



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

CAROLINA ARRUDA BUARQUE DE GUSMÃO

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DE
GORDURA VEGETAL E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE
POLUENTE GERADO PELA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO**

Recife

2011

CAROLINA ARRUDA BUARQUE DE GUSMÃO

**PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTE A PARTIR DE
GORDURA VEGETAL E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE
POLUENTE GERADO PELA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Tecnologia e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo

Recife

2011

G982p Gusmão, Carolina Arruda Buarque de

Produção de biossurfactante a partir de gordura vegetal e aplicação na remoção de poluente gerado pela indústria de petróleo / Carolina Arruda Buarque de Gusmão, 2011.

100 f. : il.

Orientador: Leonie Asfora Sarubbo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2011.

1. Biossurfactantes. 2. Petróleo. 3. Resíduos industriais.

I. Título.

CDU 574.6

Pollyanna Alves - CRB4/1002

PRODUÇÃO DE BIODERIVADO A PARTIR DE GORDURA VEGETAL E
APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE POLUENTE GERADO PELA INDÚSTRIA DE
PETRÓLEO

CAROLINA ARRUDA BUARQUE DE GUSMÃO

Data:01/03/2011

Examinadores:

Leonie Asfora Sarubbo

Profª. Drª. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)
(Orientadora)

P/ *Leonie Asfora Sarubbo*

Prof(a) Dr(a) Alexandra Amorim Salgueiro
(titular interno)

Raquel Diniz Rufino

Prof. (a) Dr(a) Raquel Diniz Rufino
(titular externo)

Suplentes:

P/ *Leonie Asfora Sarubbo*

Prof(a) Dr(a) Galba Maria de Campos Takaki
(suplente interno)

P/ *Leonie Asfora Sarubbo*

Prof(a) Dr(a) Ana Lúcia Figueiredo Porto
(suplente externo)

DEDICO Ao meu filho Caio, a luz da minha vida. Aos meus pais Carlos e Cláudia pelo amor e exemplo de vida e ao meu marido, meu grande amor, Rodrigo.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia. O mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar presente em todos os momentos e me fazer chegar aqui hoje.

À Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo por ter me mostrado o caminho da ciência, pela paciência, pela amizade, pelos ensinamentos, pelo carinho e atenção desde o primeiro dia.

À Dra. Raquel Diniz Rufino, por ter segurado na minha mão e me ensinado a fazer.

Aos meus avós Dulce, Mauro e Cielo por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus irmãos Cacau, Juliana, Guilherme, Carla, Alvinho e Fernanda, companheiros de todas as horas.

À minha segunda mãe, Titia Dulcinha, pelo amor, parceria e companheirismo.

Aos meus tios Flávia e Djalma, Mauro Filho e Ana Paola, Pedro e Suzana, Ana e Paulo, Suzana e Márcio, Patrícia e Paulo, Álvaro, Jorge e Izabel, Luiz e Ana Luiza, por terem me ensinado o sentido da família.

Aos meus primos Julia e Vítor, Bernardo, Paulinho e Viviane, Pedroca e Carla, Letícia e Murilo, Rafael e Liliane, Fábio, Márcinho, Leo e Priscila, João Paulo e Débora, Luiz Felipe e Guilherme, Jorginho e Candice, irmãos que pude escolher.

Aos meus amores pequenos, Camila e Manu, André Felipe e Fábio Henrique, Bernardo, Matehus, Gabriel e Amanda.

À Charles Bronzo, que na base californiana dele foi meu companheiro todos os dias no laboratório. À Juliana Luna, pela parceria e amizade.

Aos colegas e professores do NBCIAMB (Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais), pelo exemplo de profissionalismo, ajuda, apoio e parceria.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS..... | vii |
| SUMÁRIO | ix |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| CAPÍTULO I..... | 12 |
| 1.1 INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 1.1 OBJETIVOS | 16 |
| 1.2.1 Objetivo Geral..... | 16 |
| 1.2.2 Objetivos Específicos..... | 16 |
| 1.3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 17 |
| 1.3.1 Surfactantes | 17 |
| 1.3.2 Biossurfactantes..... | 19 |
| 1.3.2.1 Classificação..... | 20 |
| 1.3.2.2 Propriedades dos biossurfactantes..... | 24 |
| 1.3.3.2.1 Atividade superficial e interfacial: | 25 |
| 1.3.3.2.2 Tolerância à temperatura, pH e força iônica | 25 |
| 1.3.3.2.3 Biodegradabilidade | 26 |
| 1.3.3.2.4 Baixa toxicidade..... | 26 |
| 1.3.2.3 Microrganismos produtores de biossurfactantes..... | 26 |
| 1.3.2.4 Economia na produção de biossurfactantes | 30 |
| 1.3.2.4.1 A fonte de carbono | 32 |
| 1.3.2.4.2 Fontes de carbono de origens renováveis | 37 |

| | |
|---|----|
| 1.3.2.4.3 Fonte de nitrogênio | 40 |
| 1.3.2.4.5 Forma de condução do processo | 45 |
| 1.3.2.4.6 Temperatura, pH, aeração e agitação | 46 |
| 1.3.2.5 Resíduos industriais..... | 49 |
| 1.3.2.5.1 Oleos e resíduos oleosos | 49 |
| 1.3.2.5.2 Agro-industriais..... | 51 |
| 1.3.2.6 Aplicações dos biossurfactantes | 53 |
| 1.3.2.6.1 Aplicações ambientais dos biossurfactantes | 53 |
| 1.3.2.6.2 Biorremediação por biossurfactantes | 54 |
| 1.3.2.7 Perspectivas de utilização dos biossurfactantes | 55 |
| 1.3.2.8 Extração dos Biossurfactantes | 57 |
| 1.4 Referências..... | 58 |
| CAPÍTULO II | 69 |
| Artigo | 70 |
| Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from <i>Candida glabrata</i> UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant..... | 70 |
| CAPÍTULO III..... | 82 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 83 |
| CAPÍTULO IV..... | 84 |
| Anexo I..... | 85 |
| Normas para publicação World Journal of Microbiology & Biotechnology..... | 85 |
| Anexo II..... | 95 |
| Partes deste Trabalho foram publicados e premiados..... | 95 |
| Prêmios e títulos..... | 96 |
| Capítulos de livros publicados..... | 96 |
| Trabalhos publicados em anais de eventos (completo) | 96 |
| Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo) | 97 |

| | |
|---|----|
| Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido) | 97 |
| Demais produções bibliográficas | 97 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - REPRESENTAÇÃO DE UM SURFACTANTE, COMPOSTO POR UMA PORÇÃO APOLAR (REPRESENTADO PELA CADEIA HIDROCARBONADA) E UMA PORÇÃO POLAR. | 17 |
| Figura 2 - SURFACTANTES SÃO CARACTERIZADOS POR UMA ESTRUTURA ANFIPÁTICA. AS PROPRIEDADES HIDROFÓBICAS E HIDROFÍLICAS DEPENDEM DA CARGA DO GRUPO POLAR (ANIÔNICO, CATIÔNICO, NEUTRO OU ANFOTÉRICO). (A) MONÔMERO SURFACTANTE, DENOTADO POR UM CÍRCULO REPRESENTANDO A CABEÇA HIDROFILIACA ATACADA À CADEIA DE HIDROCARBONETO; (B) MICELA CIRCULAR; (C) MICELA CILÍNDRICA; (D) CAMADA MICELAR; E (E) REPRESENTAÇÃO DE UMA VESÍCULA. | 18 |
| Figura 3 - – ESTRUTURA DE UM RAMINOLIPÍDEO (NITSCHKE; PASTORE, 2002) | 21 |
| Figura 4- ESTRUTURA DE UM SOFOROLIPÍDEO (NITSCHKE; PASTORE, 2002) .. | 22 |
| Figura 5 - ESTRUTURA DE UMA SURFACTINA (NITSCHKE; PASTORE, 2002)..... | 23 |
| Figura 6 - ESTRUTURA DO EMULSAN (NITSCHKE, PASTORE, 2002)..... | 24 |
| Figura 7 - PERFIL DA PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE PELAS LEVEDURAS C. LIPOLYTICA (A) E Y. LIPOLYTICA IMUFRJ 50682 (B). | 29 |
| Figura 8- METABOLISMO INTERMEDIÁRIO RELACIONADO À SÍNTESE DE PRECURSORES DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DA UTILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS COMO SUBSTRATOS. ENZIMAS CHAVES PARA O CONTROLE DO FLUXO DE CARBONO: A FOSFOFRUTOQUINASE;B: PIRUVATO QUINASE; C:ISOCITRATO DESIDRO | 34 |
| Figura 9 - METABOLISMO INTERMEDIÁRIO RELACIONADO À SÍNTESE DE PRECURSORES DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DA UTILIZAÇÃO DE HIDROCARBONETOS COMO SUBSTRATOS. AS ENZIMAS CHAVES SÃO: A,. ISOCITRATO LIASE; B. MALATO SINTASE; C. FOSFOENOPIRUVATO CARBOXILASE; D FRUTOSE -1,..... | 35 |
| Figura 10 - CULTIVO DE CANDIDA ANTARTICA MOSTRANDO O CONSUMO DE NITROGENIO E O INÍCIO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE MEL-SY16..... | 42 |
| Figura 11- PROCESSO DE PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES | 56 |
| Figura 12 - MERCADO MUNDIAL DE SURFACTANTES QUÍMICOS | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1- TIPO E ORIGEM MICROBIOLÓGICA DOS BIOSURFACTANTES (ADAPTADA DE MUTHUSAMY, 2008) | 20 |
| TABELA 2- – PRINCIPAIS ESPÉCIES DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES | 27 |
| TABELA 3– PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE BIOSURFACTANTES (DESAI E BANAT, 1997) | 31 |
| TABELA 4- – PRODUÇÃO DE LEVEDURAS X CONCENTRAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO | 43 |

RESUMO

As refinarias de petróleo constituem potenciais fontes de poluição ambiental portanto o desenvolvimento de novas tecnologias para a detoxificação dos contaminantes gerados torna-se necessária. Nesse contexto, a utilização de surfactantes torna-se uma alternativa atrativa na remoção de contaminantes gerados pela indústria de petróleo. Os surfactantes, compostos anfipáticos que se particionam nas interfaces óleo-água apresentam várias aplicações industriais como emulsificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases. A grande maioria dos surfactantes disponível comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a necessidade de preservação e as legislações ambientais têm levado à utilização de surfactantes naturais ou biossurfactantes, produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Os substratos mais estudados para a produção dos biossurfactantes têm sido hidrocarbonetos e óleos vegetais, embora a produção ainda não seja economicamente vantajosa. Uma das alternativas consiste no uso de resíduos industriais. Considerando a habilidade das leveduras em produzir surfactantes atóxicos e biodegradáveis, esse propõe estudos dirigidos para a produção e aplicação de um biossurfactante de baixo custo na despoluição de solos contaminados por derivado de petróleo. O biossurfactante foram produzido por *Candida glabrata* em gordura vegetal, sendo o processo de produção, isolamento e caracterização acompanhados por metodologias microbiológicas e analíticas, aplicadas na remoção do contaminante e custo de aplicação estabelecido.

Palavras-Chave: Biossurfactante, Resíduo Industrial, Petróleo, *Candida glabrata*, Tensão Superficial.

