 1997), Embora, os rendimentos mais elevados de MEL por *Candida* sp. SY16, *C. lipolytica* e *C. glabrata* UCP 1002 tenham sido observados com nitrato de amônio e extrato de levedura (KIM et al., 1999; RUFINO et al., 2007; 2008; SARUBBO et al., 2006; 2007).

Condições de crescimento

As condições de crescimento, tais como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio também afetam a produção de biossurfactantes por em função de seus efeitos sobre o crescimento ou atividade celular (DESAI; BANAT, 1997). Espécies de *Candida* produzem rendimentos máximos de biossurfactantes numa ampla faixa de pH, como pode ser visto com a *C. glabrata* UCP 1002, que produziu quantidade máxima de biossurfactante

em pH 5,7, com a *Candida* sp. SY16 a pH 7,8, *C. lipolytica* a pH 5,0 e *C. batistae* a pH 6,0 (CIRIGLIANO; CARMAN, 1984; KIM et al., 1999; SARUBBO et al., 2006; KONISHI et al., 2008), enquanto que *Aspergillus ustus* e a *Pichia anamola* produziram máximo rendimento em biossurfactantes em pH 7,0 e 5,5, respectivamente (THANIYAVARN et al., 2008; KIRAN et al., 2009). Vários processos microbianos também são dependentes da temperatura. A temperatura mais favorável para a produção de biossurfactantes por vários fungos está em torno de 30°C, como observado em várias espécies de *Candida*, como *Candida* sp. SY16, *C. bombicola* e *T. batistae* (COOPER; PADDOCK, 1984; DESHPANDE; DANIELS, 1995; KIM et al., 1999; KONISHI et al., 2008).

O tempo de incubação também tem um efeito significativo sobre a produção de biossurfactantes. Diferentes micro-organismos são capazes de produzir biossurfactantes em diferentes intervalos de tempo. A máxima produção de biossurfactante por *Aspergillus ustus* MSF3 foi observada após 5 dias de incubação, enquanto que para a *C. bombicola*, os melhores períodos de incubação foram observados após 7, 8 e 11 dias (CASAS et al., 1997; CAVALERO et al., 2003; FELSE et al., 2007). Por outro lado, observou-se máxima produção de biossurfactante por *C. bombicola* usando gordura animal após 68 h de incubação (DESHPANDE; DANIELS, 1995). Um aumento na agitação favoreceu o acúmulo do biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em glicerol (SILVA et al., 2010). A variação da velocidade de agitação entre 50 e 200 rpm foi estudado por Oliveira et al. (2009) para a *P. alcaligenes* cultivada em óleo de palma. Os autores observaram que o aumento da velocidade de rotação favoreceu a redução da tensão superficial do líquido metabólico livre de células para 27,6 mN/m. Já Cunha et al. (2004) observaram que a agitação teve um efeito negativo sobre a redução da tensão superficial do biossurfactante produzido por *Serratia* sp. SVGG16 cultivada em meio contendo hidrocarbonetos.

3.5 Resíduos industriais utilizados na produção do biossurfactantes

As indústrias produzem diariamente grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos, resultantes da produção e do processamento de alimentos e produtos agroindustriais, que quando descartados, geram grande poluição e representam um grande desperdício de nutrientes. No entanto, a necessidade de preservação ambiental tem estimulado cada vez mais a recuperação, a reciclagem e a reutilização de diversos resíduos (EZEJIOFOR et al., 2014).

A crescente demanda de mercado mundial requer o uso de substratos econômicos e de fácil acesso para a produção de biossurfactantes. Uma grande quantidade de estudos

está focada na produção de biossurfactantes utilizando esses resíduos agroindustriais. O uso de substratos de baixo custo para produção, juntamente com o biossurfactante em um único meio de cultura seria economia de tempo, econômica e ecologicamente correta (BHANGE; CHATURVEDI; BHATT, 2016).

Os resíduos industriais têm atraído um grande interesse dos pesquisadores, devido às novas perspectivas de produção com menor custo que vêm sendo levantadas nos processos biotecnológicos, como substratos de baixo custo (Tabela 2), que para esse fim, visa a formulação de meios alternativos, uma vez que estes substratos respondem por cerca de 50% do custo final do produto (SANTOS et al., 2016; LIMA et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017; RIBEIRO et al. 2019).

Tabela 2- Resíduos alternativos utilizados para a produção de biossurfactantes

Resíduos	Referências
Licor de maceração de milho (milhocina)	SILVA et al. (2010); SANTOS et al.(2013)
Glicerol	SILVA et al. (2010)
Suco de caju clarificado	OLIVEIRA; GARCIA-CRUZ (2013)
Vinhaça	OLIVEIRA et al. (2013)
Águas residuais de mandioca	BARROS et al. (2008)
Resíduo de refinaria de óleo de soja	LUNA et al. (2011)
Resíduo de refinaria de óleo de amendoim	SOBRINHO et al. (2008)
Gordura animal	SANTOS et al. (2013)
Gordura vegetal	GUSMÃO et al. (2010)
Óleo de fritura	BATISTA et al. (2010); LUNA et al. (2011)
Melaço	SILVA et al. (2010)

Fonte: Próprio Autor

Os biossurfactantes produzidos a partir de recursos renováveis, são biodegradáveis, atuam sob uma ampla gama de condições ambientais e toxicidade comparativamente mais baixa (GEETHA; IBRAHIM; SANKET, 2018).

Dessa forma, eles apresentam-se como alternativas vantajosas por apresentarem alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e uma grande disponibilidade de matérias primas para produção, visto que a procura esta cada vez maior por produtos alternativos que minimizem os impactos ambientais (BRUMANO, 2017).

A utilização desses resíduos é um dos primeiros passos para produção em escala industrial de biossurfactantes. Particularmente para as indústrias de alimentos, tais como óleos vegetais, efluentes oleosos, gordura animal, gordura vegetal, melação, milhocina, entre outros, utilizados na produção de biossurfactantes (SANTOS, 2017). Alguns dos resíduos industriais mais utilizados na produção de biossurfactantes são comentados a seguir:

Óleos vegetais para a produção de biossurfactantes

Óleos vegetais constituem uma fonte de carbono lipídico e são principalmente constituídos por ácidos graxos saturados ou insaturados com cadeias contendo entre 16 e 18 átomos de carbono (MAKKAR et al., 2011). Diferentes tipos de óleos tais como óleo de girassol e de azeite, dentre outros, demonstraram serem substratos adequados, servindo como fontes de energia e de carbono para a produção de biossurfactantes. As linhagens de *P. aeruginosa* produzem um excelente biossurfactante crescendo tanto em óleo residual de milho, como de soja e de canola (SANTOS et al., 2016). A combinação de glicose e óleo de canola foi utilizada para a produção bem sucedida de um biossurfactante pela levedura *C. lipolytica* (SARUBBO et al., 2007). Óleo de canola residual também tem sido relatado como adequado para o crescimento microbiano e a produção de até 8,0 g/L de biossurfactante (SILVA et al., 2014).

Óleos de fritura

Os resíduos de óleos e gorduras comestíveis são considerados ótimas fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (Figura 5), tornando o seu descarte um desperdício de fonte energética contribuindo ainda para a poluição ambiental. Os óleos vegetais são uma fonte de carbono lipídica e são na sua maioria compostos de ácidos graxos saturados ou insaturados com cadeias carbônicas de 16-18 átomos (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Vários óleos, juntamente com fontes de carbono solúveis em água, são bons substratos para a produção de surfactantes microbianos.

O óleo de babaçu (5%) suplementado com glicose (1%) como fonte de carbono proporciona uma boa fonte para o crescimento e produção biotensoativo. Este trabalho

realizado por Sarubbo et al. (1999) sugeriram que duas estirpes de *C. lipolytica* (1055 e 1120) produziram biossurfactantes no final da fase exponencial de crescimento e no início da fase estacionária de crescimento. O azeite de girassol foi descrito como um excelente fonte de carbono e de energia para a produção de tensioativos microbianos. Estirpes mutantes de *P. aeruginosa* EBN-8 produziram um biossurfactante utilizando óleo de cânola, de soja, de milho e de refinaria de petróleo (RAZA et al., 2006; 2007). Resíduos de refinaria de óleo de canola suplementado com nitrato de sódio foi relatado para o crescimento microbiano e produção de ramnoipídeo com rendimento de 8,50 g/L. A co-utilização de óleo de canola e glicose também tem sido relatada com sucesso para a produção de biossurfactantes com *C. lipolytica* (SARUBBO et al., 2007).

Figura 5: Resíduos de óleo de fritura



Fonte: Google imagens

(<https://biotechreciclagem.com.br/2017/01/13/o-que-fazer-com-oleo-de-fritura/>)

Milhocina

A agroindústria de produtos à base de milho, através das etapas de processamento úmido, que resulta em resíduos sólidos e líquidos (Figura 6), os quais, quando dispostos de forma inadequada, se tornam uma fonte de contaminação. A milhocina é um destes resíduos, resultante da água de lavagem, a qual contém 40 % de material sólido. Este subproduto consiste de 21 % a 45 % de proteínas, de 20 % a 26 % de ácido láctico, 8 % de cinzas (contendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+), 3 % de carboidratos e um baixo teor de gordura (de 0,9 % a 1,2 %) (HELMY et al., 2011). Milhocina tem se mostrado uma excelente fonte de nutrientes de baixo custo para a produção de glicolípidos por *C. sphaerica* UCP 0995. O biossurfactante desta linhagem mostrou potencial para mobilização e remoção de até 95%

de óleo de motor em areia, demonstrando potencial para processos de biorremediação (LUNA et al., 2015).

Figura 6: Resíduo de licor de maceração de milho (milhocina)



Fonte: Adaptado de (CANUTO, 2006).

Melaço

O melaço é um subproduto do processamento da cana-de-açúcar (Figura 7) e da beterraba. Este resíduo apresenta como composição média 75 % de matéria seca, 9% - 12% de matéria orgânica não açucarada, 2,5% de proteína e 1,5% - 5,0% potássio, bem como magnésio, fósforo e cálcio (1%). Os teores de inositol, biotina, tiamina e ácido pantotênico (1% - 3%) conferem ao melaço sua consistência e cor acastanhada. O elevado teor de açúcar (48% - 56%) torna o melaço adequado para a produção de biossurfactantes por diferentes micro-organismos. Freitas et al. (2016) utilizaram melaço, bem como outras fontes de carbono para produzir um biossurfactante pela linhagem de *Candida bombicola* URM 3718. O biossurfactante obtido apresentou excelente estabilidade sob condições extremas de temperatura, pH e de salinidade e potencial para aplicação na remediação ambiental (SANTOS et al., 2016).

Figura 7: Resíduo do processamento da cana-de-açúcar (melaço)



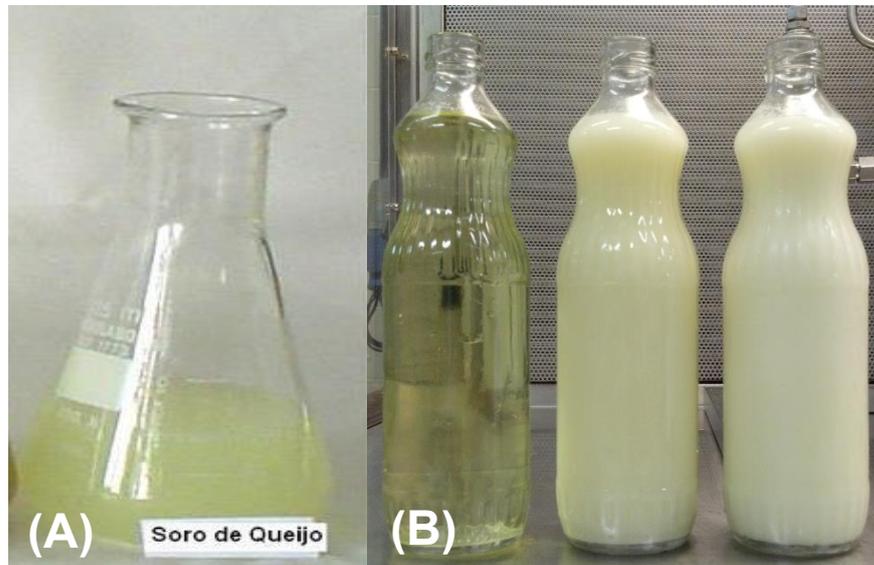
Fonte: Google imagens

(<https://www.istockphoto.com/br/fotos/mela%C3%A7o?mediatype=photography&phrase=mela%C3%A7o&sort=mostpopular>)

Soro (laticínios e subprodutos de destilaria)

Indústrias de laticínios produzem grandes quantidades de soro de leite que incluem, soro de coalho, resíduos de soro de leite e soro de queijo (Figura 8), todos os quais estão facilmente disponíveis como substratos tratados para a produção microbiana de metabólitos (DUBEY; JUWARKAR, 2001; DUBEY et al., 2005; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RODRIGUES et al., 2006). Altas quantidades (cerca de 75%) de lactose estão presentes no soro láctico. Outros componentes, como proteínas e ácidos orgânicos, e vitaminas fornecem bons nutrientes para o crescimento microbiano e a produção de biossurfactantes (MANEERAT, 2005). O soro de leite representa um grave problema de poluição, especialmente para os países de forte economia leiteira, de modo a tornar o seu reaproveitamento ainda mais expressivo (HELMY et al., 2011).

Figura 8: Resíduos da indústria de laticínios: (A) resíduo de soro de queijo e (B) resíduo de soro de leite.



Fonte: **A-** Adaptado de (CANUTO, 2006); **B-** Google imagens

(<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1476910/soro-de-leite-e-foco-de-pesquisa-para-alimentos-funcionais->)

3.6 Principais Aplicações dos Biossurfactantes

Existem muitas áreas de aplicação onde os surfactantes químicos poderiam ser substituídos pelos biossurfactantes, uma vez que os biossurfactantes apresentam vantagens explícitas frente aos seus homólogos químicos, dentre as quais, campos tão diversos como a agricultura, construção, indústrias de bebidas e alimentícias, limpeza industrial, biorremediação de poluentes insolúveis em água, lubrificantes, tratamento do couro, indústrias de papel e metal, indústrias têxteis, cosméticos, indústria farmacêutica, e indústrias de petroquímicos e petróleo, eles vêm sendo cada vez mais estudados para futuras aplicações, devido a sua ampla gama de aplicações em diferentes indústrias. De forma que podem ser empregados em diversos segmentos, substituindo, pelo menos parcialmente, os surfactantes químicos em produtos de grande consumo (Tabela 3) (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; RADZUAN; BANAT; WINTERBURN, 2017; AKBARI,

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa produzidos a partir de micro-organismos é baseado em suas propriedades funcionais, como agentes multifuncionais, que incluem: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos, redução da tensão superficial, agentes estabilizantes, molhantes, antimicrobianos, hidratantes, emulsionantes

e antiadesivos. As diversas estruturas dos surfactantes microbianos conferir-lhes a capacidade de exibir desempenho versátil (FIECHTER 1992; PERFUMO et al., 2017).

Recentemente, biossurfactantes alcançaram um potencial interesse para aplicações ambientais na remediação de contaminantes orgânicos e inorgânicos, particularmente na remoção de metais pesados do solo e água, cosméticos, produtos farmacêuticos e recuperação avançada de petróleo. Dentre os produtos se destacam os detergentes para lavagem de roupas, produtos para limpeza de superfícies e de higiene pessoal (PERFUMO; BANAT; MARCHANT et al., 2018; RADZUAN; BANAT; WINTERBURN, 2017; AKBARI et al., 2018).

Em busca de um desemulsificante não tóxico e ecologicamente correto, o biossurfactante está recebendo muita atenção nas indústrias de petróleo, provando que pode ser efetivamente usado para remediação de solo salino contaminado com petróleo ou na recuperação aprimorada de óleo a partir de poços de óleo salino (DAS; KUMAR, 2018). Na mesma área de aplicação, que avaliaram a remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) no solo aplicando biossurfactantes (COSTA et al., 2018).

A biorremediação está entre as abordagens biológicas mais amplamente estudadas para o tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos, no tratamento de água oleosa e de ambientes marinhos contaminados por derramamentos de óleo (CHAPRÃO et al., 2018; OSTENDORF et al., 2019; SANTOS et al., 2019). Também muito promissor na solubilização e remoção de tinta (MARTINS; MARTINS, 2018).

Também encontraram aplicações nos campos terapêuticos, sanitários e biomédicos. Suas atividades antivirais, antifúngicas e antibacterianas os tornam compostos/moléculas adequadas para uso como agentes terapêuticos e, devido à sua origem biológica, são amplamente considerados mais seguros do que produtos farmacêuticos sintéticos (CAMPOS et al., 2013).

Todavia, estudos demonstraram o uso potencial de biossurfactantes em diferentes campos. No entanto, existem pesquisas muito limitadas sobre a aplicação de biossurfactantes na indústria farmacêutica. Relacionado às aplicações de biossurfactantes, foi observado uma atividade antimicrobiana de vários biossurfactantes contra cepas patogênicas, a partir da permeação de compostos farmacêuticos através da membrana de silicone (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2019).

Alguns biossurfactantes, como lipopeptídeos e glicolipídios, têm sido utilizado para inibir seletivamente a proliferação de células cancerígenas e para perturbar membranas celulares, causando sua lise, por via de apoptose. Além disso, biossurfactantes como veículos de entrega de drogas oferecem aplicações comercialmente atraentes e cientificamente novas. Além de potenciais substitutos para, compostos antimicrobianos, principalmente para controle de infecção por biofilme (COSTA et al., 2018). As atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral de biossurfactantes fazem com que sejam potencialmente aplicadas no combate a muitas doenças (YULIANI et al., 2018).

Outro importante e promissor uso de aplicação dos biossurfactantes é o de produtos alimentícios, devido à sua atividade antiadesiva e grande capacidade de atuar como agente emulsificante, essencial na maioria dos alimentos que contem óleos e gorduras. Desta forma, sua utilização tem o mesmo intuito que os emulsificantes já utilizados atualmente: que é formar emulsões estáveis e melhorar a textura e a cremosidade dos produtos (CAMPOS et al., 2013; MNIF; GHRIBI, 2016; GIRI et al., 2017).

Tabela 3 - Aplicações dos biossurfactantes para uso comercial

Indústria	Aplicações	Função dos biossurfactantes
Meio ambiente	Biorremediação; Operação de limpeza de derramamento de óleo; Descontaminação de solo	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, dispersão de óleos, solubilização de óleos, molhamento, espalhamento, detergência, formação de espuma, inibição de corrosão em óleos e equipamentos, lavagem do solo.
Petróleo	Recuperação melhorada; Desemulsificação.	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, desemulsificação de emulsões de óleo, solubilização de óleos, redução de viscosidade, dispersão de óleos, molhamento de superfícies sólidas, espalhamento, detergência, formação de espuma, inibição de corrosão em óleos combustíveis e equipamentos
Mineração	Remoção de metais pesados; Remediação de solos; Flotação	Molhabilidade e agente espumante, remoção de íons metálicos I de soluções aquosas, solo e sedimentos, sequestrantes de metais pesados e inibição de corrosão em óleos
Medicina	Microbiológica; Farmacêutica e terapêutica.	Agentes antiaderentes, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, agentes antivirais, vacinas, terapia genética, moléculas imunomoduladoras.
Agricultura	Biocontrole; Fertilizantes.	Molhagem, dispersão, suspensão de pesticidas em pó e fertilizantes, emulsão de soluções de pesticidas, facilitação de mecanismos de biocontrole de micróbios, eliminação de patógenos de plantas e aumento da biodisponibilidade de nutrientes para micróbios benéficos associados a plantas.
Cosméticos	Produtos de beleza e saúde	Emulsificação, agentes espumantes, solubilização, agentes molhantes, produtos de limpeza, agentes antimicrobianos, mediadores da ação

		enzimática.
Higienização	Detergentes para lavagem	Detergentes e desinfetantes para lavagem, molhagem, espalhamento, inibição de corrosão.
Têxteis	Preparação de fibras; Tingimento e impressão; Acabamento de têxteis	Molhamento, penetração, solubilização, emulsão, detergência e dispersão, molhagem e emulsificação em formulações de acabamento, amaciamento.
Nanotecnologia	Síntese de nanopartículas	Emulsificação, estabilização

Fonte: Adaptada de (SANTOS., et al 2016

Os biossurfactantes por serem conhecidos como compostos multifuncionais devido às suas propriedades não prejudiciais em comparação com os surfactantes sintéticos. A indústria utiliza-os para diferentes finalidades (AKBARI et al., 2018).

3.7 Aplicação dos Biossurfactantes na Indústria Alimentícia

Na indústria de alimentos, considerando que são utilizadas proteínas, carboidratos, gorduras e lipídeos, são realizadas diversas combinações, resultando em diferentes tipos de emulsões (pequenas gotículas lipídicas dispersas dentro de um meio aquoso). Sendo estas de difícil estabilização devido ao grande número de microestruturas complexas, sendo assim, necessária a utilização de alguns aditivos como os emulsificantes, especialmente em sistemas óleo-água (CAMPOS et al., 2016).

Tais propriedades emulsificantes dependem da CMC, devido a sua importante característica físico-química dos surfactantes, a molécula possui uma porção polar, solúvel em água, também chamada de porção hidrofílica, e uma porção apolar, insolúvel em água, também chamada de lipofílica ou hidrofóbica. Em função dessas características, os emulsificantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo que elas se misturem formando a emulsão (ANJUM et al., 2016; CAMPOS et al., 2019).

Visto que a propriedade de emulsão é especialmente muito utilizada na indústria de cosméticos e alimentos para fazer emulsões óleo/água. A textura e cremosidade de queijos e sorvetes são obtidas a partir da adição de emulsificantes, que melhoram a estabilidade da massa, textura e volume, controlando sua consistência, retardamento, propriedades de endurecimento e também adiciona sabores ao solubilizar óleos de sabor (ANJUM et al., 2016). A emulsificação pode ser de interesse no processamento de alimentos, especialmente quando está relacionada à gordura e produtos derivados de petróleo, bem como no tratamento de resíduos. (MNIF; GHRIBI, 2016).

Por definição, uma emulsão é um sistema heterogêneo que consiste em pelo menos um líquido imiscível disperso em outro na forma de gotículas. A emulsificação desempenha um papel importante na consistência, textura, bem como na dispersão de fases e solubilização de aromas na maioria dos produtos da indústria alimentícia. A função de um emulsionante é estabilizar a emulsão controlando o agrupamento de glóbulos e estabilizando os sistemas aerados (MNIF; GHRIBI, 2016).

Os emulsificantes são aditivos de grande importância na indústria de alimentos. Segundo a legislação vigente (Portaria nº 540 de 1997), emulsionante/emulsificante é a substância que torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento. Assim, os emulsificantes são utilizados para manter uma dispersão uniforme de um líquido em outro, tal como óleo e água, estando entre os mais utilizados tipos de aditivos alimentícios. Exemplos de alimentos processados, que são emulsões, incluem creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos para salada, salsicha, linguiça, sorvetes, bolos, chocolate, recheios e produtos instantâneos. Muitos alimentos necessitam de emulsificantes, pois além da água, contêm três outros componentes principais: proteína, carboidrato e gordura. Todos os organismos vivos possuem seu próprio sistema emulsificante. Alguns são extraídos (naturais) para uso em alimentos industrializados, outros imitam o emulsificante natural (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2018).

Portanto, novos aditivos com propriedades semelhantes (espessantes e estabilizantes) aos aditivos utilizados comercialmente vêm sendo estudados e produzidos. Além disso, a busca por estes novos produtos reduz a dependência e utilização dos emulsificantes vegetais oriundos, de plantas geneticamente modificadas, como a soja. Neste cenário, os biossurfactantes apresentam-se como a melhor alternativa, em virtude de que são de origem microbiana, eles apresentam maior resistência às condições adversas, comumente encontradas em processamento de alimentos (CAMPOS et al., 2013; CAMPOS et al., 2015; CAMPOS et al., 2019).

Todavia, os aditivos para emulsificação não necessitam necessariamente da capacidade de reduzir a tensão superficial da água ou dos hidrocarbonetos, desde que atuem como bons emulsificantes (CAMPOS et al., 2013). Os biossurfactantes ainda podem ser utilizados para aumentar a vida útil dos produtos, devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Ao mesmo tempo, mostram-se eficazes na solubilização de óleos vegetais e aromas, na estabilização de gorduras durante o processo de cocção, e até mesmo na melhoria das propriedades organolépticas em pães e formulações de sorvetes (KIELISZEK et al., 2017).

Verificou-se que algumas tentativas foram feitas para avaliar o desenvolvimento de emulsões por biossurfactantes com óleos e gorduras usados na indústria alimentícia. Os sopolipídios derivados de *C. bombicola* foram capazes de emulsionar óleo de soja, azeite, óleo de girassol e óleo de mostarda. Em contrapartida a emulsificação eficiente do óleo de girassol por *Rhodococcus* sp. Outro estudo relatou sua capacidade de solubilizar gordura e óleo de soja, implicando um potencial uso na indústria de alimentos. Foi relatado também a

capacidade de um ramnolípídeo derivado de *B. subtilis* para emulsionar vários óleos vegetais, incluindo óleo de mamona, óleo de mostarda, óleo de coco, óleo de gergelim e óleo de girassol. Da mesma forma, que a emulsificação de miristato de isopropila, óleo de soja, óleo de oliva e óleo de casa branca usando ramnolípídios produzidos por *P. aeruginosa* (MNIF; GHRIBI, 2016).

Em Santos et al (2013), descreveram a emulsificação de óleo vegetal por um biossurfactante glicolípídico. Alguns produzidos por micro-organismos estão sendo utilizados comercialmente, como por exemplo, o bioemulsificante produzido por *Candida utilis* que tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (CAMPOS et al., 2015).

De acordo com Anjum et al. (2016), o estudo realizado com biossurfactante produzido a partir de *Bacillus sp.*, demonstrou ser muito efetivo contra a formação de biofilme ou propriedades anti-adesivas. O envolvimento do biossurfactante na adesão microbiana torna-o importante no controle de qualidade de produtos alimentícios. Controlando assim a adesão de micro-organismos para superfícies de contato com alimentos que é um passo essencial para proporcionar segurança e qualidade dos produtos para os consumidores. Como também, o potencial de remoção de metais pesados das hortaliças. Podendo então ser usado para vários fins, recuperação, processamento de alimentos, atividade antimicrobiana etc.

Os biossurfactantes são uma área crescente de interesse de pesquisa dentro das ciências alimentares. Os de origem micorobianas estão recebendo muita atenção devido à sua Natureza sustentável “natural”. Isso significa que eles são atraentes alternativas aos surfactantes sintéticos em sistemas alimentares. Onde, estudos recentes sobre surfactantes que apresentam relevância para os sistemas alimentares, a saber, sobre o comportamento de superfície e auto-associação dos sais biliares, embora os sais biliares não sejam adicionados diretamente como ingredientes alimentícios, eles têm sido amplamente estudados nos últimos anos devido a sua importância na digestão de alimentos e a crescente importância dos biossurfactantes (EUSTON, 2017). Os surfactantes microbianos têm sido utilizados no processamento de alimentos com vários fins. Especialmente porque, os emulsificantes são ingredientes essenciais em muitos alimentos, especialmente aqueles que contêm óleos e gorduras.

3.8 Aditivos Alimentares

A ANVISA determina de forma geral que os aditivos são todos e quaisquer ingredientes adicionados intencionalmente as formulações alimentícias, sem o propósito real de nutrir, sua função está em modificar as características químicas, físicas, biológicas e também sensoriais, durante todo o processo de fabricação, garantindo a sua estabilidade independentemente do método de processamento, preparo, tratamento térmico, embalagem, acondicionamento, manipulações em todas as etapas e transporte, ou seja, os aditivos são utilizados com o intuito de melhorar e manter certo período as características do alimento, dando a ele uma vida de prateleira mais longa (BRASIL, 1997).

Um princípio fundamental de uso de aditivo é a segurança, portanto, antes da aprovação para uso, um aditivo deve cumprir uma avaliação toxicológica adequada, levando em conta quaisquer efeitos acumulativos, sinérgicos e protetores decorrentes de seu uso. Os aditivos conferem muitas propriedades, como espessamento, estabilização e emulsificação (BRASIL, 1997; CAMPOS et al., 2013).

Dentre as funções dos aditivos utilizados nos alimentos encontram-se, os agentes espessantes, estabilizantes, gelificantes, emulsificantes, anti-humectantes e enrijecedor. Apesar de extremamente eficientes, esses aditivos têm sido sujeitos a restrições, particularmente pelas demandas dos consumidores por menos uso de aditivos “artificiais” ou quimicamente sintetizados em favor de ingredientes mais naturais (CAMPOS et al., 2013).

Os principais ingredientes em biscoitos incluem farinha, açúcar e gordura. Na verdade, as tendências de alimentação saudável e os progressos crescentes da investigação sobre os aditivos alimentares naturais funcionais têm sido notados, incluindo aqueles que exibem alta atividade antioxidante sem efeitos colaterais comparativamente a compostos sintéticos (BANDYOPADHYAY et al., 2014).

Abaixo segue a classificação dos aditivos, de acordo com a ação que exercem no alimento (CODEX, 1997).

- **Antiespumante:** previne ou diminui a formação de espuma.
- **Antiumectante:** diminui as características higroscópicas dos alimentos e a tendência a adesão das partículas individuais.
- **Antioxidante:** prorroga o surgimento de mudanças oxidativas no alimento.
- **Corante:** intensifica a cor de um alimento.