ABSTRACT

The accumulation and persistence of toxic materials in water and soil represents a major problem today. Various organics are generated as byproducts from industries (e.g. petroleum and petrochemical, pulp and paper, chemical industries *etc.*), which may be released into the environment, or are accidentally spilled. Aromatics and their chlorinated derivatives, which are difficult to biodegrade and are toxic, are of primary concern. On this days, biodegradation techniques had become a promising alternative in the ground treatment contaminated for organic substances. Bioremediation can be defined as any process that uses microorganisms, fungi, green plants or their enzymes to return the environment altered by contaminants to its original condition. Bioremediation may be employed to attack specific soil contaminants, such as degradation of crude oil. Biodegradation of hydrocarbons in soil can be efficiently enhanced by addition or *in situ* production of biosurfactants. It was generally observed that the degradation time, and particularly the adaptation time, for microbes was shortened. With the growing interest of surfactants applications in environmental remediation. Microbial surface active agents (biosurfactants) are important biotechnological products, with a wide range of applications in many industries. Their properties of interest are: in changing surface active phenomena, such as lowering of surface and interfacial tensions, wetting and penetrating actions, spreading, hydrophylicity and hydrophobicity actions, microbial growth enhancement, metal sequestration and anti-microbial action. Thus, this project propouse study the effect of biosurfactants produced by *Candida glabrata*.

key words: Biosurfactants; By-products; *Candida glabrata* ; Industrial residues; Surface tension; Petroleum.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Desde os anos 70, diversas metodologias vêm sendo utilizadas para avaliar a presença de contaminantes no solo ou nos sedimentos. Isto é particularmente importante, uma vez que o despejo indiscriminado, métodos insuficientes de estocagem de resíduos, tratamento e disposição desses, têm contribuído para a contaminação ambiental (MULLIGAN, 2009).

As refinarias de petróleo, assim como outros processos industriais em grande escala, são fontes potenciais de poluição ambiental. O relatório da comissão mista para analisar o acidente na Petrobrás/Repar (CREA-PR) cita 33 acidentes ocorridos com derramamento de petróleo e seus derivados no Brasil, no período de 1975 a 2001, somando milhões de litros contaminantes de solos, rios e mar (ZAMORA et al., 2004).

O maior acidente de derramamento de petróleo do mundo aconteceu em 2010 no Golfo do Mexico depois da explosão, e afundamento, de uma plataforma petrolífera, ao largo da costa da Louisiana e do Mississippi, Estados Unidos, no dia 22 de abril. Depois do afundamento da plataforma, os dutos de exploração do petróleo continuaram abertos e jorrando no mar. Os relatórios oficiais indicaram que escaparam por dia o equivalente a mil barris de óleo, na área de perfuração a 1,5 Km de profundidade. O derramamento só foi estancado em 15 de julho do mesmo ano e uma quantidade estimada entre 3 e 4 milhões de barris de petróleo vazou, fazendo deste o maior acidente ambiental da história dos Estados Unidos (BRITISH PETROLEUM, 2010).

A necessidade de remediar áreas contaminadas levou ao desenvolvimento de novas tecnologias que enfatizaram a detoxificação desses contaminantes de forma não convencional, ou seja, sem a utilização de métodos somente químicos ou físicos. O uso de microrganismos ou produtos microbianos para degradar compostos poluentes, é uma destas novas tecnologias (DAS, MUKHERJEE, 2007).

A biorremediação pode ser definida como um processo de estimulação de situações naturais de biodegradação para limpeza de derramamentos de óleos e tratamento de ambientes terrestres e aquáticos contaminados com compostos xenobióticos (CALVO et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2006; MARÍN et al., 1996).

Um dos problemas associados à biodegradação de compostos hidrofóbicos, aos quais se incluem os hidrocarbonetos do petróleo é sua ligação às partículas do solo e à pouca solubilidade em água, resultando em baixa biodisponibilidade para os microrganismos, o que pode retardar ou até mesmo paralisar o processo de degradação. Um dos métodos mais investigados para a resolução deste problema é a utilização de compostos surfactantes (CALVO et al., 2009; JENNINGS, TANNER, 2000).

O interesse recente por biossurfactantes é baseado na gama de propriedades funcionais que esses compostos possuem como emulsificação, separação de fases, ação umectante e espumante, solubilização, inibição da corrosão e redução da viscosidade de óleos. Dessa forma, os surfactantes sintéticos poderão ser substituídos por surfactantes microbianos em muitas áreas industriais (SILVA et al., 2010; MUKHERJEE, 2006).

No entanto, devido a razões funcionais e custos da produção, esses compostos ainda não estão sendo competitivos no mercado em relação aos surfactantes químicos. O uso de substratos de baixo custo ou subutilizados pode diminuir acentuadamente o custo da produção de biossurfactantes. Nesse sentido, os resíduos industriais estão sendo apontados como possíveis substratos para a produção de biossurfactantes (GUSMAO et al., 2010; SOBRINHO et al., 2008; LUNA et al., 2008).

A produção de biossurfactantes a partir de óleos vegetais usados, resíduos de refinaria de óleos ou óleos lubrificantes usados (óleo de motor) é uma estratégia de redução dos custos associada aos substratos, através da utilização de subprodutos gerados pelas indústrias de alimentos e automobilísticas (LUNA et al., 2009; MAKKAR, CAMEOTRA, 2002).

Neste sentido, considerando a importância da redução dos custos de produção, a utilização de uma espécie de *Candida* cultivada em substratos renovável e de baixo custo representa uma alternativa na produção de biomoléculas com aplicações no meio ambiente e nas indústrias do país.

1.1 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir um biossurfactante por *Candida glabrata* cultivada em resíduo industrial e avaliar o potencial de remoção de óleo de motor adsorvido em solo.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir o biossurfactante em meio contendo resíduo industrial como substrato.
- Utilizar um planejamento fatorial completo para avaliar o efeito da concentração dos constituintes do meio de produção na redução da tensão superficial.
- Descrever a cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante.
- Avaliar a influência da presença de células na tensão superficial do meio.
- Investigar a presença de surfactante intracelular.
- Isolar o biossurfactante extracelular.
- Investigar a estabilidade do biossurfactante frente a diferentes temperaturas, tempo de exposição a altas temperaturas, presença de sal e variações de pH.
- Estabelecer a relação entre a composição em ácidos graxos do resíduo industrial e do biossurfactante isolado.
- Determinar a composição bioquímica do biossurfactante.
- Aplicar o biossurfactante na remoção de óleo motor adsorvido em areia contaminada.
- Estimar o custo de aplicação do biossurfactante produzido.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfipáticas contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se localizar preferencialmente na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo-água ou ar-água (figura 1) (SINGH et al., 2007). Estas propriedades tornam os surfactantes capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial e formar microemulsões onde os hidrocarbonetos possam se solubilizar em água ou vice-versa (SATPURE et al., 2010; MULLIGAN, 2009; DAS et al., 2009; PATTANATHU et al., 2008; SARUBBO et al., 2007; SARUBBO et al., 2006; PIRÔLLO, 2006).

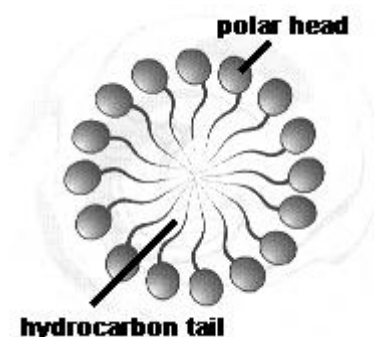


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DE UM SURFACTANTE, COMPOSTO POR UMA PORÇÃO APOLAR (REPRESENTADO PELA CADEIA HIDROCARBONADA) E UMA PORÇÃO POLAR.

Os surfactantes podem ser aniônicos, catiônicos, neutros e anfotéricos (com cargas positivas e negativas). O maior grupo de surfactantes é do tipo aniônico e neutro, enquanto que a utilização dos catiônicos e anfotéricos é muito restrita (figura 2) (CALVO et al., 2009; DELEU; PAQUOT, 2004).

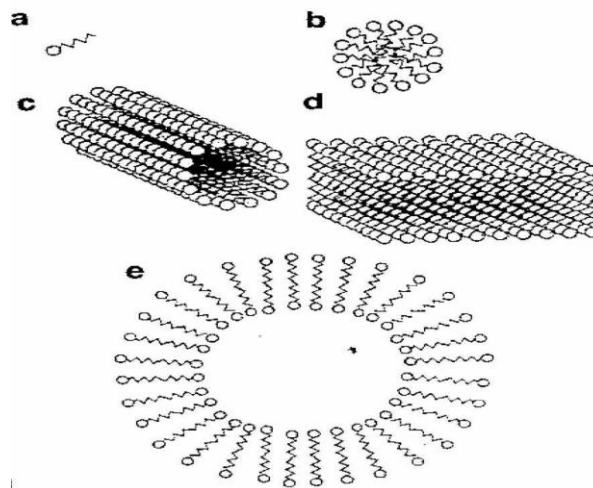


FIGURA 2 - SURFACTANTES SÃO CARACTERIZADOS POR UMA ESTRUTURA ANFIPÁTICA. AS PROPRIEDADES HIDROFÓBICAS E HIDROFÍLICAS DEPENDEM DA CARGA DO GRUPO POLAR (ANIÔNICO, CATIÔNICO, NEUTRO OU ANFOTÉRICO). (A) MONÔMERO SURFACTANTE, DENOTADO POR UM CÍRCULO REPRESENTANDO A CABEÇA HIDROFILIACA ATACADA À CADEIA DE HIDROCARBONETO; (B) MICELA CIRCULAR; (C) MICELA CILÍNDRICA; (D) CAMADA MICELAR; E (E) REPRESENTAÇÃO DE UMA VESÍCULA.

A eficiência do surfactante é determinada pela habilidade de reduzir a tensão superficial, que é medida na superfície de energia livre por unidade de área requerida para trazer moléculas da maior fase à superfície. Com a presença de surfactantes, uma força menor é requerida para trazer estas moléculas para a superfície e assim reduzir a tensão superficial. Bons surfactantes conseguem reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m e a tensão interfacial (tensão entre líquidos polares e apolares) da água e n-hexadecano de 40 mN/m para 1 mN/m (BANAT et al., 2010; DELEU; PAQUOT, 2004).

Com o aumento da concentração dos surfactantes adicionados aos sistemas óleo/água ou água/ar, a tensão superficial se reduz até atingir um nível crítico, abaixo do qual as moléculas anfipáticas se associam rapidamente formando estruturas supramoleculares chamados micelas, e este nível crítico é denominado concentração micelar crítica (CMC) (PATTANATHU et al., 2008).

A seleção de surfactantes é baseada no custo de produção. Geralmente, surfactantes são utilizados para poupar energia e conseqüentemente para diminuir os custos como o da energia requerida pela bomba de ar e outras técnicas de tratamento. O tipo de carga, o comportamento físico-químico, a adsorção e a

solubilidade são os critérios mais importantes para selecionar os surfactantes (GUSMÃO, et. al., 2010).

A grande maioria dos surfactantes hoje disponível é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, as novas legislações de proteção ao meio ambiente, bem como a preocupação ambiental entre os consumidores, têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes (MULLIGAN, 2005). Dentro desse cenário novos surfactantes vêm sendo desenvolvidos para utilização na biorremediação de solos contaminados (VAN HAMME et al., 2006).

1.3.2 BIOSURFACTANTES

Os estudos relacionados aos biossurfactantes iniciaram-se em 1960 e sua utilização estendeu nas últimas décadas, surgindo como alternativa. Aos surfactantes sintéticos, especialmente em indústrias farmacêuticas, alimentícias e refinarias. A razão desta notoriedade está relacionada à baixa toxicidade, biodegradabilidade, habilidade de produção a partir de fontes renováveis, capacidade de ação em ambientes extremos, como pH, temperatura e salinidade, além de estruturas químicas únicas (MUTHUSAMY, Et al., 2008)

Assim como os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes possuem como características a redução da tensão interfacial e superficial utilizando os mesmos mecanismos. O termo biossurfactante vem sendo utilizado para definir qualquer composto obtido através da ação de microrganismos que provoque efeito nas interfaces (DELEU; PAQUOT, 2004). Sendo produzidos biologicamente por leveduras ou bactérias a partir de vários substratos como açúcares, óleos, alcanos e resíduos industriais oleosos (BOGNOLO, 1999).