- **Conservador:** prorrogar a modificação dos alimentos gerada por micro-organismos ou enzimas.
- **Edulcorante:** não é um açúcar, mas dá sabor adocicado ao alimento.
- **Espessantes:** aumenta a viscosidade de um alimento.
- **Geleificante:** atribui a textura do alimento por meio da formação de um gel.
- **Estabilizante:** torna possível a manutenção de uma dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento.
- **Aromatizante:** intensificador de aroma, sabor dos alimentos.
- **Umectante:** preserva os alimentos da perda de umidade em ambiente de baixa umidade relativa ou que facilita a dissolução de uma substância seca em meio aquoso.
- **Acidulante:** aumenta a acidez ou confere um sabor ácido aos alimentos.
- **Emulsionante/Emulsificante:** torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento.
- **Glaceante:** quando aplicada na superfície externa de um alimento, atribui uma aparência brilhante ou um revestimento protetor.
- **Espumante:** torna possível a formação ou a manutenção de uma dispersão uniforme de uma fase gasosa em um alimento líquido ou sólido.

A carboximetilcelulose e o monoestearato de glicerila são exemplos de emulsificantes sintéticos bastante poderosos, utilizados na indústria química. Embora, estes aditivos são sujeitos a exceções nesse ramo, na parte dos consumidores, que buscam produtos com menos síntese química. Aumentando assim a consciencialização dos consumidores e elevando a procura de aditivos e ingredientes naturais (CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014).

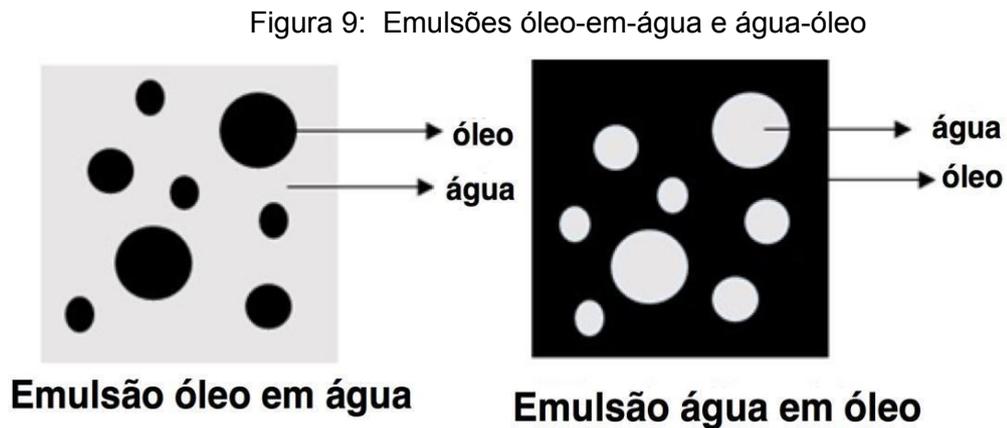
3.9 Emulsificantes

Emulsão é um sistema heterogêneo formado por duas fases líquidas, onde pelo um líquido imiscível é disperso em outro, na forma de gotículas onde o diâmetro não passa normalmente de 100 μm (DE FARIA, 2015; CAMPOS; BANAT; SARUBBO, 2016). Existem alguns tipos de emulsão:

- 1) Emulsão óleo-em-água (O/A) são formadas por gotículas de óleos suspensas numa fase aquosa, onde a base de produtos é a base de água. O surfactante e os componentes presentes na fase aquosa, afetam as propriedades dessa emulsão. (CAMPOS; BANAT; SARUBBO, 2016). Exemplos dessa emulsão são leite, maionese, sopas e molhos (DE FARIA, 2015).

- 2) Emulsão água-em-óleo (A/O) são formadas por gotículas de água opostas suspensas numa fase oleosa. A estabilidade dessa emulsificação depende da propriedade da gordura e do surfactante utilizado (CAMPOS; BANAT; SARUBBO, 2016). Exemplos dessa emulsão são margarina e manteiga (DE FARIA, 2015).

A Figura 9, abaixo apresenta um esquema dessas emulsões comentadas anteriormente.



Fonte: CAMPOS et al., 2016

A emulsão é formada a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis por meio da homogeneização, que tem a capacidade de ser dividida em duas etapas. A primeira etapa, a homogeneização primária, onde ocorre a produção da emulsão diretamente a partir das duas fases, desenvolvendo assim uma pré-emulsão, já a segunda etapa, a homogeneização secundária é a diminuição dos tamanhos das gotas formadas na pré-emulsão, essa segunda etapa é fundamental para determinação de algumas propriedades físico-químicas e sensoriais dos alimentos, como a textura, sabor, aparência, estabilidade e consistência (DE FARIA, 2015).

As emulsões apresentam mínima estabilidade, porém com a adição de biossurfactantes a emulsão que consegue se manter estável durante meses ou até anos. Essa adição diminui a energia superficial entre as duas fases pela redução da tensão interfacial, que impede assim a coalescência das formações de barreiras estéticas e eletrostáticas (SANTOS et al., 2016; CAMPOS et al., 2019).

Essa é a propriedade mais apropriada para a indústria alimentícia, que além de aumentar seu prazo de validade, ainda melhora a textura e cremosidade de produtos lácteos. Além das moléculas com atividades superficiais conseguir solubilizar os óleos aromatizantes e melhorar as propriedades organolépticas em formulações de padaria e sorvetes e como estabilizadores de gordura durante o cozimento (CAMPOS; BANAT; SARUBBO, 2016).

Queijos, sobremesas e sorvetes adquirem textura macia e cremosidade a partir da adição de emulsificantes, que melhoram a estabilidade da massa, textura e volume, controlando a sua consistência e também adicionando sabor pela capacidade de solubilizar óleos aromatizantes nesses preparos (CAMPOS et al, 2013). São utilizados na indústria alimentícia há muito tempo, devido a sua capacidade de formar emulsões estáveis, melhorando a textura e cremosidade de produtos lácteos (CAMPOS et al., 2015).

A estabilidade da emulsão formada por ser modificada pelo tipo de óleo, tensão interfacial, viscosidade da fase contínua, presença de barreiras estéricas e eletrostáticas, relação de volume de fase, tamanho de gotícula, concentração de sal, pH e temperatura. A estabilidade das emulsões pode ser uma consequência boa para algumas aplicações ou um acontecimento não tão bom para outros, como separação e recuperação de óleo, o que pode tornar indispensável promover a sua quebra. As emulsões provenientes de produtos alimentares são estruturas muito complexas uma vez que são sistemas coloidais formados por combinações de lipídios, proteínas e hidratos de carbono. Estas estruturas complexas tornam as emulsões alimentares difíceis de estabilizar e resultam em diferentes tipos de arranjos como géis, espumas, dispersões, etc (CAMPOS; BANAT; SARUBBO, 2016).

Os sistemas coloidais em alimentos têm um número infinito de combinações e são organizados em microestruturas complexas sob a forma de dispersão de agentes, espumas, emulsões, géis, etc. (KOURKOUTAS et al., 2008).

Os emulsificantes são ingredientes indispensáveis na maioria dos alimentos contendo óleos e gorduras, podem ser divididos em dois grandes grupos são eles os emulsificantes de baixa massa molar (monoglicerídeos, polissorbatos, lecitina, entre outros) e os emulsificantes de alta massa molar, como as proteínas (especialmente as proteínas do leite e do ovo), que têm potente tendência a adsorção na interface óleo-água. As proteínas apresentam emulsões cineticamente estáveis, mas reduzem menos a tensão interfacial do que os surfactantes, essa emulsão promove repulsão eletrostática e/ou estérica entre as gotas dispersas que ao ser adsorvidas as suas interfaces, modificam a viscosidade da fase contínua quando não adsorvidas e formam interfaces visco elásticas quando adsorvidas. Já os de baixa massa molar são vastamente usados na preparação de emulsão pelo fato de sua adsorção ser rápida na interface e por serem bastante eficiente na redução da tensão interfacial, o que favorece a deformação e a quebra das gotas durante a homogeneização (DE FARIA, 2015).

Os emulsificantes na alimentação apresentam a função geral de estabilizar a emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizar os sistemas aerados, além de impedir a contaminação do alimento espontaneamente, como um aditivo alimentar, por meio do uso de formulações adequadas, que aumentam assim a vida de prateleira do produto sem

comprometer a saúde dos consumidores, pois deixa de lado a necessidade de adicionar conservantes sintéticos, que na maioria das vezes, são perigosos para a saúde, ou de forma indireta com as formulações de detergentes específicos para limpeza das superfícies que entram em contato com o alimento (DE ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; SANTOS et al., 2016).

O uso de biossurfactantes como emulsificantes se dá no processamento de matérias-primas, como no controle de gordura, aglomeração de glóbulos, estabilização de sistemas aerados e uma melhor consistência aos produtos que tem em sua base a gordura (SANTOS et al., 2016).

Podem ser usados na panificação, produtos derivados da carne e do leite (queijos cremosos e sorvetes), pois a sua adição melhora a textura e a cremosidade, além de influenciar as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras. As leveduras do gênero *Candida* já foram usadas na emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos, e na produção de biossurfactantes por esses micro-organismos facilita o seu crescimento em tais substratos. A *Candida utilis* é um exemplo de bioemulsificante utilizada para produção molhos de salada processados. Para ser considerado um bom emulsificante, ele tem que ter a capacidade para manter as gotículas separadas uma das outras durante o armazenamento (DE ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; CAMPOS; BANAT; SARUBBO, 2016).

No entanto, seu uso se estende a outros campos também. Até certo ponto, a redução na tensão interfacial fornecida por essas substâncias diminui o esforço necessário para ultrapassar a energia de superfície que conduz à dispersão das fases uma na outra. Além disso, permite a estabilização da dispersão, evitando a separação em duas fases imiscíveis, a coalescência e floculação (FIECHTEER, 1992; LIN; SHARMA; GEORGIU, 1993; BRENNAN, 2006; CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014).

Em comparação com os seus equivalentes quimicamente sintetizados, os bioemulsificantes têm muitas vantagens, pois são ecologicamente corretos, biodegradáveis, menos tóxicos e mais resistentes às exigências das modernas tecnologias de processamento de alimentos. Podem ainda ser produzidos a partir de resíduos e de subprodutos, tornando viável a produção em escala industrial (DAS et al., 2018).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARI, S. et al. Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, p. 81-90, 2018.
- ALMEIDA, D. G. et al. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 157, 2017.
- AMARAL, P. F. F. et al. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 236-49, 2010.
- ANJUM, F. et al. Biosurfactant production through *Bacillus sp.* MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. **Bioresource technology**, v. 213, p. 262-269, Augusty, 2016.
- DE 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.
- BANAT, I. M.; MAKKAR R. S.; CAMEOTRA S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.
- BANDYOPADHYAY, K.; CHAKRABORTY, C.; BHATTACHARYYA, S. Fortification of mango peel and kernel powder in cookies formulation. **Journal of Academia and Industrial Research**, v. 2, n. 12, p. 661-664, 2014.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Studies of emulsifying properties and stability of the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cassava wastewater. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.
- BATISTA, R. M. et al. Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. **Water Environment Research**, v. 82, n. 5, p. 418-425, 2010.
- BEDNARSKI, W. et al. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource technology**, v. 95, n. 1, p. 15-18, 2004.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel fuels. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 38, n. 1, p. 31-33, 1996.
- BHAISARE, M. L. et al. Fluorophotometric determination of critical micelle concentration (CMC) of ionic and non-ionic surfactants with carbon dots via Stokes shift. **Talanta**, v. 132, p. 572-578, 2015.
- BHANGE, K.; CHATURVEDI, V.; BHATT, R. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. **Biotechnology reports**, v. 10, p. 94-104, 2016.

Lira, I. R. A. S. Produção e Aplicação de Biossurfactantes para uso em Molhos Para Salada.

BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Utilização de subprodutos da indústria oleoquímica para produção de biossurfactantes. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 68, 2013.

BOURDICHON, F. et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **International journal of food microbiology**, v. 154, n. 3, p. 87-97, 2012.

BRENNAN, J. G.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, Mi. J. Separations in food processing. **Food Processing Handbook**, p. 429, 2006.

BRUMANO, L. P. et al. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. **Bioresource technology**, v. 243, p. 264-272, 2017.

BRASIL, Portaria nº 540 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde, Brasília, Brasil, 27 de outubro de 1997.

BRASIL, Resolução RDC nº 234 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde, de 19 de agosto de 2002.

CAMEOTRA, S. S. et al. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. In: **Biosurfactants**, p. 261-280, Springer, New York, NY, 2010.

CAMPOS, J. M. et al. Microbial Biosurfactants as Additives for Food Industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1097-1108, 2013.

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

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. et al. Use of (bio)surfactants in foods. In: Biotechnological Production of Natural Ingredients for Food Industry. BICAS, J.L.; MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, G.M. (Eds). **Bentham Science Publishers**. 1 ed., v. 1. n. 11, p. 435-459, 2016.

CAMPOS, J. M.; BANAT, I. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants use in the food industry. **Biotechnological production of natural ingredients for food Industry**. p. 435–459, 2016.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. **Biodegradation**, p. 1-12, 2019.

CANUTO, A. P. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais. 2006. 105 f. Dissertação em Processos Biotecnológicos - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **International Journal of Science and Nature**, v. 2, p. 63-71, 2011.

CASAS, J. A.; DE LARA, S. G.; GARCIA-OCHOA, F. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. **Enzyme and microbial technology**, v. 21, n. 3, p. 221-229, 1997.

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

CHAPRÃO, M. J. et al. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 471-479, 2015.

CHAPRÃO, M. J. et al. Formulation and application of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* as collector in the flotation of oily water in industrial environment. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 15-22, 2018.

CHEN, Wei-Chuan; JUANG, Ruey-Shin; WEI, Yu-Hong. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158-169, 2015.

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 747-750, 1984.

CODEX Committee on Food Additives and Contaminants (1997) *Report of the Twenty-ninth Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants*, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (document ALINORM 97/12A, Appendix V).

COSTA, J. A. V. et al. Solid-State Fermentation for the Production of Biosurfactants and Their Applications. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. p. 357-372, Elsevier, 2018.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173-176, 1984.

CUNHA, C. D. et al. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2277-2282, 2004.

DAS, A. J.; KUMAR, R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. **Bioresource technology**, v. 260, p. 233-240, 2018.

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

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource technology**, v. 54, n. 2, p. 143-150, 1995.

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

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 61-69, 2001.

Lira, I. R. A. S. Produção e Aplicação de Biossurfactantes para uso em Molhos Para Salada.

EKPENYONG, M. G. et al. Plackett-Burman Design and Response Surface Optimization of Medium Trace Nutrients for Glycolipopeptide Biosurfactant. Production. **Iranian Biomedical Journal**, v. 21, n. 4, p. 249-260, 2017.

EZEJIOFOR, T. I. N. et al. Waste to wealth-value recovery from agro-food processing wastes using biotechnology: a review. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 418-481, 2014.

EUSTON, S.R. Molecular simulation of biosurfactants with relevance to food systems. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 28, p. 110-119, 2017.

FARIA, J. T. et al. Performance of Quillaja bark saponin and β -lactoglobulin mixtures on emulsion formation and stability. **Food hydrocolloids**, v. 67, p. 178-188, 2017.

FELSE, P. A. et al. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 316-323, 2007.

FIECHTER, A. Biossurfactantes: moving towards industrial application. Trends in **Food Science and Technology**, n. 31, p. 283-293, 1992.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Nº 45 - 2018. Disponível em: http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201811/2018110359696001542801604.pdf. Acesso em: 01/04/2019

FREITAS, B. G. et al. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1646, 2016.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 11, p. 483-496, 2002.

GAO, R. et al. Production of sophorolipids with enhanced volumetric productivity by means of high cell density fermentation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1103-1111, 2013.

GAUR, V. K. et al. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: application as food emulsifier and antibacterial agent. **Bioresource technology**, 285: 121314, 2019.

GEETHA, S. J.; BANAT, I.M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 23-32, 2018.

GIRI, S. S. et al. Role of *Bacillus licheniformis* VS16-Derived Biosurfactant in Mediating Immune Responses in Carp Rohu and its Application to the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2-13, 2017.

GUSMAO, C. A. B; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 1683-1692, 2010.

HELMY, Q. et al. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it's chemically counterparts. **International Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 1-2, p. 66-86, 2011.

Lira, I. R. A. S. Produção e Aplicação de Biossurfactantes para uso em Molhos Para Salada.

HUA, Z. et al. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water research**, v. 37, n. 17, p. 4143-4150, 2003.

KIELISZEK, M. et al. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. **Fungal biology reviews**, v, 31p. 185-198, 2017.

KIM, S. H. et al. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 249-253, 2000.

KIM, S. Y. et al. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 23-26, 1997.

KIM, B. H. et al. Electrochemical activity of an Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 7, p. 475-478, 1999.

KIM, Hee-Sik. et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. **Biotechnology letters**, v. 24, n. 3, p. 225-229, 2002.

KIRAN, G. S. et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256, 2009.

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

KONISHI, M. et al. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. **Journal of oleo science**, v. 57, n. 6, p. 359-369, 2008.

LIMA, R. A. et al. Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 6, p. 237-244, 2017.

LIN, S. C.; SHARMA, M. M.; GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnology progress**, v. 9, n. 2, p. 138-145, 1993.

LUNA, J. M. et al. Economic optimized medium for tensio-active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4, p. 2463-2476, 2011.

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

LUNA, J. M. et al. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 558-566, 2016.

Lira, I. R. A. S. Produção e Aplicação de Biossurfactantes para uso em Molhos Para Salada.

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

LUNA, J. M. et al. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 413-418, 2015.

LUNA, J. M. et al. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 413-418, 2014.

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

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin Journal of Scienc and Technology**, v. 27, n. 3, p. 675-683, 2005.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, 24, 1, 87-93, 2001

MAO, X. et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. **Journal of hazardous materials**, v. 285, p. 419-435, 2015.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558-565, 2012.

MARTINS, P. C.; MARTINS, V. G. Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 10-16, 2018.

MNIF, I.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 4, p. 1-15, 2017.

MNIF, I.; GHRIBI, D.. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 13, p. 4310-4320, 2016.

MONTEIRO, A. S. et al. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5186-5193, 2010.

NAGY, G. M. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE DE BAIXO CUSTO A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2018.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against Fusarium wilt of eggplant. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 2, p. 108-115, 2018.

Lira, I. R. A. S. Produção e Aplicação de Biossurfactantes para uso em Molhos Para Salada.

NITSCHKE, M. et al. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, 2002.

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

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Seleção de microrganismos para produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 35, n. 1-2, p. 81-85, 2004.

OLIVEIRA, F. J. S. et al. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 383-389, 2009.

OLIVEIRA, J. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 155-160, 2013.

OSTENDORF, T. A. et al. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. **Journal of biotechnology**, 2019.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.

PELE, M. A. et al. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 38, p. 40-48, 2019.

PERFUMO, A.; RANCICH, I.; BANAT, I. M. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. In: **Biosurfactants**. p. 135-145, Springer, New York, NY, 2010.

PERFUMO, A. et al. Biodiversity of biosurfactants and roles in enhancing the (bio) availability of hydrophobic substrates. **Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions**, p. 75-103, 2018.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 277-289, 2018.

PRIJI, P. et al. *Candida tropicalis* BPU1, a novel isolate from the rumen of the Malabari goat, is a dual producer of biosurfactant and polyhydroxybutyrate. **Yeast**, v. 30, n. 3, p. 103-110, 2013.

RADZUAN, M. N.; BANAT, I. M.; WINTERBURN, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 99-105, 2017.

RAZA, Z. Ali et al. Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 20, p. 1623-1631, 2006.

RAZA, Z. Ali et al. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, v. 18, n. 1, p. 115-121, 2007.

Lira, I. R. A. S. Produção e Aplicação de Biossurfactantes para uso em Molhos Para Salada.

RIBEIRO, B. G. et al. Production and Optimization of the Extraction Conditions of a Biosurfactant of *Candida Utilis* Ufpeda1009 with Potential of Application in the Food Industry. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 1477-1482. 2019.

ROBERT, M. et al. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 12, p. 871-874, 1989.

RODRIGUES, L. et al. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus strains*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 2, p. 109-116, 2006.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, L. et al. The effect of the presence of biosurfactant on the permeation of pharmaceutical compounds through silicone membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 176, p. 456-461, 2019.

ROELANTS, S. L. K. W. et al. *Candida bombicola* as a platform organism for the production of tailor-made biomolecules. **Biotechnology and bioengineering**, v. 110, n. 9, p. 2494-2503, 2013.

ROCHA E SILVA, N. M. P. et al. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 132-139, 2014.

RUBIO-RIBEAUX, D. 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, n. 23, p. 981-991, 2017.

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

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 34–38, 2014.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 729-734, 2007.

SANTA ANNA, L. M. et al. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.

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 Biochemistry**, 2017.

SANTOS, D. K. F. et al. *Candida lipolytica* UCP0988 biosurfactant: potential as a bioremediation agent and in formulating a commercial related product. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 767, 2017.

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, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.401-430, 2016.

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. 51, n. 2, p. 1-10, 2018.

SANTOS, E. M. S. et al. Formulation of the Biosurfactant Produced by *Candida Sphaerica* for Application as a Bioremediation Agent. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 307-312, 2019.

SARUBBO, L. A. et al. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, p. 707-723, 2015.

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, n. 1, p. 68-73, 2007.

SARUBBO, L.A. et al. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 59-67, 2001.

SARUBBO, A. L.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 0-0, 2006.

SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadian journal of microbiology**, v. 45, n. 5, p. 423-426, 1999.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. **Biotechnology Reports**, v. 11, p. 27–35, 2016.

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

SILVA, R. et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523-12542, 2014.

SITOHY, M. Z. et al. Bioconversion of soy processing waste for production of surfactants. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 24, p. 2811-2821, 2010.

SOBRINHO, B. S. H. et al. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 4-4, 2013.

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

Lira, I. R. A. S. Produção e Aplicação de Biossurfactantes para uso em Molhos Para Salada.

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

SOUZA, K. S. T. et al. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, p. 373–382, 2017.

THANIYAVARN, J. et al. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 72, n. 8, p. 2061-2068, 2008.

WILLIAMS, W.; TRINDADE, M. T.C. Functional Metagenomics: Tools and Applications. **Springer International Publishing AG**, T.C. Charles, M. R. Liles, A. Sessitsch (eds.), 253 p., 2017.

YULIANI, H. et al. Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. **Energy Procedia**, v. 153, p. 274-278, 2018.

ZOUARI, R.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI-AYDI, D. Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production under solid-state fermentation using by-products of a traditional olive mill factory. **Achievements in the Life Sciences**, v. 8, n. 2, p. 162-169, 2014.

CAPÍTULO II

Artigo submetido para publicação na Revista Journal of Biotechnology

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO BIOSURFACTANTE
PRODUZIDO POR CANDIDA GUILLIERMONDII E APLICAÇÃO EM EMULSÃO TIPO
MAIONESE**

Isabela Regina Alvares da Silva Lira^{a,e}; Emília Mendes da Silva Santos^{a,e}; Jenyffer Medeiros Campos Guerra^b; Hugo Moraes Meira^{c,e}; Raquel Diniz Rufino^{d,e}; Leonie Asfora Sarubbo^{c,e}; Juliana Moura Luna^{c,e}

^aMestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil

^bUniversidade Federal de Pernambuco. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, CEP: 50670-901

^cUniversidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil

^dDocente da Faculdade de Integração do Sertão (FIS), Rua João Luiz Melo, 2110, Tancredo Neves, Serra Talhada, PE, CEP: 56909-205

^eInstituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Rua Joaquim de Brito, n.216, Boa Vista, CEP: 50070-280, Recife, Pernambuco, Brasil

Corresponding author. Tel.: +55 81 21194084; fax: +55 81 21194000. E-mail address: Juliana.luna@unicap.br

RESUMO

O rápido desenvolvimento da biotecnologia e o aumento da consciência ambiental entre os produtores e consumidores estão colocando os produtos biológicos na preferência do mercado. Devido suas propriedades físico-químicas, o uso de biossurfactantes fazem deles um grupo atrativo de compostos com uso potencial em uma variedade de aplicações industriais e biotecnológicas, como aditivos em alimentos, cosméticos e detergentes. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo a selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes a partir de duas espécies de *Candidas* (*C. guilliermondii* UCP0992 e *C. lipolytica* UCP0998) cultivadas em diferentes fontes de carbono (glicose, melaço de cana e óleo residual de fritura) e nitrogênio (extrato de levedura, ureia e milhocina) e produzir biossurfactante com propriedades emulsificantes para aplicação como aditivo em sistemas alimentares. Após a seleção do micro-organismo e do meio de produção, foram avaliadas a curva de crescimento e de produção do biossurfactante e estudadas as propriedades do biopolímero obtido, quanto à toxicidade usando o microcrustáceo *Artemia salina*, sementes de vegetais e *da cebola* (*Allium cepa*), como bioindicadores. Em seguida, análises por Cromatografia Gasosa (GC), Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram conduzidas para a caracterização estrutural da biomolécula, bem como a composição físico-química. Sete formulações diferentes de maionese foram preparadas e testadas quanto à estabilidade com a adição de goma guar e biossurfactante isolado e avaliadas após 30 dias de refrigeração quanto à separação de fases e ao crescimento de patógenos. De acordo com os resultados obtidos foi observado que a *Candida guilliermondii* cultivada em meio 5,0% de melaço, 5,0% de milhocina e 5,0% do óleo de fritura residual foi selecionado como o melhor produtor de biossurfactante, apresentando uma redução da tensão superficial da água de 71 mN/m para de 28mN/m e um rendimento de 21g/L com uma Concentração Micelar Crítica de 0,7 g/L. O biossurfactante isolado não apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, *Allium cepa* e nem as sementes de hortaliças testadas. O biossurfactante apresentou natureza glicolípida. Todas as maioneses analisadas mantiveram-se estáveis, com ausência de micro-organismos patogênicos. Além disso, o uso do biossurfactante a 0,5% associado a goma guar demonstrou excelente performance nas formulações de molho tipo maionese. O biossurfactante isolado a partir de *C. guilliermondii* apresentou potencial como bioemulsificante para aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chaves: Biotensoativos, Resíduos agroindustriais, Bioemulsificantes.

1. INTRODUÇÃO

Na era da globalização, muitas indústrias clássicas em busca de inovação, inserem cada vez mais a biotecnologia como um desafio, permitindo diversas oportunidades de pesquisas sem alterar a produtividade (CAMPOS et al., 2016). Neste contexto, surfactantes produzidos biologicamente - biossurfactantes - são uma opção atraente em vez de contrapartes químicas. Biossurfactantes têm várias vantagens sobre os surfactantes químicos, podem ser produzidos a partir de resíduos, são biodegradáveis, atuam sob ampla gama de condições ambientais e as condições de toxicidade comparativamente menor (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018), visto que a procura está cada vez maior por produtos alternativos que minimizem os impactos ambientais (BRUMANO, 2017). Desta forma, destacam-se os aditivos naturais produzidos por micro-organismos e conhecidos como bioemulsificantes, que são surfactantes com excelentes propriedades emulsificantes (CAMPOS et al., 2014).

O uso de bioemulsificantes na indústria de alimentos é conferido às propriedades emulsificantes, espumantes, umectantes e solubilizantes, ou seja, podem ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, no controle da aglomeração de glóbulos de gordura, na estabilização de sistemas aerados e para melhorar a consistência de produtos gordurosos (PACWA-PLOCINICZAC et al., 2011). A emulsificação é especialmente muito útil na indústria de alimentos e são utilizados há muito tempo, devido a sua capacidade de formar emulsões estáveis, melhorando a textura e cremosidade de produtos lácteos (CAMPOS et al., 2015).

Entre as espécies de micro-organismos produtores de bioemulsificantes, as leveduras do gênero *Candida* têm sido sugeridas em função de seu uso benéfico em alimentos (BOURDICHON et al., 2012). Uma grande vantagem do uso de leveduras está o status GRAS (*Generally Regarded as Safe*), os quais não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, permitindo sua utilização na indústria e alimentos (CAMPOS et al., 2014; RUBIO-RIBEAUX et al., 2017).

Um bioemulsificante produzido por *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (KIM et al., 2000). Existem pesquisas relacionadas à produção de bioemulsificantes a partir de substratos oleosos regionais ou glicose com *C. lipolytica* (SANTOS et al., 2013). Já *C. bombicola* e a *C. lipolytica* estão entre as leveduras mais comumente estudadas para a produção de biossurfactantes (SANTOS et al., 2017).

Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi selecionar o meio de produção e o micro-organismo produtor de biossurfactante, com propriedades emulsificantes, caracterização química e avaliar a toxicidade para aplicação como aditivo em sistemas alimentares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismos

Duas espécies de *Candidas* (*C. guilliermondii* UCP 0992 e *C. lipolytica* UCP 0988) foram inicialmente testadas como produtoras de biossurfactantes, ambas pertencentes ao Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco.

2.2. Meio de Manutenção

A manutenção das leveduras foi realizada a 5°C em meio Yeast Mold Agar (YMA), com a seguinte composição (p/v): extrato de levedura (0.3%), extrato de malte (0.3%), triptona (0.5%), D-glicose (1%) e ágar (5%), dissolvidos em água destilada (100 mL). Sendo realizados mensalmente repiques para manter a viabilidade celular.

2.3. Meio de crescimento do inóculo

Para o crescimento do inóculo, foi utilizado o meio Yeast Mold Broth (YMB), com a seguinte composição (p/v): extrato de levedura (0.3%), extrato de malte (0.3%), triptona (0.5%), D-glicose (1%), de mesma composição do meio YMA, com exceção do Agar, sendo todos os componentes solubilizados em água destilada e o meio esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C.

2.4. Preparação do inóculo

Os inóculos foram padronizados transferindo-se as culturas para um tubo contendo o meio YMA, a fim de se obter uma cultura jovem. Em seguida, a amostra foi transferida para frascos contendo 50mL do meio YMB, sendo então incubados sob agitação de 200rpm a 28°C, durante 24 horas. Após este período, foram realizadas contagens das células em câmara de Neubauer, até se obter a concentração final de células desejada (10^8 células/mL).