Diferente dos surfactantes sintéticos, que podem ser classificados de acordo com o grupo polar, os biossurfactantes são divididos de acordo com a composição química e o microrganismo utilizado na produção. Haritash e Kaushik (2009) sugeriram que os biossurfactantes são divididos em moléculas de baixa massa molecular que apresentam como principal característica a redução da tensão

interfacial e superficial e os polímeros que apresentam como ponto principal a capacidade de emulsão. Tradicionalmente são divididos em glicolipídeos, lipopeptídeos, fosforolipídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros, (MUTHUSAMY, ET AL.. 2008).

A maioria destes componentes é aniônica ou neutra. Apenas alguns são catiônicos, como os que contêm um grupo amina. A parte hidrofóbica é caracterizada por ácidos graxos de cadeia longa. A porção hidrofílica pode ser um carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool. Uma grande quantidade de microrganismos pode produzir estes compostos (Tabela 1). A CMC dos biossurfactantes geralmente varia de 1 a 200 mg/L e a sua massa molecular de 500 a 1500 da (NITSCHKE; COAST, 2007).

TABELA 1- TIPO E ORIGEM MICROBIOLÓGICA DOS BIOSURFACTANTES (ADAPTADA DE MUTHUSAMY, 2008)

| Tipo de surfactante | Microrganismo |
|---------------------|--|
| Ramnolipídeos | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Serratia rubidea</i> |
| Soforolipídeos | <i>Candida apícola</i> , <i>Candida bombicola</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida bogoriensis</i> <i>Alcanivorax borkumensis</i> |
| Glicolipídeos | <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>R. erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i> <i>Tsukamurella sp.</i> |
| Fosforolipídeos | <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Capnocytophaga sp.</i> , <i>Penicilium spiculisporum</i> , |
| Ácidos Graxos | <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Talamyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> |

1.3.2.1 CLASSIFICAÇÃO

A maioria dos biossurfactantes pertence ao grupo dos glicolipídeos que são subdivididos em ramnolipídeos, trealoses e soforolipídios (MUTHUSAMY et al., 2008).

Os biossurfactantes apresentam algumas diferenças em potencial quando comparados aos surfactantes sintéticos incluindo alta especificidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade (COOPER, 1986). O glicolípido de *Rhodococcus species*, por exemplo, é 50% menos tóxico do que o Tween 80 em testes de solubilidade em naftaleno (TOKUMOTO et al., 2009).

Um grupo de biossurfactantes muito estudado é o de raminolípídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, como ilustrado na figura 3 (SILVA et al., 2010; HITSATSUKA et al., 1971; GERRA-SANTOS et al., 1986). Valores de tensão superficial de 29 mN/m são característicos destes componentes, que podem ser produzidos a partir de vários substratos incluindo alcanos (C11 e C12) piruvatos, citratos, frutoses, glicerol, óleo de oliva e glicose. A composição e os rendimentos dependem do tipo do fermentador, do pH, da composição dos nutrientes, substrato e da temperatura utilizada (SARACHAT et al., 2010; MULLIGAN; GIBBS, 1993; ROBERT et al., 1989).

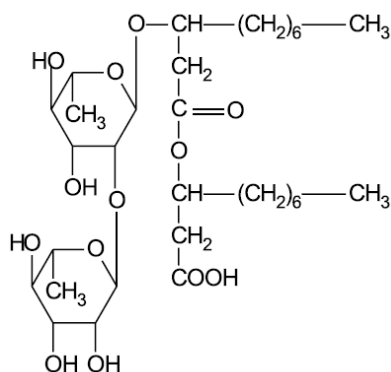


FIGURA 3 - - ESTRUTURA DE UM RAMINOLIPÍDEO (NITSCHKE; PASTORE, 2002)

Dentre os vários tipos de leveduras utilizadas na produção de biossurfactantes, destaca-se a *Candida bombicola*. A estrutura química dos soforolípídeos esta apresentada na figura 4. Segundo a literatura, esta levedura apresentou alto rendimento, em biossurfactante 0,35 g/g de substrato ou 67 g/L,

quando este foi produzido a partir de óleo de milho e glicose (SINGH et al., 2010; COOPER; PADDOCK, 1984).

A tensão superficial pode apresentar valores de 33 mN/m e reduções de 40 mN/m para 5 mN/m na tensão interfacial em n-hexadecano e água com 10 mg/L do sofrorolípídeos (COOPER; PADDOCK, 1984). Estas propriedades foram consistentes em valores de pH 6-9, várias concentrações de sal e com uma variação de temperatura de 20 a 90°C. A melhor condição para produção sofrorolípídeos (150 g/L) foi obtida utilizando óleo de canola e lactose como substratos (ZHOU; KOSARIC, 1995).

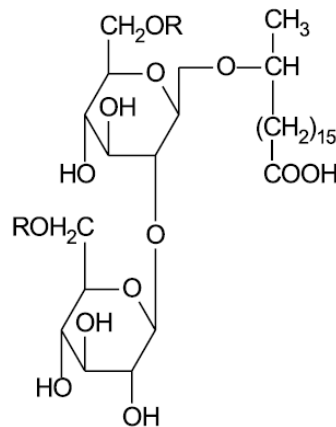


FIGURA 4- ESTRUTURA DE UM SOFOROLIPÍDEO (NITSCHKE; PASTORE, 2002)

Bacillus subtilis são produtores de lipopeptídeos, como chamado surfactina (figura 5), a qual contém sete aminoácidos ligados aos grupos carboxil e hidroxil do ácido C14 (PEFUMO et al., 2010; KAKINUMA et al., 1969). Concentrações de surfactina menores que 0,005% reduzem a tensão superficial para 27 mN/m, tornando a surfactina um dos mais poderosos biossurfactantes. A solubilidade e a capacidade surfactante da surfactina, por outro lado, depende do tipo de resíduo utilizado como substrato (HUE et al., 2001).

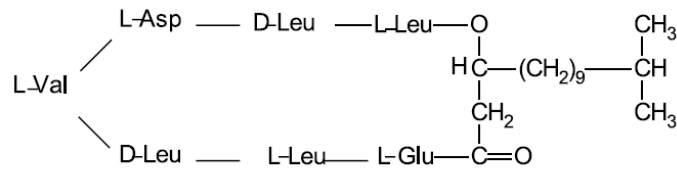


FIGURA 5 - ESTRUTURA DE UMA SURFACTINA (NITSCHKE; PASTORE, 2002)

Os biossurfactantes vêm sendo testados em recuperação de óleo e transporte de óleo bruto (SEN, 2008; HAYES et al., 1986). Eles se mostraram eficientes na redução da tensão interfacial do óleo e da água “in situ”, na viscosidade do óleo, na remoção da água da emulsão, e na limpeza da areia. As moléculas de emulsão, polissacarídeo composto por ácidos graxos e proteínas (Figura 6), vêm sendo comercializadas com este propósito (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010; ANON, 1984). Outros biossurfactantes são relatados por Ron e Rosenberg (2002), a maioria é produzido a partir de microrganismos aeróbios, embora existam alguns anaeróbios, como o *Bacillus licheniformis*, que podem ser utilizados na biorremediação do derramamento de óleo (ZANG, XIANG 2010; JAVAHERI et al., 1985).

Os substratos formados por hidrocarbonetos são os principais produtores de biossurfactantes (SYLDATK, WAGNER, 1987). A produção também pode estar associada a um agente emulsificante (extracelular) ou um componente que facilite a passagem do substrato na membrana celular (associação de membrana celular). Os biossurfactantes podem também ser produzidos por carboidratos solúveis (MULLIGAN, 2005).

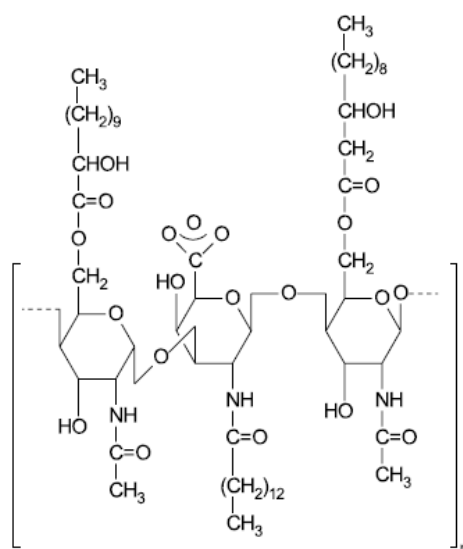


FIGURA 6 - ESTRUTURA DO EMULSAN (NITSCHKE, PASTORE, 2002)

1.3.2.2 PROPRIEDADES DOS BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes chamaram a mais atenção comercial devido a sua capacidade de adaptação, a condições adversas e crescimento em diferentes meios. Várias são as vantagens comparando-se com os surfactantes sintéticos, com as propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes. Redução da tensão superficial, capacidade espumante, capacidade emulsificante e estabilizante, concentrações micelares críticas baixas, solubilidade e poder detergente são muito importantes na avaliação de seu desempenho e na seleção de microrganismos com potencial de produção destes agentes (MUTHUSAMY, et al., 2008; DELEU, PAQUOT, 2004).

Apesar da diversidade de composição química e de propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (RON; ROSENBERG, 2002):

1.3.3.2.1 Atividade superficial e interfacial:

Os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial em concentrações menores. Os bons surfactantes conseguem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial do n-hexadecano de 40 para 1 mN/m. O raminolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de reduzir a tensão de água em 26 mN/m e a tensão interfacial do n-hexadecano < 1 mN/m (HISATSUKA, et al., 1971). Silva e colaboradores (2010) relataram que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* apresentou uma redução de tensão superficial de 72 para 28,20 mN/m. O soforolipídio produzido por *T. bombicola* apresentou redução de 33mN/m e 5mN/m para tensão superficial e interfacial respectivamente (COOPER; CAVALERO; 2003).

Em geral os surfactantes são mais efetivos e eficientes e sua CMC é de 10-40 vezes mais baixa do que os surfactantes sintéticos, ou seja, é necessário menos quantidade de surfactante para se obter o máximo de redução da tensão superficial (RAHMAN; GAKPE, 2008).

1.3.3.2.2 Tolerância à temperatura, pH e força iônica.

Muitos biossurfactantes não apresentam alteração na capacidade surfactante quando submetidos a condições ambientais desfavoráveis desta forma podem ser utilizados sob condições extremas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2, por exemplo, é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140h e pH entre 5 e 12 e concentrações de NaCl e Ca em torno de 50 e 25g/L respectivamente (MCINERNEY et al., 1990). O lipopeptídeo de *B. subtilis* LB5a demonstrou instabilidade quando submetido à autoclave (120°C) por 20 minutos e a 8°C por 6 meses. A atividade surfactante também não foi alterada com pH entre 5 e 11 e concentrações de NaCl maiores que 20% (NITSCHKE; PASTORE, 1990).

1.3.3.2.3 Biodegradabilidade

Os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo, tornando-os adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (CALVO EL AL, 2009).

1.3.3.2.4 Baixa toxicidade

A literatura é pobre a respeito da baixa toxicidade dos biossurfactantes. Os relatos apontam que os biossurfactantes receberam maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disto, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (ARAJI, et al., 2007).

1.3.2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

Os microrganismos utilizam uma série de fontes de carbono e energia para seu crescimento. A associação de fontes de carbono com substratos insolúveis facilita a difusão intracelular e a produção de várias substâncias, dentre elas os biossurfactantes (BANAT, 2010).