2.5. Meios de Produção de biossurfactante

Diferentes meios foram testados para a produção de biossurfactantes: A) 5,0% de glicose, 0,1% de extrato de levedura, 0,1% de uréia e 5,0% do óleo de fritura (residual); B) 5,0 % de melaço, 0,1% de extrato de levedura, 0,1% de uréia e 5,0% do óleo de fritura (residual); C) 5,0% de melaço, 5,0% de milhocina e 5,0% do óleo de fritura (residual)e D) 2,5% de melaço, 2,0% de milhocina e 2,5% de óleo de fritura (residual).

2.6. Produção do biossurfactante

As fermentações para a produção do biossurfactante foram realizadas em frascos de Erlenmeyer com 1000 mL de capacidade contendo 500 mL do meio de produção e incubados com a suspensão celular de 10^6 células/mL. Após adição dos inóculos, os meios foram mantidos sob agitação orbital 200 rpm, durante 144 horas, à temperatura de 28°C. Após o período de incubação, os meios foram submetidos à centrifugação sob agitação de 4500 rpm durante 20 minutos para obtenção do líquido metabólico (livre de biomassa), onde foram coletadas alíquotas após a fermentação para determinação da tensão superficial, pH e rendimento em biossurfactante e a biomassa foi usada para determinação da curva de crescimento celular.

2.8. Curva de Crescimento e produção do biossurfactante

A partir do meio previamente estabelecido, alíquotas foram coletadas nos intervalos de 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120 e 144 horas ao longo da fermentação e submetidas à filtração, seguida por centrifugação (4500rpm e 9 ° C por 15 min), em seguida, líquidos metabólicos livres de células foram usados para a determinação da tensão superficial, pH e rendimento. Para determinação da biomassa por peso seco, 50 mL da cultura foram inicialmente centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após centrifugação, a biomassa foi secada em estufa a 105 °C por 24 horas e pesada.

2.8. Determinação da tensão superficial

A tensão superficial do biossurfactante foi medida no líquido metabólico com auxílio de um tensiômetro automático KSV Sigma 70 (Finland) utilizando-se a técnica do anel de NUOY.

2.9. Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, as amostras foram centrifugadas a 4500rpm durante 15 minutos e, em seguida, analisadas segundo a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg (1987). A atividade do emulsificante foi medida adicionando 2 ml do líquido metabólico mais 2 ml de óleos (milho, soja, girassol e motor) e agitar em vórtex em alta velocidade por 1 min. As medições foram realizadas após 24 h. O índice de emulsão (E24) é a altura da camada de emulsão, dividida pela altura total, multiplicada por 100.

2.10. Isolamento do biossurfactante

Foram testados dois diferentes métodos de extração para o isolamento do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii*.

O método desenvolvido em laboratório para extração por Silva et al., (2014) foi utilizando acetato de etila, a partir do líquido metabólico bruto com o meio não centrifugado, na proporção 1:4, repetindo por duas vezes. Em seguida, a fase orgânica foi submetida à centrifugação (4500rpm por 20 minutos) e posterior filtração. O filtrado foi transferido novamente para o funil de separação e solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) foi adicionada para separar a fase aquosa restante. A fase orgânica foi transferida para um becker e foi colocada para secar em chapa aquecedora à temperatura de 60°. Após isso foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) e acetona (C₃H₆O), até a formação de grânulos, sendo filtrada em papel de filtro e seca à temperatura de 50 °C.

E para o método por adição de metanol, após 144 h de cultura *C. guilliermondii*, o caldo foi centrifugado a 2000rpm por 20 min para remoção das células e submetido ao processo de extração. O pH foi ajustado para 2 com solução de HCl 6,0 M e precipitado com 2 volumes de metanol. Após repouso por 24 horas a -15°C, as amostras foram centrifugadas a 4000g e 28°C por 30 min, lavadas duas vezes com metanol resfriado, secas a 37°C por 48 horas e mantidas em dessecador até atingir um peso constante. O rendimento do produto isolado foi calculado como g /L (LUNA et al., 2013).

2.11. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Para obtenção da CMC, inicialmente foi pesado 0,1g do biossurfactante isolado, sendo diluídos a uma concentração inicial de 5g/L e realizada sucessivas diluições com

água destilada, sendo posteriormente quantificadas as tensões superficiais das respectivas diluições com auxílio do anel de NOUY.

2.12. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O biossurfactante extraído foi redissolvido em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e os respectivos espectros de ^1H RMN foram registados em $25\text{ }^\circ\text{C}$ utilizando um espectrômetro Agilent 300Mz que opera a 300,13 MHz. Deslocamentos químicos (δ) são dadas na escala de ppm em relação ao tetrametilsilano (TMS).

2.13. Espectroscopia de infravermelho

O biossurfactante isolado de *Candida guilliermondii* foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O espectro FTIR 400 Perkin Elmer, com uma resolução de 4 cm^{-1} , na região de 400 a 4000 números de onda (cm^{-1}).

2.14. Cromatografia gasosa (GC)

A amostra do biossurfactante foi analisada no cromatógrafo a gás (Hewlett Packard modelo HP 5890 Série II) com a temperatura do injetor a $220\text{ }^\circ\text{C}$. A separação cromatográfica foi efetuada com uma coluna DB-5 (30 m x 0,32mm x 0,5 μm) detector de ionização de chama (FID) a $290\text{ }^\circ\text{C}$ e nitrogênio como gás de arraste. A temperatura inicial foi programada em $60\text{ }^\circ\text{C}$ com taxa de $7^\circ\text{C}/\text{min}$ e temperatura final de $200\text{ }^\circ\text{C}$. Injetou-se 1 μL da amostra usando-se hexano como solvente.

2.15. Teste de fitotoxicidade

A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada em ensaio estático através da germinação da semente e do crescimento da raiz de repolho (*Brassica oleracea*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e maxixe (*Cucumis anguria*), de acordo com Tiquia et al. (1996). Soluções teste do biossurfactante isolado foram preparadas em água destilada em diferentes concentrações (1/2xCMC, 1xCMC e 2xCMC). Após cinco dias de incubação no escuro, a germinação das sementes, o crescimento da raiz ($\geq 5\text{ mm}$) e o índice de germinação (IG) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\text{Germinação relativa da semente (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de sementes germinadas no extrato}}{\text{n}^\circ \text{ de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

Comprimento relativo da raiz (%) = $\frac{\text{m\u00e9dia do comprimento da raiz no extrato}}{\text{m\u00e9dia do comprimento da raiz no controle}} \times 100$

\u00cdndice de Germina\u00e7\u00e3o = $\frac{[(\% \text{ germina\u00e7\u00e3o da semente}) \times (\% \text{ crescimento da raiz})]}{100\%}$

2.16. Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade foi realizado com o biossurfactante isolado utilizando-se \u00e1gua do mar e o microcrust\u00e1ceo *Artemia salina* como indicador de toxicidade. Ovos de camar\u00e3o de salmoura foram obtidos em uma loja local. As larvas foram utilizadas no prazo de 1 dia ap\u00f3s a eclos\u00e3o. Ap\u00f3s as dilui\u00e7\u00f5es de uma solu\u00e7\u00e3o de biossurfactante a 1/2 CMC, CMC e 2x CMC (0,35, 0,7 e 1,4 g/l) em \u00e1gua do mar, os ensaios foram realizados em b\u00e9quer de 50 ml de capacidade, contendo 10 larvas de camar\u00e3o de salmoura em 20 ml de \u00e1gua salgada. As larvas de salmoura em cada b\u00e9quer foram testadas usando 20 ml por concentra\u00e7\u00e3o de solu\u00e7\u00e3o de biossurfactante. Eles foram observados por 24 horas para calcular a mortalidade. A concentra\u00e7\u00e3o do limiar de toxicidade, expressa como concentra\u00e7\u00e3o de biossurfactante por 100 ml de \u00e1gua do mar, foi definida como a menor concentra\u00e7\u00e3o que matou todos os camar\u00f5es de salmoura dentro de 24 h. Cada teste foi realizado em duplicata, e \u00e1gua do mar foi utilizada como controle.

2.17. Teste de fitotoxicidade com cebola (*Allium cepa* L.)

A toxicidade do biossurfactante isolado foi avaliada utilizando-se cebola (*Allium cepa* L.) como indicador. Solu\u00e7\u00f5es do biossurfactante em diferentes concentra\u00e7\u00f5es 1/2xCMC, 1xCMC e 2xCMC (0,35, 0,7 e 1,4 g/L) foram utilizadas. O l\u00edquido metab\u00f3lico livre de c\u00e9lulas tamb\u00e9m foi testado. O teste de inibi\u00e7\u00e3o do crescimento radicular da cebola foi conduzido conforme Jardim, 2004 com algumas modifica\u00e7\u00f5es. Os testes foram realizados em triplicata.

2.18. Aplica\u00e7\u00e3o de biossurfactante como aditivo alimentar

A propriedade emulsificante do biossurfactante foi testada na formula\u00e7\u00e3o de sete tipos diferentes de molhos (tipo maionese) produzidos a partir de amostras comerciais dos seguintes ingredientes (p/v): 40% de \u00f3leo de girassol, 40,3% de \u00e1gua, 10% de vinagre, 4% de ovo em p\u00f3 (Naturivos LTDA, Brasil), 2% de a\u00e7\u00facar e 2% de sal, 1% de farinha de mostarda e 0,2% de goma guar, 0,5% de amido instant\u00e2neo (Unilever LTDA,

Brasil), variando a concentração (p/v) entre 0,2% e 0,8% do biossurfactante isolado. Os molhos obtidos foram então armazenados a 4°C durante um mês para avaliação visual, pH e viscosidade (SHEPHERD et al., 1995; TORABIZADEH et al., 1996). Todos os testes foram realizados em duplicata.

Após esta etapa, foi selecionada a concentração de biossurfactante que apresentou melhor resultado (0,2% e 0,8% p/v), e então foram realizadas formulações novas com os ingredientes descritos anteriormente variando-as conforme apresentado na Tabela 1. Os insumos foram misturados no mixer por um minuto à temperatura ambiente e as maionese armazenadas a 8 °C por um mês para a inspeção visual, pH, viscosidade, avaliados semanalmente quanto à estabilidade da emulsão e qualidade microbiológica.

Inserir Tabela 1

2.19. Determinação da viscosidade dos molhos tipos maionese

A viscosidade da formulação do molho tipo maionese, utilizado como aditivos alimentares em diferentes concentrações, foi determinada à 22 °C em viscosímetro (Modelo Lamy Rheology Instruments) (SHEPHERD; ROCKEY; SUTHERLAND, 1995).

2.20. Análises microbiológicas

As amostras finais dos molhos foram analisadas de acordo com os micro-organismos citados na RDC 12/2001 (BRASIL, 2001).

3. Resultados e Discussão

3.1. Seleção de meio de cultura e micro-organismo produtor de biossurfactante

Uma das propriedades mais importantes de um surfactante é sua capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial por meio da formação de micelas. A tensão superficial é considerada como a força de atração entre as moléculas de um líquido (LUNA et al., 2013; SANTOS et al., 2016). Quanto maior a concentração de um surfactante no meio, maior a formação de micelas e menores as tensões superficial e interfacial.

Sendo testadas duas linhagens de *Candida*, cultivadas em diferentes meios de produção, foram medidas as tensões superficiais dos ensaios e observou-se que os

biossurfactantes da *C. lipolytica* (meio de produção) apresentaram tensões superficiais entre 33 e 52 mN/m. Por outro lado, o biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* cultivada em 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual apresentou uma a tensão superficial 28,6mN/m, sendo esta a condição selecionada (Tabela 2). Luna et al. (2016) e Sarubbo et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes para a tensão superficial, em torno de 27 e 32 mN/m respectivamente.

Avaliando-se os resultados das tensões para os biossurfactantes encontrados, o produzido por *C. guilliermondii* demonstrou uma excelente capacidade de redução da tensão superficial. Segundo Luna et al. (2013), surfactantes que são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m são considerados bons agentes tensoativos, de modo que a *C. lipolytica* apresentou uma boa capacidade de redução da tensão superficial (33,05 mN/m) embora a da *C. Guilliermondii* apresente melhores resultados.

Comparando-se o valor de tensão superficial do meio obtido com *C. guilliermondii*, com os valores apresentados por Almeida et al. (2017) utilizando-se a *C. tropicalis* em um meio contendo 2,5% de melaço de cana-de-açúcar, 2,5% de óleo de fritura e 2,5% de licor de milho, os valores se assemelham ao nosso, $34,12 \pm 0,07$ mN.m⁻¹ (biorreator 2 L) e $35,60 \pm 0,05$ mN.m⁻¹ (biorreator 50 L). No entanto, para Rubio-Ribeaux et al. (2017), biossurfactante produzido por *C. tropicalis* apresentou grande capacidade de redução da tensão superficial, uma vez que a tensão superficial da água reduziu de 70 para 28,5 mN/m. Entretanto, o *C. tropicalis* teve uma maior capacidade de reduzir a tensão superficial em comparação com biossurfactantes de *C. glabrata* (31 mN/m) e *C. lipolytica* (32 mN/m).

Inserir Tabela 2

3.2 Curvas de crescimento e de produção de biossurfactante

A Figura 1 mostra a cinética de produção de biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* UCP 0996 em meio contendo 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.

Inserir Figura 1

A fase de crescimento exponencial foi observada a partir das 4h de crescimento e foi prolongada até 36 horas, que a partir daí apresentou uma fase estacionária até 100h, uma diauxia, que é um período de crescimento bifásico, quando os micro-organismos têm duas fontes de carbono diferente e as utiliza de forma sequencial, após isso, voltando a um período de crescimento, o qual se obteve produção máxima de biomassa (8,0 g/L) após 144h de crescimento.

O início da fase estacionária de crescimento e produção de biossurfactante ocorreu em 36h. O maior rendimento de biossurfactante (21 g/l) ocorreu ao final do cultivo. Os resultados mostram que a produção de biossurfactante ocorreu desde o início da fase exponencial e durante a fase estacionária.

Simultaneamente, a tensão superficial começou a reduzir, indicando que os novos substratos promovem a biossíntese de compostos essenciais para o crescimento microbiano e a produção de biomoléculas com propriedades de superfície ativa. A tensão superficial reduziu de 45 mN/m para 28 mN/m durante os estágios da curva de crescimento, indicando excelentes propriedades tensoativas. Enquanto que o pH apresentou pequena alteração durante o período de cultivo de 5,0 – 5,8, indicando que o micro-organismo se adapta ao novo substrato e promove a biossíntese de compostos essenciais ao crescimento, produzindo efeitos positivos na redução da tensão superficial e na estabilidade da produção.

Estudos demonstraram que a acidez média está relacionada com uma menor produção de surfactante. Considerando que o pH não foi controlado neste estudo e que foi apenas ligeiramente alterado durante o cultivo, é possível que esse comportamento contribua para a obtenção de altos rendimentos em biossurfactantes (LUNA et al., 2013; RUFINO et al., 2014; CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014).