Vários microrganismos possuem capacidade de produzir moléculas com atividade interfacial (DESAI e BANAT, 1997). Nas últimas décadas amentou o interesse em identificar e isolar novos microrganismos produtores de moléculas tenso-ativas que apresentem boas características surfactantes, como baixa concentração micelar crítica (CMC), baixa toxicidade, alta atividade de emulsificação, dentre outras (ROSENBERG e RON, 1999).

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura é de origem bacteriana. As bactérias produtoras mais reportadas são dos gêneros:

Pseudomonas sp., *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.* e *Arthrobacter sp.* (GOUVEIA et al., 2003). Entretanto, a grande maioria dos biossurfactantes de origem bacteriana é inadequada para utilização na indústria alimentícia, devido a sua possível natureza patogênica (SHEPERD et al., 1995).

As leveduras também foram estudadas para a produção de emulsificadores. Entre as leveduras, espécies de *Candida* e *Yarrowia* foram largamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biossurfactantes. A Tabela 2 apresenta as espécies de levedura mais estudadas e os respectivos biossurfactantes produzidos (FONTES, et al., 2008).

TABELA 2- – PRINCIPAIS ESPÉCIES DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES

| Tipo de biossurfactante | Microorganismo produtor | Referência |
|--|---|--|
| Manoproteína | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Lukondeh et al., 2003 |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Cameron et al. 1988 |
| Soforolipídeos | <i>Wickerhamiella domercqiae</i> | Jing et al., 2006 |
| | <i>Candida bombicola</i> | Casas; Ochoas, 1999 |
| | <i>Torulopsis petrophilum</i> | Cooper; Paddock, 1984 |
| Manosileritritol - lipídeos | <i>Candida antartica</i> | Tulloch et al., 1968 |
| | <i>Candida sp. SY16</i> | Kim et al., 2006 |
| | <i>Kurtzmanomyces sp. 1-11</i> | Kakugawa et al., 2006 |
| | <i>Pseudozyma fusifornata</i> | Morita et al., 2006 |
| | <i>P. parontarctica</i> | Morita et al., 2006 |
| | <i>P. tsukubabaensis</i> | Morita et al., 2006 |
| | <i>P. rugulosa</i> | Morita et al., 2006 |
| Complexo carboidrato – proteína-lipídeo | <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 | Amaral et al., 2006 |
| | <i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589 | Zinjarde; Pant, 2002 |
| | <i>Debaryomyces polymorphus</i> | Singh; Desai, 1989 |
| | <i>Candida tropicalis</i> | Singh; Desai, 1989 |
| | <i>Candida lipolytica</i> IA 1055 | Vance-Harrop et al., 2003; Sarrubo et al., 2001 |
| | <i>Candida glabrata</i> UCP1002 | Gusmão et al., 2010 |
| | <i>Candida lipolytica</i> UP0988 | Rufino et al., 2007 |
| Complexo carboidrato- proteína | <i>Candida lipolytica</i> ATCC 8662 | Cirigliano e Carman, 1985 |

| | | |
|---|--|---|
| Ácido graxo ND | <i>Candida ingens</i> <i>Candida utilis</i> <i>Candida valida</i> <i>Candida boleticola</i> | Amézcuavega et al., 2007 Sheperd et al., 1995 Sheperd et al., 1995 Moussa et al., 2006 |
| Polióis-lipídeos | <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Rhodotorula graminis</i> | Yoon; Rhee, 1983 |
| Complexo polisacarídeo- proteína-lipídio | <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 | Sarubbo et al., 2007 |
| Gliocolípidos | <i>Candida sphaerica</i> UCP 0995 | Sobrinho et al., 2008 |

Uma grande vantagem do uso de leveduras reside no status GRAS (*generally regarded as safe*) 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 e farmacêutica (BARTHE; GAILLARD 1997).

Alguns microrganismos podem produzir biossurfactantes quando crescem em diferentes substratos, variando desde carboidratos até hidrocarbonetos. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se deseja propriedades específicas para uma aplicação direcionada (COOPER, 1986). Diversos são os estudos realizados por vários autores (GUSMÃO et al., 2010; SILVA et al., 2010; SOBRINHO et al., 2009; LUNA et al., 2009; LUNA et al., 2008; AMARAL et al., 2006; SARUBBO et al., 2006; KIM et al., 1999) na produção de biossurfactantes, envolvendo propriedades físico-químicas.

Geralmente a maioria dos biossurfactantes é produzida quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento (GUSMÃO et al., 2010). Porém algumas espécies podem apresentar pequena produção durante a fase exponencial de crescimento. Exemplos de perfis de produção de bioemulsificante pelas leveduras *C. lipolytica* UCP1002 (RUFINO et al., 2008; RUFINO et al., 2007; SARUBBO et al., 2007; SARUBBO et al., 2006; SARUBBO et al., 2001) e *Y.*

lipolytica IMUFRJ 50682 (AMARAL et al., 2006), são apresentados na Figura 7. Apesar da produção de bioemulsificante por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 ocorrer durante a fase exponencial de crescimento, a atividade de emulsificação mais significativa ocorre durante a fase estacionária.

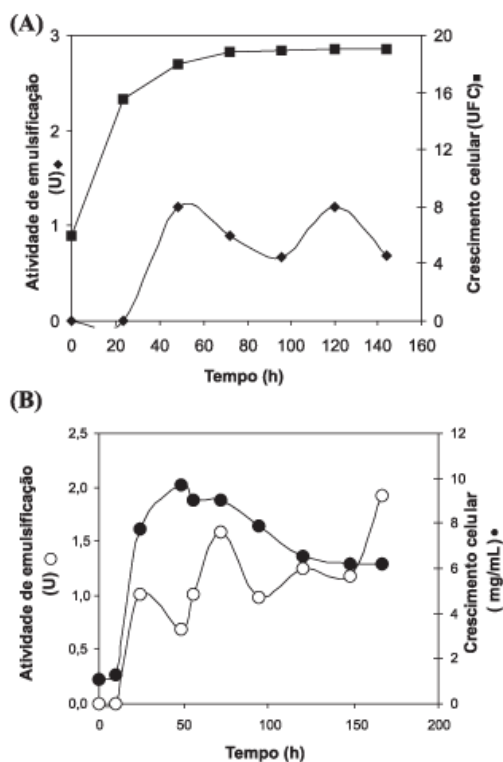


FIGURA 7 - PERFIL DA PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE PELAS LEVEDURAS *C. LIPOLYTICA* (A) E *Y. LIPOLYTICA* IMUFRJ 50682 (B).

Entre as leveduras, espécies de *Candida* têm sido largamente empregadas com sucesso na fermentação de hidrocarbonetos e conseqüentemente produção de biossurfactantes. Cirigliano e Carman (1985) isolaram, inicialmente, um bioemulsificante produzido por *Candida lipolytica* quando cultivada em meio contendo n-hexadecano, demonstrando perspectivas e potencial para uso em sistemas alimentares. Mais recentemente, Sarubbo et al.. (2006; 2007), Rufino et al (2008, 2007), Sobrinho et al. (2008), Luna et al.(2008, 2009) aperfeiçoaram a produção de um surfactante a partir de substratos regionais, enquanto Vance-Harrop (2001) e Gusmão et al. (2010) demonstrou a produção de surfactantes utilizando meios de baixo custo.

A *Candida bombicola*, segundo a literatura, apresentou alto rendimento em biossurfactante, 67 g/L, quando foi produzido a partir de óleo de milho e glicose. A tensão superficial dos biossurfactantes de leveduras pode apresentar valores de 33 mN/m e reduções de 40 mN/m para 5 mN/m na tensão interfacial em n-hexadecano e água (COOPER; PADDOCK, 1984).

No raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* valores de tensão superficial de 29 mN/m são característicos destes componentes, que podem ser produzidos a partir de vários substratos incluindo alcanos (C11 e C12) piruvatos, citratos, frutoses, glicerol, óleo de oliva e glicose (ROBERT et al., 1989). A composição e os rendimentos dependem do tipo do fermentador, do pH, da composição dos nutrientes, substrato e da temperatura utilizada (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

1.3.2.4 ECONOMIA NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Nos processos biotecnológicos a economia é sempre um fator importante, especialmente nos casos de produção de biossurfactantes. O sucesso da produção de biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos de baixo custo e da utilização de substratos mais baratos, que representam de 10 a 30% do custo total de produção. Os biossurfactantes têm que competir com os surfactantes petroquímicos considerando três aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção junto à necessidade de aplicação pretendida (BANAT et al., 2010; COIBRA et al., 2009; RUFINO et al., 2008; MUTHUSAMY, 2008; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

O alto custo de produção de biossurfactantes pode ser absorvido, se usado em pouca quantidade, na produção de cosméticos, de medicamentos e de alimentos; por outro lado, para aplicações mais abrangentes, como a recuperação de óleos, a qual requer altos volumes de surfactantes a um baixo custo, o alto custo de produção ainda dificulta a utilização destes biocompostos (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

Pattanathu et. al (2008) sugerem quatro fatores para a redução dos custos dos biossurfactantes. Os microrganismos (selecionados, adaptados ou criados para produção em larga escala), o processo (selecionado, adaptado ou criado para garantir baixo custo operacional), o meio de cultura (adaptado para baixo custo) e o processamento de produtos reciclados (mínimos ou gerenciados para venda mais do que para a perda).

A produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por 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).

A produção de biossurfactantes a um baixo custo é dificultada quando se faz necessário uma refinação extensiva. Para o desenvolvimento de processos deve-se usar biossurfactantes capazes de serem recuperados por técnicas simples e baratas. O processo mais comum de recuperação dos biossurfactantes é a extração com solventes (clorofórmio-metanol, dicloremetano-metanol, butanol, acetato de etila, pentano, hexano e ácido acético, entre outros). Todavia, têm sido reportadas técnicas de precipitação dos produtos como a precipitação por sulfato de amônia, centrifugação por cristalização, adsorção, fermentação fracionária, etc. Vários processos de recuperação de biossurfactantes estão demonstrados na Tabela 3 (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

TABELA 3– PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE BOSSURFACTANTES (DESAI E BANAT, 1997)

| Processo | Recuperação de biossurfactante |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| | Emulsan |
| Precipitação com sulfato de amônia | Biodispersan Bioemulsifier |
| Precipitação de acetona | Bioemulsificante Glicolipídios |
| Precipitação de ácido | Surfactin |
| Extração de solvente | Trealoselipídios |

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| | Sophorolipídios |
| | Liposan |
| Cristalização | Celbiolipídios |
| | Glicolipídios |
| Centrifugação | Glicolipídios |
| | Raminolípídeos |
| Adsorção | Lipopeptídios |
| | Glicolipídios |
| Fermentação fracionada | Surfactin |
| Filtração de fluxo tangencial | Biossurfactante misto |
| Precipitação | Glicolipídios |
| Ultrafiltração | Glicolipídios |

1.3.2.4.1 A fonte de carbono

A influência da fonte de carbono na produção de biossurfactante por diferentes cepas de microrganismos tem sido estudada. A literatura aponta uma ampla diversidade entre as fontes de carbono. Pareilleux (1979) isolou compostos tenso-ativos a partir da levedura *Candida lipolytica* em meio contendo *n*-alcanos como fonte de carbono, mas quando foi cultivada na presença de glicose a levedura não produziu nenhum bioemulsificante. Em um estudo similar, Zinjar e Pant (2002) mostraram que a biossíntese de surfactante por *Y. lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fontes de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool) não foi viabilizada. Entretanto, em meio contendo óleo cru e alcanos (C₁₀ - C₁₈) detectou-se a produção de bioemulsificante. Observações similares foram obtidas por Kim et al. (2006).

Cirigliano e Carmam (1985) mostraram que a levedura *Y. lipolytica* produz biossurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono, tais como hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão, sendo que com hexadecano houve maior produção de biossurfactante.

Em 2001, Sarubbo e colaboradores produziram biossurfactante utilizando glicose como fonte de carbono a partir da levedura *C. lipolytica* IA 1055, o qual apresentou alta atividade de emulsificação. Estes autores mostraram que não é necessária a presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de surfactantes.

Amaral e colaboradores (2006) utilizaram também como fonte de carbono a glicose para a síntese do biossurfactante denominado Yansan, a partir de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Yansan apresentou alta atividade de emulsificação e capacidade de estabilização de emulsões óleo/água. Adicionalmente, meios de cultura contendo lactose como substrato foi utilizado para a produção de nanoproteínas, com propriedades emulsificantes, pela levedura *K. marxianus* (LUKONDEH et al., 2003).

Luna e colaboradores (2009) produziram biossurfactante por *C. sphaerica* a partir de um meio contendo resíduo de refinaria de óleo vegetal, milhocina e água do mar. A tensão superficial apresentou redução de 72 mN/m para 27mN/m, foram observadas também bons índices de emulsão e estabilidade em condições extremas.

Os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo microrganismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante. As espécies de *Candida* são capazes de incorporar diretamente ácido graxo para a produção de biossurfactante (COIMBRA et al., 2009; WEBER et al., 1992).

As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção de biossurfactante são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Por exemplo, quando se utilizam carboidratos como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de glicolipídeo, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogênicas (formação de lipídeos) e de formação da porção hidrofílica (através da via glicolítica) são

especialmente supridas pelo metabolismo microbiano, como mostra a Figura 8 (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

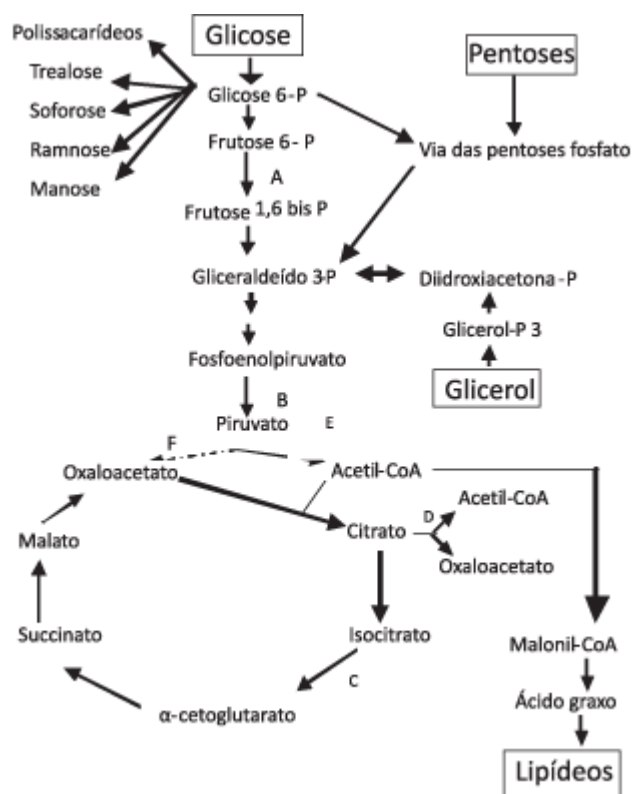


FIGURA 8- METABOLISMO INTERMEDIÁRIO RELACIONADO À SÍNTESE DE PRECURSORES DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DA UTILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS COMO SUBSTRATOS. ENZIMAS CHAVES PARA O CONTROLE DO FLUXO DE CARBONO: A FOSFOFRUTOQUINASE; B: PIRUVATO QUINASE; C: ISOCITRATO DESIDRO.

O substrato hidrofílico utilizado, como por exemplo, a glicose, glicerol ou outros, é degradado até formar intermediários da via glicolítica, como a glicose 6-fosfato que é um dos principais precursores dos carboidratos presentes na porção hidrofílica do biossurfactante. Para a produção de lipídeos a glicose é oxidada a piruvato por meio da glicólise, sendo o piruvato então convertido a acetil-CoA, que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo, um dos precursores para a síntese de lipídeos (HOMME; HUSE, 1993).

Por outro lado, quando um hidrocarboneto é utilizado como fonte de carbono o metabolismo microbiano se dirige principalmente à via lipolítica e à gliconeogênese (formação de glicose a partir de precursores diferentes das hexoses) podendo, desta forma, ser utilizado para produzir ácidos graxos ou sacarídeos. Para a produção dos

sacarídeos a via da gliconeogênese é ativada. Consiste na oxidação dos ácidos graxos via β -oxidação a acetil-CoA (ou propionil-CoA, no caso de ácidos graxos de cadeia ímpar). A partir da formação do acetil-CoA, as reações envolvidas na síntese dos precursores do polissacarídeo, tal como glicose 6-fosfato, são essencialmente o inverso daquelas envolvidas na glicólise. Entretanto, as reações catalisadas pelo piruvato quinase e fosfofrutoquinase-1 são irreversíveis; desta forma, outras enzimas, as quais são exclusivas para gliconeogênese, são requeridas para contornar tais reações. As principais reações são apresentadas na Figura 9, até a formação da glicose 6-fosfato que é a principal precursora dos polissacarídeos, dissacarídeos a serem formados para produção da porção hidrofílica dos glicolipídeos (TOKUMOTO et al, 2009).

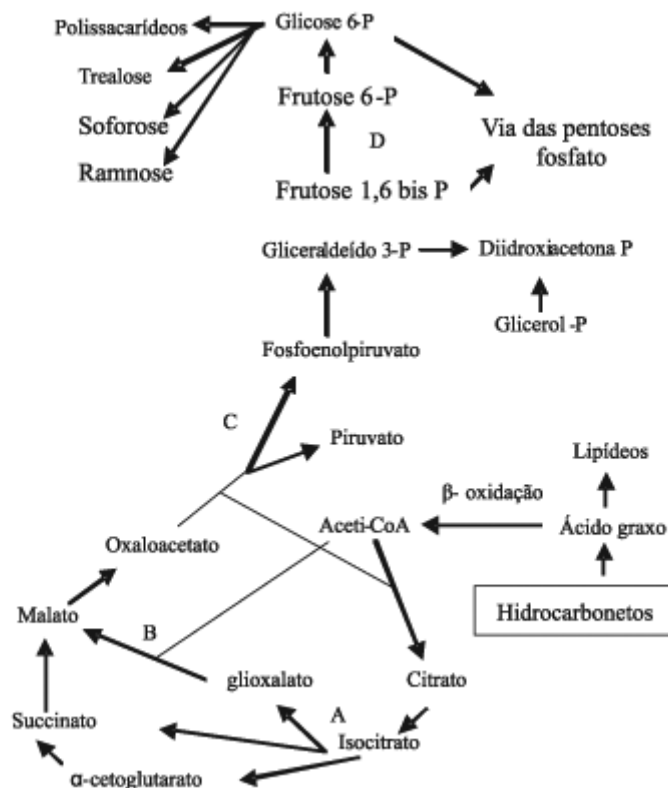


FIGURA 9 - METABOLISMO INTERMEDIÁRIO RELACIONADO À SÍNTESE DE PRECURSORES DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DA UTILIZAÇÃO DE HIDROCARBONETOS COMO SUBSTRATOS. AS ENZIMAS CHAVES SÃO: A, ISOCITRATO LIASE; B, MALATO SINTASE; C, FOSFOENOPIRUVATO CARBOXILASE; D FRUTOSE -1,

De acordo com Sydatk e Wagner (1987), a biossíntese do emulsificante pode acontecer seguindo quatro caminhos diferentes: síntese do carboidrato e do lipídeo; síntese da metade de carboidrato, enquanto a síntese da metade lipídica dependerá do comprimento da cadeia do substrato carbônico presente no meio; síntese da metade lipídica, enquanto a síntese da metade de carboidrato dependerá do substrato utilizado; síntese das metades carboidrato e lipídica, dependendo do substrato.

Portanto, um fator que altera a biossíntese do surfactante é o comprimento da cadeia do *n*-alcano utilizado como fonte de carbono. Kitamoto e colaboradores. (2001) estudaram a produção de lipídeos de manosileritritol (Mel) pela levedura *Candida antarctica* frente a diferentes *n*-alcanos. Observou-se que essa espécie não cresce nem produz biosurfactante em meio contendo *n*-alcanos de C₁₀ a C₁₈. Entretanto, quando cultivada em meio contendo *n*-alcanos de C₁₂ a C₁₈ houve produção, o octadecano foi o substrato que promoveu maior rendimento. Já em meio contendo *n*-alcanos com números de carbono maiores que 19 a produção foi mínima. A produção de manosileritritol lipídeo por *C. antarctica*, utilizando a metodologia *resting cell*, também foi significativamente afetada pelo comprimento da cadeia carbônica do substrato utilizado, sendo que o maior rendimento foi obtido utilizando pentadecano como fonte de carbono (KITAMOTO et al., 1992).

Cavalero e Cooper (2003) também mostraram que o rendimento da produção de biosurfactante cresce com o aumento do comprimento da cadeia do *n*-alcano utilizado (C₁₂ para C₁₅). Entretanto, Zinjarde e Pant (2002) demonstraram que a produção de biosurfactante por *Y. lipolytica* foi similar quando se alterou o comprimento da cadeia do *n*-alcano utilizado como substrato.

Candida glabrata foi avaliada para a produção de biosurfactantes a partir de óleo de algodão e glicose. Utilizou-se um planejamento fatorial, do qual se concluiu, com um nível de 95% de confiança, que apenas a concentração de glicose produziu um efeito positivo sobre o aumento do índice de emulsificação (SARUBBO et al, 2006; LUNA et al., 2005).

Casas e Ochoa (1999) estudaram a composição do meio de produção de soforolipídeos por *Candida bombicola*. As fontes de carbono que promoveram maior produção de biossurfactante foram glicose (100 g/L) juntamente com óleo de girassol (100 g/L), obtendo-se uma concentração de 120 g/L de biossurfactante após 144 h de fermentação.

Sarubbo e colaboradores (2006) aperfeiçoaram as condições de produção do biossurfactante por *C. lipolytica* em meio contendo óleo de canola (100 g/L) e glicose (100 g/L). O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial de 71 mN/m para valores em torno de 30 mN/m.

Vários óleos vegetais (milho, soja, açafrão e girassol) foram utilizados como substrato para a produção de biossurfactante por *Torulopsis bombicola*. O rendimento do biossurfactante foi praticamente igual em todos os óleos (COOPER; PADDOCK, 1984).

1.3.2.4.2 Fontes de carbono de origens renováveis

A utilização industrial dos biossurfactantes tem sido dificultada devido aos altos custos de produção associados 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 produtos (GALLERT; WINTER, 2002). Uma possível solução seria o reaproveitamento de subprodutos industriais como, por exemplo, aqueles provenientes da agroindústria.

Essa estratégia diminui os custos da produção do biossurfactante e, conseqüentemente, reduz a poluição causada por esses rejeitos quando lançados no meio ambiente (MANEERAT, 2005). A maioria das indústrias alimentícias utiliza gorduras e óleos, gerando grandes quantidades de resíduos graxos. Com o acúmulo desses resíduos, tem aumentado o interesse na utilização desses materiais como fonte de nutrientes para transformação microbiana (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Thanomsub e colaboradores (2004) utilizaram como fonte de carbono o óleo de soja queimado, proveniente da fritura, para produção de um biossurfactante glicolípido a partir de *Candida ishwadae*. Este surfactante exibiu alta atividade de emulsificação.

Bednarski e colaboradores (2005), com o objetivo de avaliar a utilização de rejeitos gordurosos, empregaram o *soapstock* (resíduo da fábrica de sabão) como fonte de carbono para indução da biossíntese de glicolídeos por leveduras (*C. antarctica* ATCC 20509 e *C. apicola* ATCC 96134). Os autores mostraram que a eficiência na síntese de glicolídeos por leveduras utilizando *soapstock* foi 7,5 a 8,3 vezes melhor que em meio não suplementado com *soapstock*.