De acordo com a literatura, os biossurfactantes produzidos por leveduras demonstraram capacidade de reduzir a tensão superficial para valores em torno de 35,0 mN/m. Estudos vem descrevendo valores semelhantes aos obtidos com bactérias, como o resultados obtidos nos estudos, com biossurfactante produzido por *C. sphaerica* (25 mN/m) (LUNA et al, 2011; 2013), com o produzido por *C. lipolytica* (25 mN/m) (RUFINO et al, 2014), com a *C. tropicalis* (29 mN/m) (ALMEIDA et al., 2017) e com a *C. utilis* (32 mN/m) (CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2019).

3.3. Índice de Emulsificação

A capacidade de emulsificação tem sido frequentemente utilizada como técnica adequada na detecção de compostos tensoativos, pois correlaciona-se com a concentração de biossurfactante. No entanto, esta propriedade funcional também tem sido usada como uma poderosa ferramenta de medição para determinar a capacidade do biossurfactante de formar e estabilizar emulsões de diferentes substratos hidrofóbicos, considerando suas possíveis aplicações práticas em várias áreas. Além de reduzir as tensões superficiais e interfaciais, os biossurfactantes geralmente exibem uma capacidade emulsionante (RUBIO-RIBEAUX et al., 2017).

A capacidade de estabilização da emulsão de um composto tensoativo é avaliada pela sua capacidade para manter pelo menos 50% do volume original da emulsão durante 24 h após a sua formação. Considerando este critério, o biossurfactante produzido por *C. guilliermondii*, após 24 horas, foi capaz de manter a estabilidade das emulsões na condição selecionada, demonstrando habilidade em formar emulsões estáveis para óleo de milho (50%), óleo de girassol (54%) e para o óleo de soja (48%), e no óleo de motor (71,4%) apresentando um bom resultado, tendo em vista novos estudos e as possíveis aplicações no meio ambiente.

Quanto maior o percentual de emulsificação, melhor a atividade de emulsificante do biossurfactante com o composto hidrofóbico. Ao comparar com os valores apresentados na literatura, Campos et al. (2014) obtiveram índices de emulsificação com o biossurfactante produzido por *C. utilis*, utilizando-se meio mineral suplementado com 5% de óleo de fritura de canola e 6% glicose, de 43%, 73%, 73%, 33% e 30% para os óleos de soja, girassol, milho, arroz e motor, respectivamente. Luna et al. (2015) utilizando-se a *C. sphaerica* em meio suplementado com 9,0% de resíduo de óleo de soja e 9,0% de milhocina, apresentaram valores com o óleo de motor, óleo de milho e óleo de soja, respectivamente, 78%, 21% e 24%.

Conforme Campos et al. (2015), a estabilidade destas emulsões é avaliada como indicador da atividade superficial, não obstante a capacidade de permanecer estável não esteja sempre associada a uma redução na tensão superficial. Apesar de não estar ainda esclarecida a função fisiológica dos biossurfactantes, é conhecida e apresentada por diversos autores a capacidade de solubilizar e emulsionar diferentes compostos hidrofóbicos.

3.4. Métodos de extração e rendimento do biossurfactante

Foram testadas duas metodologias de extração do biossurfactante selecionado. De acordo com os resultados obtidos, constatou-se que o melhor rendimento em biossurfactante foi de 21g/L, utilizando a metodologia de acetato de etila.

Utilizando-se acetato de etila como solvente de extração, foi possível obter o biossurfactante na forma oleosa, com coloração mais clara que o método com metanol, que foi oleoso e granuloso, porém mais escuro.

Com relação à viabilidade, o método desenvolvido utilizando acetato de etila, apresenta-se como a melhor escolha, uma vez que requer menor volume de solvente, sem necessidade das etapas iniciais de centrifugação e filtração, obtendo-se um extrato oleoso e límpido, considerado como o mais adequado para aplicação posterior em formulações alimentícias.

3.5. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Um surfactante tem a capacidade de reduzir a tensão superficial (ar/água). Essa redução é proporcional à concentração do biossurfactante na solução, até atingir a Concentração Micelar Crítica (DALVIN, 2012). De acordo com, a CMC do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* foi aproximadamente 25 mN/m e uma CMC de 0,08%. Esta tensão foi um valor similar ao valor comparado com a faixa considerada promissora para a produção de um biossurfactante, que está entre 28 a 35 mN/m (SANTOS et al., 2016).

A Concentração Micelar Crítica (CMC) é definida como a concentração mínima de um biossurfactante necessária para produzir uma redução máxima da tensão superficial da água e iniciar a formação de micelas, sendo utilizada para medir a eficiência de um biossurfactante. Neste contexto, quando a concentração do biossurfactante isolado de *C. guilliermondii* foi aumentada, a tensão superficial da água diminuiu gradualmente de 72 para 28 mN/m com um CMC de 0,7%, e deste ponto crítico em diante, nenhuma diminuição adicional na tensão superficial foi observado quando a concentração de biossurfactante foi aumentada (Figura 2), indicando que a CMC foi atingida. Um bom surfactante deve apresentar alta eficiência e eficácia, em concentrações menores que 1 g/L.

De acordo com Santos et al. (2016) quanto menor a concentração do biossurfactante para atingir este fim, maior a sua eficiência, uma vez que, a CMC é atingida no momento em que um aumento adicional na concentração de biossurfactante não leva a uma redução adicional da tensão superficial. Enquanto as tensões superficiais e interfaciais influenciam na eficácia de um surfactante, o CMC reflete na eficiência do mesmo, variando de 0,001 a 5 g/L.

Inserir Figura 2

3.6. Teste de Fitotoxicidade

A toxicidade pode ser definida como a capacidade de uma substância causar um efeito prejudicial a um organismo vivo, que depende da concentração e das propriedades do produto químico ao qual o organismo está exposto e do tempo de exposição (SANTOS et al., 2016). A toxicidade do biossurfactante de *C. guilliermondii* em três espécies vegetais é mostrada na Tabela 3.

Inserir Tabela 3

O índice de germinação (IG), que combina medidas de germinação relativa de sementes e alongamento radicular relativo, foi utilizado para avaliar a toxicidade do biossurfactante para a *Brassica oleracea*, *Cucumis anguria* e *Solanum lycopersicum*. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que as soluções testadas não tiveram efeito inibitório na germinação de sementes, em especial na *Cucumis anguria* ou no alongamento radicular das hortaliças analisadas. Uma vez que, o valor do IG de 80% foi utilizado como indicador do desaparecimento da fitotoxicidade (MEYLHEUC et al., 2001). Além disso, o crescimento das folhas e o alongamento das raízes secundárias ocorreram sob todas as condições testadas.

O biossurfactante de *C. guilliermondii* foi testado em um bioensaio de curta duração, indicando a baixa toxicidade do biotensioativo produzido. Os bioensaios em plantas desempenham um papel importante, pois permitem prever o efeito de produtos químicos nos ecossistemas.

Resultados apresentados por Santos et al. (2016) indicaram que a germinação destes ocorreu mesmo na presença de altas concentrações do biossurfactante isolado.

No entanto, o líquido bruto apresentou efeitos inibitórios para as espécies vegetais (*Brassica oleracea var. botrytis* L., *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleracea var. capitata* L.).

De acordo com a literatura, a influência do pH e da concentração de extratos brutos são parâmetros que interferem diretamente na germinação, uma vez que os extratos podem ter substâncias como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, os quais podem causar a interferência dos metabólitos. Dessa forma, se caracteriza a não germinação das amostras, as quais foram adicionadas o líquido metabólico (livre de células), cujo o mesmo apresentou um pH de aproximadamente 5,0, de modo que, um pH ácido acarretará na diminuição do desenvolvimento da planta (NASCIMENTO et al., 2018; PACHECO et al., 2018).

3.7. Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

A *artemia salina*, é um organismo comumente utilizado na ecotoxicologia devido à sua simplicidade em relação ao manuseio laboratorial e seu curto ciclo de vida (MEYER et al. 1982). Após exposição ao biossurfactante ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2x CMC) por 24h, larvas de *Artemia salina*, as mesmas apresentaram taxa de sobrevivência de 100%. Semelhante aos resultados encontrados por Luna et al. (2013) e Rufino et al. (2014), que indicaram baixa toxicidade, nas condições testadas.

3.8. Teste de toxicidade com cebola (*Allium cepa* L.)

Plantas como cebola (*Allium cepa* L.) tem sido bastante utilizada em ensaios ecotoxicológicos, na avaliação da toxicidade de diversos compostos (Jardim, 2004). O parâmetro mais comumente analisado é a fitotoxicidade, onde se observam a inibição do crescimento da raiz ou a não germinação de suas sementes, quando expostas a uma substância poluente. É um teste rápido e de fácil execução, que tem como princípio determinar a qualidade ambiental (BENASSI, 2004).

Os resultados obtidos da toxicidade subaguda com *Allium cepa* foram avaliados por meio do ganho de peso das cebolas em água e nas concentrações do biossurfactante ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC, 1, 2xCMCg/L), além do crescimento da raiz.

Percebe-se que houve um ganho de peso em todas as amostras da CMC, em uma amostra do controle bem como na $\frac{1}{2}$ CMC e 2x CMC, uma média de 1,2 mg . Nas demais amostras, utilizando líquido metabólico, não ocorreram ganho de peso, que se

justifica devido ao fato de as cebolas perderem energia na autodefesa com relação ao biossurfactante. De acordo com Jardim (2004), o elevado nível de estresse e gastos com energia como mecanismos de autodefesa fazem com que as plantas tenham perda de peso.

Em relação ao crescimento da raiz das cebolas expostas, observou-se o crescimento das raízes nas amostras do controle, nas amostras da CMC, bem como nas amostras da $\frac{1}{2}$ CMC e 2xCMC, uma média de 0,5 cm. Em alguns pontos das condições testadas, o biossurfactante inibiu o crescimento das raízes, devido às alterações causadas pelo mesmo.

3.9. Análise Estrutural

Para elucidação da estrutura do biossurfactante, a análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi realizada, sendo os espectros de hidrogênio e carbono apresentados nas Figuras 3 e 4.

Inserir Figura 3

Inserir Figura 4

O espectro ^1H NMR (Figura 3), demonstrou três regiões bem definidas, sugerindo a presença de hidrogênio fechado aos grupos ácido carboxílico em 7–8 ppm, perto de ligações duplas em 5-6 ppm e carbonos alifáticos em 1 a 3 ppm. O ^{13}C NMR (Figura 4) confirma os resultados anteriores mostrando uma característica de ácido carboxílico em 180 ppm, ligações duplas entre 120 e 140 ppm e carbonos alifáticos na região de 10–40 ppm, os sinais de 70-80 ppm foram atribuídos ao sinal residual do solvente (clorofórmio). Esse resultado sugere que a biomolécula do surfactante é uma espécie de metabólito ácido carboxílico provavelmente ligado a carboidratos (ácido graxo simples), como descrito outros biossurfactantes produzidos por leveduras, que são glicolipídios.

Os resultados obtidos são semelhantes aos achados na literatura para a caracterização de biossurfactantes isolados de leveduras cultivadas em óleo diesel (CHANDRAN; DAS, et al, 2011). Espectros semelhantes foram publicados por Santos

et al. (2017), do qual obteve-se uma biomolécula surfactante com estrutura de ácido carboxílico a partir da levedura *Candida lipolytica*. Um outro estudo apresentou espectro de RMN com sinais semelhantes, no qual foi possível afirmar que a biomolécula possui uma estrutura glicolipídica, metabolizada a partir da levedura *Pichia sorbitophila* (BHATIA; SAHARAN, et al., 2016).

A Figura 5, mostra os espectros de FTIR obtidos para o biossurfactante isolado produzido por *C. guilliermondii*, onde o espectro infravermelho do biossurfactante apresentou absorvância, regiões de estiramento entre 1500 e 2000 cm^{-1} e 2500 e 3000 cm^{-1} , indicando a presença de possíveis grupos carbonila (C=O) e ligações simples entre carbonos (C–C), respectivamente. Em aproximadamente 1400 cm^{-1} , também foi observado estiramento referente à ligação dupla entre carbonos (C=C). Comparando-se os resultados obtidos com os espectros relatados na literatura, Santos et al. (2016) apresentaram espectro semelhante ao obtido com o produto de *C. guilliermondii* utilizando-se a levedura *C. lipolytica* cultivada em meio com 5% de gordura animal e 2,5% de licor de milho.

Inserir Figura 5

Inserir Figura 6

Já para o estudo da composição de ácidos graxos do biossurfactante isolado analisado por cromatografia gasosa revelou a presença de C16:0 (75,3%) como componente principal seguido de C18:1 (5%) e C17:0 (19,6%) em menor quantidade (Figura 6). Sendo assim, o biossurfactante estudado apresenta em sua composição lipídica diversos ácidos graxos com diferentes proporções, apresentando natureza glicolipídica.

3.10. Aplicação do biossurfactante como aditivo alimentar e formulação dos molhos tipo maionese

Por definição, uma emulsão é um sistema heterogêneo que consiste em pelo menos um líquido imiscível disperso em outro na forma de gotículas. A emulsificação desempenha um papel importante na consistência, textura, bem como na dispersão de

fases e solubilização de aromas na maioria dos produtos da indústria alimentícia. A função de um emulsionante é estabilizar a emulsão controlando o agrupamento de glóbulos e estabilizando os sistemas aerados (MNIF; GHRIBI, 2016).

Para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Brasil (2005), a maionese, é o produto cremoso em forma de emulsão estável, óleo em água, preparado a partir de óleo(s) vegetal(is), água e ovos podendo ser adicionado de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto.

De acordo com Campos et al. (2015), óleo de soja e óleo de girassol estão entre os mais comuns óleos vegetais usados na produção de maionese. O pó de mostarda possui propriedades funcionais, como emulsificante, ações estabilizadoras, aglutinantes, conservantes, antioxidantes, estabilizador e confere aroma ao produto. A adição de vinagre na maionese reduz o pH inibindo assim o crescimento de microrganismos patogênicos. O amido é frequentemente utilizado como texturizadores nos alimentos industriais, bem como estabilizar emulsões. O ovo, em especial a gema, é por natureza uma emulsão natural de óleo na água em combinação com proteínas, lecitinas e outros fosfolipídios, de modo que essa emulsão afeta a viscosidade e a força da emulsão final da maionese. No entanto, goma guar é utilizada como espessantes de aditivos alimentares.

Na indústria de alimentos são utilizados proteínas, carboidratos, gorduras e lipídeos, diversas combinações, resultando em diferentes tipos de emulsões (pequenas gotículas lipídicas dispersas dentro de um meio aquoso), sendo estas de difícil estabilização devido ao grande número de microestruturas complexas. Sendo assim, é necessária a utilização de alguns aditivos, no caso o biossurfactante, como os emulsificantes, especialmente em sistemas óleo-água (CAMPOS et al., 2016). O uso de biossurfactantes como emulsificantes se dá no processamento de matérias-primas, como no controle de gordura, aglomeração de glóbulos, estabilização de sistemas aerados e uma melhor consistência aos produtos que tem em sua base a gordura (SANTOS et al., 2016).