O resíduo da refinaria de óleo vegetal de soja e a milhocina (resíduo industrial do processamento de milho) foram utilizados como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Os resultados obtidos demonstraram que o melhor rendimento em biossurfactante foi obtido em meio de cultivo contendo 5% de resíduo de óleo vegetal e 2,5% de milhocina (SOBRINHO, 2009).

Similarmente, Almeida e colaboradores (2006) utilizaram como substrato o resíduo de óleo e a milhocina, e por meio de planejamento fatorial demonstraram que a milhocina apresentou um resultado positivo, enquanto que o resíduo de óleo apresentou um efeito negativo.

A manipueira, água gerada na prensagem da mandioca, com alto teor de toxicidade para o meio ambiente, foi utilizada como fonte de carbono para a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*. Neste estudo foi realizado um planejamento fatorial completo para avaliar estatisticamente os principais efeitos entre as variáveis: concentrações de manipueira, de sulfato de amônio e de uréia. De acordo com os resultados, a redução da tensão superficial foi significativa em maior concentração de manipueira (10%) e menor concentração de sulfato de amônio e uréia (ANDRADE et al., 2006).

C. glabrata foi cultivada em resíduo da indústria de fabricação de margarina (gordura vegetal) para a produção de biossurfactante. Já nas primeiras 24 h de cultivo, houve uma redução da tensão superficial do meio de 71 para 27 mN/m, permanecendo constante até o final das 144 h de fermentação (GUSMÃO et al., 2010).

A produção de sofrorolipídeos por *C. bombicola* foi estimulada pela adição de gordura animal, um resíduo das indústrias de processamento de carne, obtendo-se uma produção do biossurfactante (120 g/L) em 68 h de fermentação (DESPHANDE ; DANIELS, 1995).

Uma fonte de carbono de origem renovável, importante atualmente, é o glicerol. O crescimento da produção mundial de biodiesel está gerando um excedente de glicerol, subproduto da fabricação do biocombustível. Os preços estão diminuindo, e tendem a diminuir mais, porque os mercados tradicionais do glicerol têm uma capacidade limitada de absorção de quantidades maiores do produto. O processo produtivo gera em média, para cada 10 kg de biodiesel, 1 kg de glicerol (MEESTERS et al., 1996).

Morita e colaboradores (2007) utilizaram glicerol para produção de glicolipídeos pela levedura *Pseudozyma antarctica*, obtendo um rendimento de 16,3 g/L do biossurfactante após 7 dias de cultivo. A biossíntese de sofrorolipídeo por *C. bombicola* foi também realizada utilizando-se subproduto da produção do biodiesel, composto por 40% de glicerol, 34% de compostos solúveis em hexadecano (92% de ácido graxo e 6% de monoalçilglicerol/triacilglicerol) e 26% de água. O rendimento da produção de sofrorolipídeo foi de 60 g/L.

O melaço de soja, um subproduto da produção de óleo de soja, e o ácido oleico foram utilizados como fonte de carbono para a produção de sofrorolipídeos pela levedura *C. bombicola*. Os autores reportaram um rendimento de 21 g/L após 7 dias de fermentação, um valor baixo quando comparado com a utilização de glicose e ácido oleico (79 g/L). (SOLAIMAN et al., 2004)

O óleo de pequi (*Caryocar coriaceum camb.*) extraído da semente de pequi foi utilizado como fonte de carbono para produção de biossurfactante por *C. lipolytica*. Um planejamento fatorial completo foi realizado, em 7 condições diferentes, visando à otimização do meio de produção, de diferentes combinações entre o óleo de pequi e a glicose. Após 48 h de cultivo, a menor tensão superficial do meio de produção foi de 31,96 mN/m, observando-se uma redução de 60% quando comparada à tensão superficial da água (SANTANA et al., 2005).

1.3.2.4.3 Fonte de nitrogênio

No meio de produção de biossurfactantes o nitrogênio é essencial para o crescimento celular, sendo de grande importância para a síntese de proteínas e enzimas. Diferentes compostos nitrogenados têm sido empregados na produção de biossurfactantes, tais como licor de milho, milhocina, (SANTANA et al, 2005) uréia, (VANCE HARROP et al., 2003) peptona, (KIM et al., 2006) extrato de levedura, (JING et al., 2006; CASA; OCHOA 1999; AMEZCUA VEGAS et al., 2007; ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2000) sulfato de amônio, (ZINJARDE; PANT 2002) nitrato de amônio, (THANOMSUB et al., 2004) nitrato de sódio, (BEDNARSKI et al. 2004) dentre outros como extrato de carne, farelo de soja e extrato de malte (MATA SANDOVAL et al, 2001). O extrato de levedura é a fonte de nitrogênio mais utilizada para a produção de biossurfactantes, mas sua concentração varia de acordo com o microrganismo e o meio de produção (MULLIGAN, 2009).

Coopper e Paddock (1984) estudaram o efeito da fonte de nitrogênio, tais como nitrato de sódio, cloreto de amônio, nitrato de amônio, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e extrato de levedura, na produção de biossurfactante por *T. bombicola* em frascos agitados. Observaram que o nitrato não é uma boa fonte de nitrogênio, pois apresentou redução na produção da biomassa. Já com o extrato de levedura, na concentração de 5 g/L, houve melhor produção de biossurfactante. Quando se substituiu o extrato de levedura por peptona, a concentração obtida de biossurfactante foi reduzida à metade e quando esta foi substituída por uréia a produção de biossurfactante foi muito baixa.

A produção de bioemulsificante por *Y. lipolytica* foi avaliada frente a diferentes fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio, uréia e nitrato de sódio. Os resultados mostraram que sulfato de amônio e cloreto de amônio foram às fontes de nitrogênio que propiciaram maior atividade de emulsificação, enquanto que esta atividade foi reduzida à metade quando se utilizou nitrato de amônio e uréia. Não foi detectada atividade de emulsificação quando o nitrato de sódio foi utilizado (ZINJARDE;PANT, 2002).

Casas e Ochoa, (1999) para otimizar o meio de produção, testaram diferentes concentrações de extrato de levedura (1 a 20 g/L) e observaram que em baixas concentrações de extrato de levedura (1 g/L) a produção de soforolipídeos produzidos por *Candida bombicola* é favorecida. Em concentrações de extrato de levedura, a produção de biossurfactante diminuiu, devido à exaustão da fonte de carbono, causada pelo grande crescimento da biomassa.

Lukondeh e colaboradores (2003) realizaram fermentações para a produção do bioemulsificante produzido por *Kluyveromyces marxianus* FII 510700, utilizando como fontes de nitrogênio extrato de levedura (2 g/L) e sulfato de amônio (5 g/L). O bioemulsificante resultante apresentou alta atividade de emulsificação (76% de fase emulsionada após 90 dias a 4 °C).

Johnson e colaboradores (1992) relataram a influência da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante pela levedura *Rhodotorula glutinis* IIP-30, tendo o nitrato de potássio apresentado o melhor desempenho em relação às outras fontes utilizadas (sulfato de amônio e uréia).

Vários pesquisadores optaram por utilizar mais de um tipo de fonte de nitrogênio, obtendo boas concentrações de biossurfactante. Vance-Harrop e colaboradores. (2000) utilizaram como fonte de nitrogênio sulfato de amônio (0,1%) juntamente com uréia (0,1%) para a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*, detectando alta atividade de emulsificação.

Com o objetivo de aperfeiçoar o meio de produção do bioemulsificante por *C. lipolytica*, Albuquerque e colaboradores (2006) utilizaram planejamento fatorial

para investigar efeitos e interações das concentrações de uréia, sulfato de amônio, di-hidrogênio fosfato de potássio e óleo de milho na atividade de emulsificação. A presença de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e óleo de milho teve uma influência positiva na atividade de emulsificação. Por outro lado, a uréia teve uma influência negativa.

A produção de biossurfactante ocorre principalmente quando a fonte de nitrogênio está esgotada, durante a fase estacionária do crescimento da biomassa. A Figura 10 apresenta o crescimento celular da levedura *C. antarctica* em batelada, em meio contendo íon amônio (10 g/L) e peptona (1 g/L) como fontes de nitrogênio. Observa-se que a produção do glicolípídeo ocorre quando há o esgotamento da fonte de nitrogênio (entre 50 e 200 h), atingindo um valor de 38 g/L após 200 h de fermentação (KIM et al., 2006).

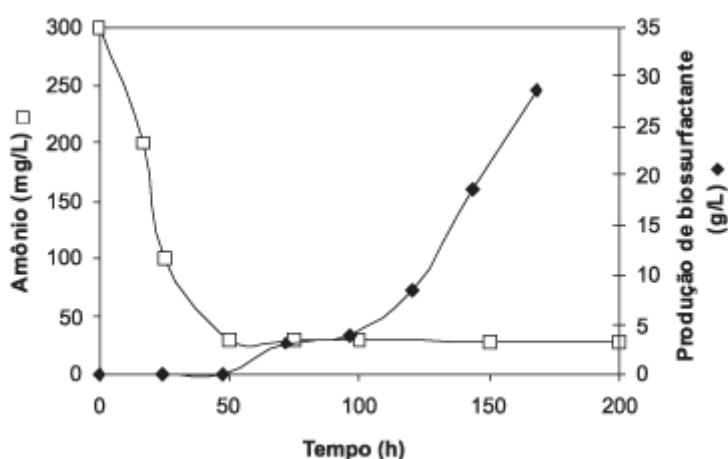


FIGURA 10 - CULTIVO DE CANDIDA ANTARTICA MOSTRANDO O CONSUMO DE NITROGENIO E O INÍCIO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE MEL-SY16

Silva e colaboradores (2010) sugeriram um mecanismo pelo qual a síntese de biossurfactante acontece em condições limitantes de nitrogênio. Segundo os autores, essa condição causa um declínio na atividade específica da isocitrato desidrogenase (dependente de NAD^+ e NADP^+), enzima responsável pela oxidação do isocitrato a α - cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico. Como o declínio da atividade leva a um acúmulo de isocitrato e subsequente citrato na mitocôndria, ambos são transportados para dentro do citosol, onde o citrato é clivado pela citrato

sintase, originando acetil-CoA, que é o precursor da síntese de ácido graxo aumentando, dessa forma, a produção de biossurfactante.

Um parâmetro bastante estudado pelos pesquisadores é a relação quantitativa entre as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas para a produção de biossurfactante. Foi estudado o efeito de diferentes relações C/N na produção do bioemulsificante produzido por *Rhodotorula glutinis*, utilizando diferentes hidrocarbonetos. A atividade de emulsificação aumentou com o aumento da relação C/N na maioria dos casos, sendo esse aumento observado em condições limitantes de nitrogênio (ANDRADE et al., 2006). Observações similares foram obtidas com *C. tropicalis* (SINGH et al., 2007).

A Tabela 4 resume alguns dados da produção de biossurfactante por leveduras, apresentando as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio de cultivo. Coeficientes de rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,012 a 0,675 g/g e valores de produtividade volumétrica (Q_P) entre 0,021 e 1,76 g/L h têm sido relatados na produção de biossurfactante por levedura (FONTES et al., 2008).

TABELA 4 – PRODUÇÃO DE LEVEDURAS X CONCENTRAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

| Cepa | Fonte C (g/L) | Fonte N (g/L) | PB ^a | T ^b (h) | Modo de Condução | Y _{p/s} (g/g) | X ^c (g/L) | Y _{p/x} ^d (g/g) | Q _p (g/L h) | Ref. |
|------------------------------------|---|--------------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| <i>T. bombicola</i> ATCC22214 | Glicose (500) Óleo de açafrão (1000) | Ext. Levedura (5) | 18 (g/L) | 48 | Batelada | 0,012 | 12,5 | 1,45 | 0,375 | Cooper; Padock, 1984 |
| <i>C. bombicola</i> ATCC22214 | Glicose (100) Gordura Animal (100) | CSL ^e (4) Uréia (1,5) | 120 (g/L) | 68 | Batelada | 0,6 | 30 | 4 | 1,76 | Dephande; Daniels, 1995 |
| <i>C. tropicalis</i> ATCC20336 | Hexadecano (10) | Ext. Levedura (0,3) Peptona (0,5) | 0,81 U | 72 | Batelada | ND ^f | ND | ND | ND | Singh; Desai, 1989 |
| <i>D. polymoephus</i> ATCC20499 | Hexadecano (10) | Ext. Levedura (0,3) Peptona (0,5) | 0,11 U | 72 | Batelada | ND ^f | ND | ND | ND | Singh; Desai, 1989 |
| <i>Candida sp.</i> SY16 | Glicose (15) Óleo de soja (15) | Peptona (1) | 95 (g/L) | 200 | Batelada Alimentada | 0,475 | 15,0 | 6,33 | 0,475 | Kim et al, 2006 |
| <i>Candida Bobicola</i> | Glicose (100) Óleo de girassol (100) | Ex. de levedura (1) | 120 (g/L) | 192 | Batelada <i>Resting cell</i> | 0,6 | 23,0 | 5,21 | 0,625 | Casas; Ochoa 1999 |
| <i>C. antarctica</i> | Óleo de soja (80) | Extrato de levedura | 46 (g/L) | 144 | Batelada | 0,57 | 28,4 | 1,61 | 0,32 | Aamczak; Bednarski, |

| ATCC20509 | | (1) | | | | | | | | 2000 |
|---|---------------------------------|---|-------------|-----|--------------|-------|------------|-------|-------|---------------------------|
| <i>C. antarctica</i> | Soapstock (100) | Ext. levedura (1) | 15,9 (g/L) | 85 | Batelada | 0,636 | 1,8 | 8,83 | 0,187 | Bednarski et al, 2004 |
| ATCC20509 | | NaNO ₃ (2) | | | Alimentada | | | | | |
| <i>C. antarctica</i> | Óleo de amêndoa (80) | Ext. levedura (1) | 47 (g/L) | 144 | Batelada | 0,587 | 24 | 1,95 | 0,326 | Ktamoto et al., 1992 |
| <i>T-34</i> | | | | | Resting cell | | | | | |
| <i>C. antarctica</i> | n- octadecano(80) | Ext. levedura (1) | 40,5 (g/L) | 144 | Batelada | 0,675 | 16 | 2,53 | 0,281 | Ktamoto et al., 2001 |
| <i>T-34</i> | | NaNO ₃ (2) | | | Resting cell | | | | | |
| <i>Wickerhamiela Domercqiae</i> Y _{2A} | Glicose (50) | Ext levedura (2) | ND | ND | Batelada | ND | ND | ND | ND | Jing et al., 2006 |
| | Óleo de canola (20) | | | | | | | | | |
| <i>C. ingens</i> | Óleo de milho (20) | Ext levedura (2) | 5,6 (g/L) | 168 | Batelada | 0,28 | 23,90 | 0,234 | 0,033 | Amézcuca Veja et al, 2007 |
| <i>CB- 216</i> | | | | | | | | | | |
| <i>C. lipolitica</i> | Hexadecano (10) | Ext levedura (6) | 1,3 U/mL | 130 | Batelada | ND | ND | ND | ND | Ciriliano; Carman, 1984 |
| <i>ATCC8662</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Y. lipolítica</i> | Hexadecano (10) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (5) | 3,0 U/mL | 144 | Batelada | ND | 3 | ND | ND | Zinjarde; Paint, 2002 |
| <i>NCIM3589</i> | | | | | | | | | | |
| <i>C. lipolitica</i> | Óleo de babaçu (50) | Uréia (0,25) | 0,66 U/mL | 60 | Batelada | ND | 6 UFC/mL | ND | ND | Vance Harrop et al, 2003 |
| <i>IA1055</i> | | | | | Alimentada | | | | | |
| <i>C. lipolitica</i> | Óleo de milho (50) | Uréia (0,1) | 0,235 U/mL | 168 | Batelada | ND | 3,5 UFC/mL | ND | ND | Vance Harrop et al, 1999 |
| <i>IA1055</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Y. lipolítica</i> | Glicose (20) | Peptona (6,4) | 2,0 U/mL | 170 | Batelada | ND | ND | ND | ND | Amaral et al., 2006 |
| <i>IMUFRJ 50682</i> | | Ext. levedura (10) | | | | | | | | |
| <i>C. lipolitica</i> | Glicose (100) | Ext de levedura (2) | 8 (g/L) | 48 | Batelada | 0,04 | ND | ND | 0,166 | Farias; Sarubbo., 2006 |
| <i>UCP0988</i> | Óleo de canola (100) | | | | | | | | | |
| <i>K. marxianus</i> | Lactose (40) | Ext levedura (2) | ND | ND | Batelada | ND | ND | ND | ND | Lukondeh et al, 2003 |
| <i>FII 510700</i> | | (NH ₄) ₂ SO ₄ (5) | | | | | | | | |
| <i>C. apícola</i> | Soapstock (100) | Ext levedura (1) | 10,3 (g/L) | 144 | Batelada | 0,103 | 6,5 | 9,70 | 0,071 | Bedmarsi et al, 2005 |
| <i>ATCC20509</i> | | NaNO ₃ (2) | | | | | | | | |
| <i>C. glabrata</i> | Glicose (50) | Ext levedura (3) | 10 (g/L) | 144 | Batelada | 0,08 | 18 cél/mL | ND | 0,069 | Luna et al., 2005 |
| <i>UCP 1002</i> | Óleo de semente de algodão (75) | NH ₄ NO ₃ (1) | | | | | | | | |
| <i>Candida ishiwadae</i> | Óleo de soja queimado (40) | Ext levedura (0,5) | 0,25 g | 168 | Batelada | ND | ND | ND | ND | Thanomsub et al, 2004 |
| | | NH ₄ NO ₃ (3) | | | | | | | | |
| <i>C. sphaerica</i> | Resíduo de óleo vegetal (50) | Milhocina (25) | 3,116 (g/L) | 144 | Batelada | 0,06 | 2,264 | 1,37 | 0,021 | Sobrinho et al, 2006 |
| <i>UCP 995</i> | | | | | | | | | | |

^aPB: produção de biossurfactantes; ^bT: tempo de produção de biossurfactante; ^cX: concentração de células produzidas; ^dY_{pbx}: coeficiente de rendimento do biossurfactante em relação à concentração celular; ^eCSL: corn steep liquor; ^fND: não determinado

1.3.2.4.5 Forma de condução do processo

Após a otimização do meio de cultivo, diferentes formas de condução de processos para obtenção de biossurfactantes têm sido descritas na literatura, de maneira a incrementar a produção desses (FONTES et al., 2008).

De forma geral, um processo pode ser operado das seguintes formas: descontínuo (com um inóculo por tanque; com recirculação de células); semicontínuo (batelada alimentada - com ou sem recirculação de células); descontínuo alimentado (batelada simples com ou sem recirculação de células); contínuo (conduzido em um ou em vários reatores; com ou sem recirculação de células) (SYLDATK; WAGNER, 1987).

Sendo as fermentações por batelada simples e batelada alimentada é as mais utilizadas para estudos de produção de biossurfactante por leveduras. Os cultivos por batelada e batelada alimentada são modos de condução de bioprocessos, cujas características tornam suas aplicações atrativas para uma grande gama de processos fermentativos, por exigirem menos em termos de equipamentos, acompanhamento e manutenção. São também mais seguros em relação ao problema da manutenção das condições de assepsia, pois ao final de cada batelada o reator é esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo, com todos os controles necessários, a fim de assegurar a presença única do microrganismo responsável pelo processo (SYLDATK; WAGNER, 1987).

No decorrer do processo por batelada simples nada é adicionado, exceto oxigênio no caso de processos aeróbicos, antiespumante e ácido ou base para controle do pH. Entretanto, durante a batelada alimentada os nutrientes, ou parte deles, são adicionados ao biorreator por uma corrente de alimentação que, por não existir descarga, provoca um contínuo incremento do volume ocupado no reator. Normalmente, essa forma de condução de bioprocessos é utilizada em sistemas nos quais o agente microbiano seja fortemente sensível a fenômenos de inibição por substrato, ou repressão catabólica, tipicamente manifestados em sistemas que

apresentem cinética de formação de produto não associado ao crescimento (FONTES et al., 2008).

Resultados bastante promissores vêm sendo publicados baseados no uso de batelada alimentada para a produção de biossurfactante. A produção de lipídeos de manosileritritol por *C. antarctica* foi de 95 g/L após 200 h de fermentação por batelada alimentada, utilizando glicose e óleo de soja como fonte de carbono. O rendimento foi 2,6 vezes maior que o rendimento obtido na produção deste por batelada simples (37g/L). (KIM et al., 2006).

Rau e colaboradores (2005) produziram biossurfactante por *Pseudozyma aphidis* utilizando óleo de soja e glicose, em batelada alimentada, obtendo uma alta produção de biossurfactante (168 g/L) ao final de 11 dias de fermentação.

Outros modos de condução de processo também foram avaliados. Kim e colaboradores. (2006) estudaram a produção de biossurfactante pela levedura *T. bombicola*, via processo contínuo, com o objetivo de investigar os efeitos da glicose e do óleo de soja no crescimento celular e na produção de biossurfactante.

1.3.2.4.6 Temperatura, pH, aeração e agitação

O controle e a otimização das condições operacionais como temperatura, agitação, pH e aeração são fundamentais para o sucesso da ampliação de escala de produção de biossurfactantes, capazes de torná-los economicamente competitivos em relação aos surfactantes químicos (MULLIGAN, 2009).

O efeito do pH em relação à produção de biossurfactante por *C. antarctica* foi estudado utilizando-se tampão fosfato em diferentes pHs (4-8). Todos os tampões utilizados resultaram em uma diminuição do rendimento da produção do biossurfactante, quando comparados com a água destilada (KITAMOTO et al., 2001).

Zinjarde e Pant (2002) estudaram a influência do pH inicial na produção do biossurfactante por *Y. lipolytica*. Observaram que a maior produção foi obtida em pH inicial igual a 8,0, que corresponde ao pH natural da água do mar.

O efeito da temperatura na produção de manosileritritol por *resting cell* e em condições de crescimento celular por *C. antarctica* foi estudado. Em ambos os casos, a maior produção foi observada a 25 °C, sendo que por *resting cell* a produção de biossurfactante ocorreu em uma faixa ampla de temperatura. O efeito da aeração também foi testado utilizando diferentes volumes de meio (20-60 mL) em um frasco de erlenmeyer de 300 mL. O maior rendimento foi obtido em um volume de 30 mL, que indica uma relação $V_m(\text{volume de meio})/V_f(\text{volume final}) = 0,1$, demonstrando a forte influência da aeração nesse sistema (KITAMOTO et al., 1992).

Aeração e agitação são dois fatores importantes que influenciam na produção de biossurfactante, pois facilitam a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa (CALVO et al., 2009). Adamczak e Bednarsk (2000) avaliaram a influência da aeração na síntese de biossurfactante por *C. antarctica*. A maior produção de biossurfactante (45,5 g/L) foi alcançada quando a levedura foi cultivada em meio com uma taxa de aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por min) e a concentração de oxigênio dissolvido controlada em 50% do valor da saturação. Entretanto, quando se alterou a aeração para 2 vvm, houve uma produção intensa de espuma e a produção de biossurfactante decaiu 84%. A formação de espuma não é um fator desejado na produção, uma vez que retira do meio reacional parte do biossurfactante, biomassa e lipídeos.