Ao avaliar o comportamento das emulsões em diferentes concentrações de biossurfactantes, todas as formulações avaliadas mantiveram-se estáveis durante o

período de armazenamento (refrigeração), não apresentando separação de fases (Tabela 4). Em relação aos valores de pH, todas apresentaram discreto aumento, diferentemente do encontrado por Kishk e Elsheshetawy (2013), onde o pH diminuiu de 4,3 para 3,5 após quatro semanas.

Inserir Tabela 4

Com relação à viscosidade, os valores permanecem constantes com pequenas variações entre as formulações testadas. A maionese são fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos e tixotrópicos, de alta consistência, rico conteúdo em óleos, cuja viscosidade diminui com o aumento da força aplicada, o que leva ao alinhamento das moléculas e diminuição do atrito viscoso. Ou seja, com o aumento da taxa de deformação (rotação em RPM), à uma temperatura constante, a viscosidade aparente diminui. Para Sato (2005), a maionese é caracterizada como fluido não-newtoniano pseudoplástico, pois houve um decréscimo na viscosidade, com o aumento da taxa de deformação.

Nestas formulações estudadas, o biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* se mostrou necessário para o processo de emulsificação e estabilização de emulsões, pois, após um mês de armazenamento refrigerado, as sete formulações, com diferentes concentrações de biossurfactante e goma guar foram avaliados quanto à sua consistência, apresentando resultados satisfatórios, conforme Figura 7. Todas as formulações, 0,2% - 0,8%, se mostraram com boa estabilidade da emulsão, firmeza e resistência ao corte, bem como ausência de dessoramento, devido à capacidade estabilizadora da goma e à ação emulsificante do biossurfactante. Assim, todas as formulações foram selecionadas para a análise microbiológica.

Inserir Figura 7

A Figura 8 mostra as diferentes formulações de maionese e o seu comportamento durante a avaliação de quatro semanas (um mês). O biossurfactante isolado de *C. guilliermondii* foi utilizado na concentração de 0,5% com a adição de 0,5% de goma guar e na formulação de seis diferentes maioneses (Tabela 1). Na primeira semana, as Formulações 1 e 2 apresentaram dessoramento como separação

de fases, sendo visível uma fase aquosa na base do recipiente. Já na segunda semana, a formulação 6 também apresentou separação aquosa, sendo importante a observação de que a adição do biossurfactante (formulação 6) não foi capaz de manter a emulsão por 30 dias, devido a dificuldade em estabilizar, em virtude ao grande número de microestruturas constituídas por combinações de proteínas, carboidratos e lipídios encontrado no alimento. As demais formulações, exceto a Formulação 5, foram observadas consistência cremosa, textura firme, bem como melhor resistência ao corte.

Inserir Figura 8

Essas maioneses referentes à Figura 8, apresentaram uma variação de pH entre 3,3 e 4,5 e deodoramento nas formulações 1, 2 e 6 após o período de armazenamento sob refrigeração. No entanto, as formulações 3, 4 e 5 permaneceram estáveis destacando-se a formulação 5, como a mais cremosa e estável, com boa consistência e textura. Os dados encontrados de viscosidade corroboram com o aspecto visual das formulações 1, 2 e 6 apresentando valores de viscosidade de 214.6 mPa.S, 172 mPa.S e 185.4 mPa.S, respectivamente, pois devido à taxa de deformação, à uma temperatura constante, a viscosidade aparente diminui. Para a formulação 5 (goma + biossurfactante a 0,5%) uma viscosidade de 1860 mPa.S. foi encontrada, já as demais formulações 3 e 4, com algum grau de desestabilização, observaram-se viscosidades de 1525 mPa.S e 1627 mPa.S, respectivamente. Sendo assim, o uso associado de goma com biossurfactante apresentou melhor aspecto visual, textura e consistência frente às demais combinações testadas.

Diferente do que foi exposto no presente estudo, existem poucos relatos na literatura com a aplicação de um biossurfactante na formulação de novos alimentos. Contudo, estudos semelhantes ao investigado, como em, Shepherd et al. (1995) usou com sucesso um composto rico em carboidratos extracelular de *C. utilis* como agente emulsificante em formulações de molho para salada, bem como, em Campos et al. (2014; 2015; 2016; 2019), em que produziu um biossurfactante com potencial emulsificante utilizando a *C. utilis*, na formulação de uma maionese. Bem como, um outro estudo relatou o uso de biossurfactantes em emulsões e maionese (SZCZUREK et al. 2013).

A literatura também descreve outros biossurfactantes produzidos por leveduras e sua aplicação na indústria com propriedades emulsificantes, tal como, o uso por outros micro-organismos (CIRIGLIANO et al. 1984; BRENNAN et al. 2006; NITSCHKE et al. 2007; BARROS et al. 2008; KIELISZEK et al. 2017; MONTEIRO et al. 2010).

3.11. Análises microbiológicas

A análise microbiológica das formulações foi realizada de acordo com a RDC 12/2001 (BRASIL, 2001), onde estão determinados os tipos de análises laboratoriais e os limites de contagem de microrganismos para os resultados das avaliações microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano. Todas as amostras contendo as variadas concentrações de biossurfactante (0,2% à 0,8%), não apresentaram contaminação microbiológica. As formulações mostraram ausência *Salmonella* sp./25 g, níveis de *Estafilococos aureus* abaixo de 10 UFC/mL e menos de 3,0 NMP/mL de Coliformes totais a 45° C/g, sendo o intervalo de confiança superior a 95%. Todas as etapas da produção foram observadas e monitoradas, seguindo as boas práticas de fabricação de um produto microbiologicamente seguro. Resultados semelhantes também foram obtidos por Campos; Stamford; Sarubbo (2019), onde, as amostras contendo biossurfactante 0,7% (p/v), com goma guar, não apresentaram nenhuma contaminação quanto aos mesmos patógenos estudados.

CONCLUSÃO

O novo biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* em um meio de baixo custo, contendo resíduos de óleo de fritura, melão e milhocina, demonstrou propriedades promissoras em termos de capacidade de reduzir a tensão superficial, capacidade emulsificante além de apresentar baixa toxicidade, sendo caracterizado como um composto glicolípido. Além disso, o uso do biossurfactante agregado com uma goma demonstrou excelente performance nas formulações de molho tipo maionese, apresentando potencial de aplicação em alimentos e emulsões, podendo ser produzido e utilizado como um novo ingrediente promissor na indústria de alimentos.

Agradecimentos

O presente estudo foi financiado pelas seguintes agências de fomento brasileiras: *Fundação Pernambucana de Assistência à Ciência e Tecnologia* (FACEPE), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), *Conselho Nacional de Eletrotécnica* e *Agência de Energia Elétrica*. Os autores agradecem ao Centro de Ciência e Tecnologia da *Universidade Católica de Pernambuco*, Brasil.

REFERÊNCIAS

- Almeida, D.G., da Silva, R. de C.F.S., Luna, J.M., Rufino, R.D., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2017. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. *Front. Microbiol.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00157>
- AOAC (2002) Official methods of analysis of AOAC international, 16th edn, Vols I and II. AOAC International, Gaithersburg, MD
- Barros, F.F.C., De Quadros, C.P., Pastore, G.M., 2008. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Cienc. e Tecnol. Aliment.* 28, 979–985.
- Benassi, J.C., 2004. Florianópolis 2004.
- Bhatia, V., Saharan, B.S., 2016. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* , 2016 , 8 (7) : 357-367 Research Article Isolation and partial Structural & Functional Characterization of Glycolipid Biosurfactant producing *Pichia sorbitophila* WG1 from Rotten Grapes 8, 357–367.
- Bligh and Dyer, 1959. *Citation Classics* 37, 911–917.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelaars, S., Hansen, E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p.45-53.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 276, de 26 de setembro de 2005. Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 26 set. 2005. Seção 1, p.376-379.
- Brumano, L.P., Antunes, F.A.F., Souto, S.G., dos Santos, J.C., Venus, J., Schneider, R., da Silva, S.S., 2017. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. *Bioresour. Technol.* 243, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.088>

- Campos, J.M., Stamford, T.L.M., Rufino, R.D., Luna, J.M., Stamford, T.C.M., Sarubbo, L.A., 2015. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicol. Reports* 2, 1164–1170. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.08.009>
- Campos, J.M., Stamford, T.L.M., Sarubbo, L.A., 2019. Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. *Biodegradation* 8. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09877-8>
- Campos, J.M., Stamford, T.L.M., Sarubbo, L.A., 2014. Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 3234–3252. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0761-1>
- Carla, A., Sato, K., 2005. Influência do tamanho de partículas no comportamento reológico da polpa de jabuticaba.
- Chandran, P., Das, N., 2011. Characterization of sophorolipid biosurfactant. *Int. J. Sci. Nat.* 2, 63–71.
- Cirigliano, M.C., Carman, G.M., 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 747–750.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-active agents from two *Bacillus species*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 224–229.
- Daltin, D., 2012. Tensoativos Química, propriedades e aplicações., Tensoativos Química, propriedades e aplicações. 2012, São Paulo - Brasil.
- Daylin, R.-R., Rosileide, F. da S.A., Goretti, S. da S., Rodrigo, A. de H., Milagre, A.P., Patricia, N., Jose, C.V.J., Maria, A. de R.-S., G., M.C.-T., 2017. Promising biosurfactant produced by a new *Candida tropicalis* UCP 1613 strain using substrates from renewable-resources. *African J. Microbiol. Res.* 11, 981–991. <https://doi.org/10.5897/ajmr2017.8486>
- Geetha, S.J., Banat, I.M., Joshi, S.J., 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 14, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>
- Ghribi, D., 2016. Glycolipid biosurfactants : main properties and potential applications in agriculture Inès Mnif a * and Dhouha Ghribi a , b. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>
- Jardim, G.G.M., 2004. Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do rio Corumbataí, SP. Diss. Mestr. 1, 138.
- Kieliszek, M., Kot, A.M., Obel, A.B., 2017. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry : A review 1. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.06.001>
- Kishk, Y.F.M., Elsheshetawy, H.E., 2013. Effect of ginger powder on the mayonnaise oxidative stability, rheological measurements, and sensory characteristics. *Ann. Agric. Sci.* 58, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2013.07.016>
- Lee, B., Kim, J.K., 2001. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types 25, 111–124.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Jara, A.M.A.T., Brasileiro, P.P.F., Sarubbo, L.A., 2015. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 480, 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.014>
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., 2016. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. *Process Saf. Environ. Prot.* 102, 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.010>
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2013. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial

- waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 102, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.008>
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Rodrigues, L.R.M., Teixeira, J.A.C., De Campos-Takaki, G.M., 2011. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. *Curr. Microbiol.* 62, 1527–1534. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9889-1>
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.A., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents 45, 31–34.
- Meylheuc, T., Van Oss, C.J., Bellon-Fontaine, M.N., 2001. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *J. Appl. Microbiol.* 91, 822–832. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01455.x>
- Monteiro, A.S., Bonfim, M.R.Q., Domingues, V.S., Corrêa, A., Siqueira, E.P., Zani, C.L., Santos, V.L., 2010. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. *Bioresour. Technol.* 101, 5186–5193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.041>
- Nascimento, E.P., Marcelo, D., Silva, P., Weckher, F.C., 2017. Crescimento das mudas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) sob growth of seedlings of cupuaçu (*theobroma grandiflorum*) under the effect of different compositions of biofertilizers substratos têm-se recomendado o uso de áreas de mata do sul e nordeste *Periodicos.Unincor.Br* 861–870.
- Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O., 2007. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>
- Pacheco, M.V., Felix, F.C., Aprígio, J., Medeiros, D. De, Lima, S., 2017. Potencial alelopático dos extratos de folhas e frutos de *pityrocarpa moniliformis* sobre a germinação de sementes de *mimosa caesalpinifolia* allelopathic 250–262.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>
- Rufino, R.D., de Luna, J.M., de Campos Takaki, G.M., Sarubbo, L.A., 2014. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electron. J. Biotechnol.* 17, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.006>
- Santos, Danyelle Khadydja F., Meira, H.M., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., 2017. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. *Process Biochem.* 54, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.020>
- Santos, Danyelle K.F., Resende, A.H.M., de Almeida, D.G., da Silva, R. de C.F.S., Rufino, R.D., Luna, J.M., Banat, I.M., Sarubbo, L.A., 2017. *Candida lipolytica* UCP0988 biosurfactant: Potential as a bioremediation agent and in formulating a commercial related product. *Front. Microbiol.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00767>
- Santos, D.K.F., Ru, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Salgueiro, A.A., Sarubbo, L.A., 2013. *Journal of Petroleum Science and Engineering* Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor 105, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2013.03.028>

- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2016. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Sarubbo, L.A., Luna, J.M., Rufino, R.D., 2015. Application of a biosurfactant produced in low-cost substrates in the removal of hydrophobic contaminants. *Chem. Eng. Trans.* 43, 295–300. <https://doi.org/10.3303/CET1543050>
- Silva, R. D. C. F., Almeida, D. G., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2014). Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International journal of molecular sciences*, 15(7), 12523-12542.
- Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I.W., Roller, S., 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.* 40, 207–217. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00053-S](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00053-S)
- Sobrinho, H.B.S., Rufino, R.D., Luna, J.M., Salgueiro, A.A., Leite, F.C., Sarubbo, L.A., Campos-takaki, G.M., 2008. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Bioprocess Eng.* 43, 912–917. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.013>
- Szczurek, A., Fierro, V., Pizzi, A., Celzard, A., 2013. Mayonnaise, whipped cream and meringue, a new carbon cuisine. *Carbon* N. Y. 58, 245–248. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.02.056>
- Tiquia, S.M., Tama, N.F.Y., Hodgkis, I.J., 1996. Effects pig-manure on phytotoxicity sawdust litter of spent 93, 249–256.
- Torabizadeh, H., Shojaosadati, S.A., Tehrani, H.A., 1996. Preparation and characterisation of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. *LWT - Food Sci. Technol.* 29, 734–737. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0114>

Tabela 1: Formulações das emulsões

Formulação	Ingredientes
1	Amido
2	Amido + Biossurfactante isolado de Candida
3	Amido + Goma guar
4	Goma guar
5	Goma guar + biossurfactante isolado de Candida
6	Biossurfactante isolado de Candida

Tabela 2: Tensão superficial como parâmetro de seleção do micro-organismo e do meio de produção de biossurfactante: A) 5,0% de glicose, 0,1% de extrato de levedura, 0,1% de uréia e 5,0% do óleo de fritura (residual); B) 5,0 % de melaço, 0,1% de extrato de levedura, 0,1% de uréia e 5,0% do óleo de fritura (residual); C) 5,0% de melaço, 5,0% de milhocina e 5,0% do óleo de fritura (residual) e D) 2,5% de melaço, 2,0% de milhocina e 2,5% de óleo de fritura (residual).

Meios de Produção	Micro-organismos	
	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. guilhermondii</i>
A	36,23 ± 0,01 mN/m	38,08 ± 0,09 mN/m
B	35,51 ± 0,10 mN/m	35,80 ± 0,05 mN/m
C	52,13 ± 0,12 mN/m	28,60 ± 0,02 mN/m
D	33,05 ± 0,03 mN/m	33,02 ± 0,71 mN/m

Tabela 3: Fitotoxicidade do biossurfactante isolado de *C. guilliermondii* cultivado em meio formulado com 5% de melaço, 5% de óleo vegetal e 5% de maceração de milho (milhocina) em três sementes de espécies vegetais

Semente vegetal	Índice de Germinação		
	Biossurfactante isolado em 0.35%	Biossurfactante isolado em 0.7%	Biossurfactante isolado em 1.4%
Repolho <i>(Brassica oleracea)</i>	100% ±0.01	64%	49%
Maxixe <i>(Cucumis anguria)</i>	72%	100%	97%
Tomate <i>(Solanum lycopersicum)</i>	43%	57%	89%

Tabela 4: Formulações dos molhos tipo maionese, com adição do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual, após um mês de armazenamento refrigerado.

Concentração do biossurfactante (p/v)	pH Inicial	pH Final	Separação de Fases*	Viscosidade (mPa.S)
0,2	4,2	4,5	(-)	1415
0,3	4,2	4,5	(-)	1715
0,4	4,2	4,5	(-)	1699
0,5	4,2	4,6	(-)	1626
0,6	4,2	4,5	(-)	1645
0,7	4,2	4,5	(-)	1862
0,8	4,2	4,6	(-)	1625

*ausência (-) ou presença (+) de separação de fases

Legenda das Figuras

Figura 1: Cinética de crescimento, pH, tensão superficial, biomassa seca e rendimento do biossurfactante de *C. guilliermondii* UCP0996 cultivado em meio contendo 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual

Figura 2: CMC do biossurfactante de *C. guilliermondii* UCP0996 cultivado em meio contendo 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual

Figura 3: Espectro de ¹H RMN registrado em DCCL3 do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.

Figura 4: Espectro de ¹³C RMN registrado em DCCL3 do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.

Figura 5: Espectro FIT-IR do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.

Figura 6: Cromatograma do perfil de ácidos graxos do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.

Figura 7: Formulações do molho tipo maionese nas diferentes concentrações com adição do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.

Figura 8: Formulações do molho tipo maionese, na aplicação do biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* com meio suplementado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual, como aditivo alimentar.

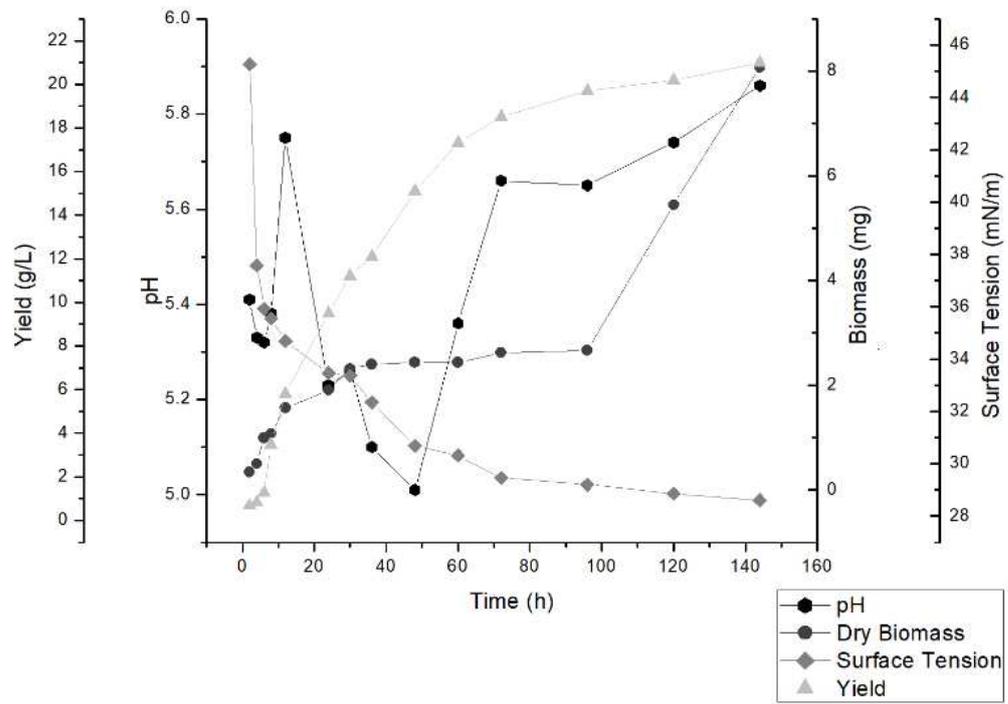


Fig.1

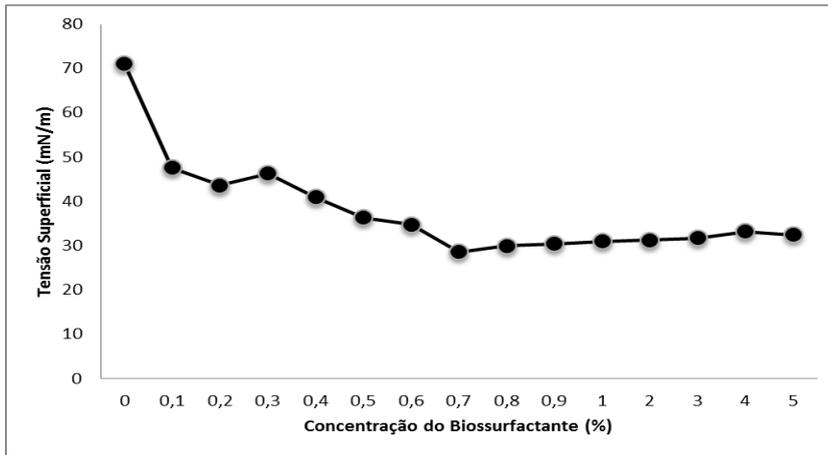


Fig.2

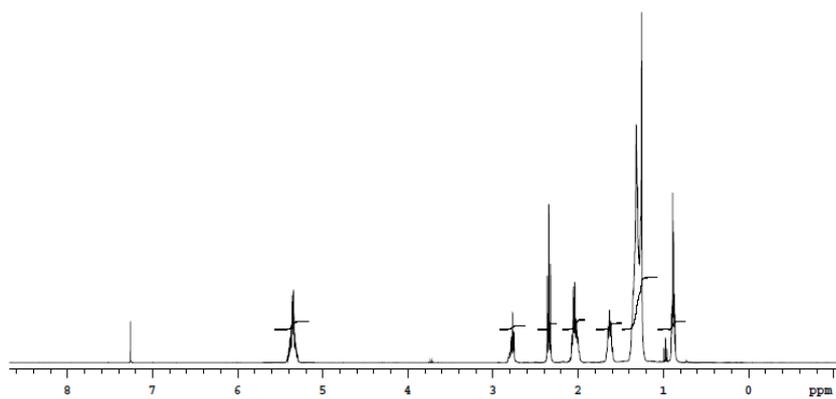


Fig.3

Lira, I. R. A. S. Produção e Aplicação de Biossurfactantes para uso em Molhos Para Salada.

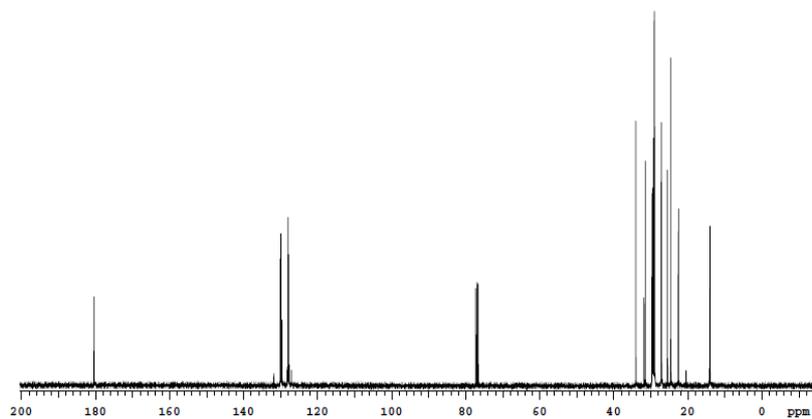


Fig.4

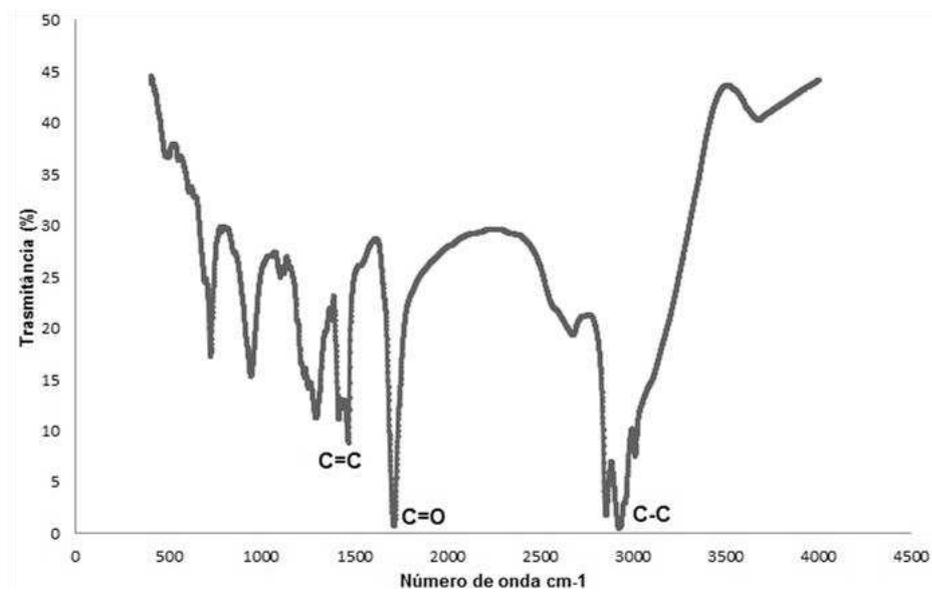


Fig.5

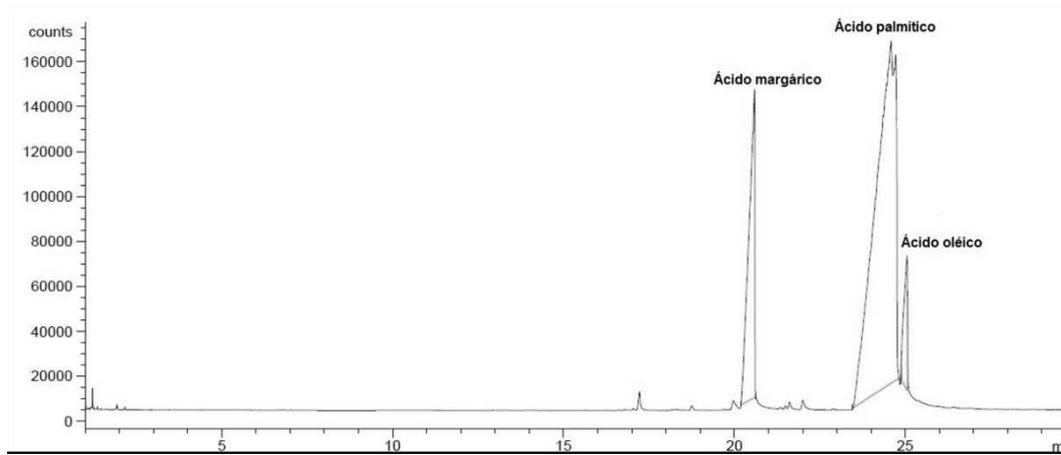


Fig.6

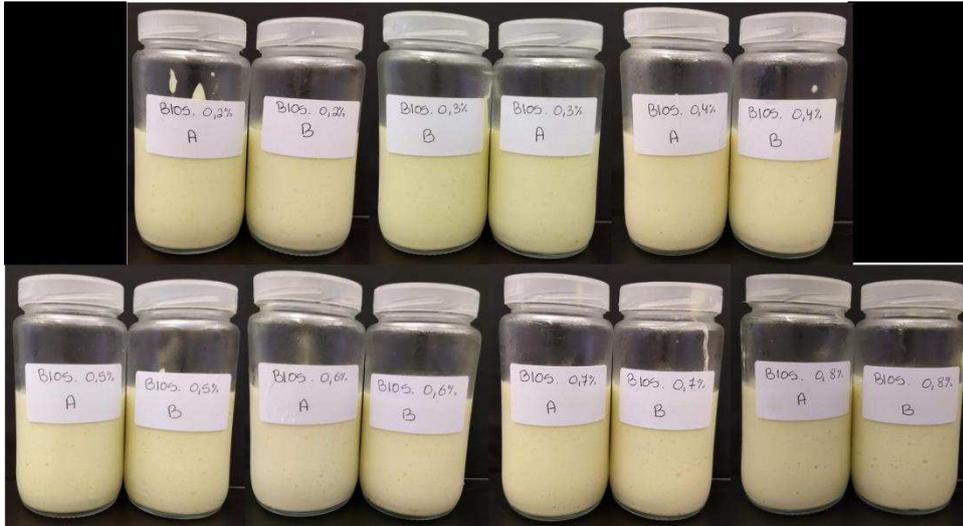


Fig. 7



Fig 8

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados nesta pesquisa permitem as seguintes conclusões:

- A levedura *C. guilliermondii* apresenta potencial como micro-organismo produtor de biossurfactante, utilizando-se resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio;
- O biossurfactante produzido demonstra propriedades tensoativas e emulsificantes;
- O biossurfactante produzido não apresentou efeito tóxico sobre, as sementes de vegetais, larvas de *Artemia salina*, bem como a *Allium cepa*;
- A caracterização estrutural do biossurfactante sugere natureza glicolípídica;
- Formulações contendo o biossurfactante isolado atuaram inibindo o crescimento de micro-organismos patogênicos;
- A aplicação do biossurfactante apresentou estabilidade da emulsão, firmeza e resistência ao corte, bem como ausência de dessoramento nas formulações, devido à capacidade emulsificante da biomolécula.
- O uso do biossurfactante agregado a uma goma demonstrou excelente performance nas formulações de molho tipo maionese, apresentando potencial de aplicação em alimentos e emulsões.

ANEXO- Submissão do trabalho para a Revista *Journal of Biotechnology*

Re: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL BIOSURFACTANT PRODUCED BY CANDIDA GUILLIERMONDII AND APPLICATION IN A MAYONNAISE EMULSION

by Juliana Luna
Research Paper

Dear Dr. Juliana Luna,

Your submission entitled "PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL BIOSURFACTANT PRODUCED BY CANDIDA GUILLIERMONDII AND APPLICATION IN A MAYONNAISE EMULSION" has been received by Journal of Biotechnology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/jbiotec/>.

Your username is: juliana.luna@unicap.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/jbiotec/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Journal of Biotechnology