Guilmanov e colaboradores (2002) investigaram o efeito da aeração, por meio de experimentos em frascos agitados, na produção de sofrorolipídeos por *C. bombicola*. O maior rendimento foi obtido com a taxa de aeração entre 50 e 80 mM $O_2/l\ h^{-1}$.

Com o objetivo de ampliar o processo de produção do bioemulsificante por *C. lipolytica*, da escala de frascos para a escala de biorreator, Albuquerque e colaboradores (2006) estudaram os efeitos da agitação e da temperatura na produção de biossurfactante frente a diferentes óleos. Verificou-se que o aumento da temperatura exerceu um efeito negativo significativo sobre as atividades de emulsificação para as emulsões água em hexadecano e água em óleo de milho e, que o aumento da velocidade de agitação produziu um efeito positivo sobre a

atividade de emulsificação de água em óleo de canola. As melhores condições de operação para a produção do biossurfactante foram temperatura de 28 °C e agitação de 300 rpm.

A atividade de emulsificação do biossurfactante produzido pelas leveduras *Candida tropicalis* e *Debaryomyces polymorphus* não foi alterada, em uma faixa de pH entre 4 e 11 (SINGH; DESAI, 1989). Já a produção do bioemulsificante produzido pela levedura *Rhodotorula glutinis* durante fermentação em batelada alimentada foi significativamente influenciada tanto pela temperatura como pelo pH, sendo as condições ótimas obtidas para a produção à temperatura de 30 °C e pH 4.

Na mesma direção, Desphande e Daniels (1995) também avaliaram o efeito da temperatura no crescimento de *C. bombicola* e na produção de sofrorolípídeos. O crescimento celular máximo foi obtido a 30 °C, enquanto que a produção de sofrorolípídeos foi máxima a 27 °C.

A maioria das fermentações realizadas para produção de biossurfactante ocorre em uma faixa de temperatura de 25 a 30 °C. Existem vários trabalhos na literatura que estudaram a influência desse parâmetro. Casas e Garcia Ochoa (1999) mostraram que as quantidades de sofrorolípídeo obtidas por *C. bombicola* em ambas as temperaturas (25 e 30 °C) foram próximas. A fermentação realizada a 25 °C apresentou crescimento menor de biomassa e maior taxa de consumo de glicose em comparação à fermentação realizada a 30 °C.

A acidez do meio de produção foi um parâmetro correlacionado com a eficiência da síntese de glicolípídeos por *C. antarctica* e *C. apicola*. Mantendo o pH em 5,5 obteve-se maior produção de glicolípídeos. Contudo, quando não se ajustou o pH no meio de cultura, obteve-se um efeito negativo na eficiência de síntese (BEDNARSKI et al., 2004) Um efeito similar foi observado na produção de glicolípídeos por *C. antarctica*, através de batelada alimentada. O maior rendimento da produção foi com controle do pH, mantendo-se em 4, sendo significativamente melhorada quando comparada com a fermentação sem o controle do pH (LUNA et al., 2009).

1.3.2.5 RESÍDUOS INDUSTRIAIS

A sociedade atual caracteriza-se pelo aumento de despesas, a necessidade de reutilizar materiais e com a preocupação ambiental. Conseqüentemente vem dando uma ênfase maior a recuperação, reciclagem e reutilização de diversos resíduos.

A necessidade de preservação ambiental leva à reutilização de diversos resíduos industriais. Isso é particularmente válido para os alimentos e as indústrias de produção de alimentos cujos resíduos, efluentes e co-produtos podem ser reutilizados. Estas indústrias produzem grandes volumes de resíduos sólidos e líquidos, resultantes da produção, preparação e consumo dos alimentos e quando descartados geram poluição e representam uma grande perda de nutrientes e biomassa (LAUFENBER et al., 2003). Os resíduos industriais, particularmente das indústrias de alimentos, vêm sendo utilizados em bioconversão e chamando mais atenção devido à possibilidade de aplicação na produção de bioadsorventes (SINGH et al., 2007).

1.3.2.5.1 Óleos e resíduos oleosos

Óleos e gorduras são encontrados em todas as células vivas. A produção mundial de óleos e gorduras está em torno de 2,5 a 3 milhões de toneladas, sendo 75% da produção derivada das plantas (HABA et al., 2000). A maioria dos óleos e gorduras é utilizada na indústria de alimentos, gerando grande quantidade de resíduos, sebo, banha, óleos ou sabão em barra. A disposição final destes resíduos ainda é um enorme problema, o que justifica o interesse em sua utilização, através de transformação microbiológica (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Volbrecht e colaboradores (1999) investigaram a produção de biossurfactantes utilizando óleo vegetal doméstico para converter recursos renováveis em produtos valiosos. Nestes estudos com a *Tsukamurella* DSM 4370, obtiveram maior crescimento e produção de glicolipídios usando óleo vegetal natural de preferência com complexos médios e com fontes de carbono hidrofóbicas.

Mercade et. al (1994) reportaram o uso de óleo de oliva do efluente do moinho (OOME) como substrato na produção de biossurfactantes (raminolípeos) a partir de *Pseudomonas* sp.

Óleos de frituras são produzidos e utilizados em larga escala tanto em indústria de alimentos como em residências. Depois de usados, a composição desses óleos é alterada, apresentando mais de 30% de componentes polar (KOCK et al. 1996), dependendo da variedade da comida, do tipo de fritura e de quantas vezes o mesmo óleo é utilizado. Haba et. al (2000) compararam a composição de óleos de oliva e girassol bastante utilizados com óleos menos utilizados, comprovando que a maior diferença está na presença de 22,52% de ácidos gordurosos com cadeias curtas (<C10), ácido mirístico e ácido láurico nos óleos mais utilizados. Em seus estudos foram selecionados 36 microrganismos para a produção de biossurfactantes submersos em culturas com 2% de resíduo de óleo de oliva ou girassol como fontes de carbono, utilizando uma baixa tensão superficial (menor que 40 mN/m) como critério de seleção.

Resíduos ou óleos lubrificantes utilizados se tornaram um sério problema ambiental. No meio ambiente, o resíduo de óleo pode se ligar a matéria orgânica, partículas minerais ou organismos (SHALE et al., 1989). Mercade et. al (1994) selecionaram microrganismos capazes de utilizar resíduo de óleo lubrificante para produzir biossurfactantes. Entre as 44 amostras de solo contaminadas por hidrocarbonetos isoladas, 18 foram capazes de crescer no resíduo com uma única fonte de carbono. Uma caracterização complementar dessas amostras mostrou a produção de glicolípidios trealose (por *Rhodococcus* sp.) e lipopeptídeos (por *Bacillus* sp.). Esta é uma observação interessante porque a produção de lipopeptídeos é reportada em sua maioria por microrganismos cultivados em substratos hidrofóbicos (COOPER et al., 1981). Essas amostras representaram uma descoberta valiosa dos novos componentes, com propriedades surfactantes e potencial de aplicação em biorremediação de solos e águas (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Desta forma, a produção de biossurfactantes a partir de óleos vegetais, óleos vegetais usados e óleos lubrificantes usados (óleo de motor) é uma estratégia alternativa na utilização de resíduos gerados pelas indústrias de automóvel e de

alimentos, contribuindo assim para a redução da geração de resíduos (PATTANATHU et al., 2008).

1.3.2.5.2 Agroindustriais

Milhões de toneladas de resíduos perigosos e não perigosos são gerados por ano em todo o mundo. Para as indústrias, o tratamento e a disposição final destes resíduos representa um custo alto, assim há uma grande necessidade de melhor destinação para esses resíduos baseados na redução, reutilização e reciclagem. A utilização de substratos para a produção de biossurfactantes está relacionada principalmente às colheitas e aos resíduos das agroindústrias tropicais. Esta colheita inclui mandioca, soja, açúcar das beterrabas, batata doce, batata inglesa e sorgo doce além de resíduos de colheitas tais como farelo, palha do trigo e do arroz, casca da soja, milho, bagaço da cana-de-açúcar e mandioca e resíduos provenientes dos processos industriais do café como a polpa, casca, e o café que já caiu do pé. Resíduos de processos industriais de frutas como a polpa de maçãs e de uvas, o resíduo do abacaxi e do tratamento da cenoura, o resíduo da banana, o resíduo do petróleo em operação de moagem como na torta de coco, torta de soja, torta de amendoim, farinha grossa da canola e o resíduo do moinho do óleo da palma e outros, como sabugo do milho, casca da alfarroba, resíduo do chá, raízes de chicória, etc. (PANDEY et. al., 2000). Substratos adicionais foram sugeridos na produção de biossurfactantes, especialmente aqueles que são miscíveis em água, como melão, leite ou resíduos de destilaria (DANIEL et al. 1998; MAKKAR; CAMEOTRA, 1999).

Um substrato em potencial para a produção de surfactantes encontra-se disponível no processamento industrial de batatas. Um estudo de Fox e Bala (2000) destacaram o potencial no tratamento ambiental e a viabilidade econômica dos resíduos ricos em amido, provenientes do processo industrial da batata. As batatas são compostas por 80% de água, 17% de carboidratos, 2% de proteínas, 0,1% de gordura e 0,9% de vitaminas, minerais inorgânicos e traço de outros elementos. Elas são ricas fontes de carbono (amido e açúcar), nitrogênio e enxofre (proteínas),

minerais inorgânicos, vitaminas. Estabelecido um meio de cultura contendo batata, simulando sólidos e líquidos dos resíduos da batata, e uma batata comercialmente preparada com um meio rico em sais minerais, foi colocado em frascos a fim de avaliar o crescimento, a tensão superficial e o consumo dos carboidratos. A tensão superficial foi reduzida de 71,3 mN/m para 28,3 mN/m na simulação do meio de batata sólida e a CMC foi 0,10 g/L.

Thompson e colaboradores (2000) utilizaram efluentes da batata como substrato para a produção de surfactin a partir do *Bacillus subtilis* 21332, obtendo altos rendimentos de biossurfactantes.

Na Índia, estão sendo feitos esforços para utilizar alguns resíduos agroindustriais para a produção de biossurfactantes. O melaço é um dos bioprodutos da indústria de açúcar e é o material utilizado em maior quantidade para a produção de levedura do pão, ácidos cítricos, leveduras alimentares, acetona, ácidos orgânicos e aminoácidos. O melaço tem um custo baixo se comparado com outras fontes de açúcar e é rico em vários nutrientes além de sacarose, sendo muito atrativo para utilização na microbiologia (SATPURE et al., 2010). O Melaço também foi utilizado como fonte de carbono em meio mineral para a produção de biossurfactantes por amostras de *Bacillus subtilis* (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999). A produção de biossurfactantes foi máxima na fase estacionária e apresentou uma boa emulsificação na recuperação do óleo em areia.

Sudhakar-Babu et. al (1996) estudaram a produção de biossurfactantes a partir de resíduos de soro como substrato. Os resultados indicaram que os valores específicos de crescimento (μ_{max}) e os valores específicos da produção (V_{max}) dos resíduos foram melhor comparando-o com o meio padrão, revelando que os resíduos industriais (destilado e soro) podem ser utilizados como substratos para a produção de biossurfactantes.

Dubey e Juwakar (2001) estudaram a produção de biossurfactantes por um isolado de solos lamosos de *Pseudomonas aeruginosa* amostra BS2 suplementado com glicose e hexadecano como substratos solúvel e insolúvel, respectivamente. A amostra BS2 reduziu a tensão superficial na fermentação de 57 para 27 mN/m, sendo a produção de biossurfactantes de 0,97 g/L. O isolamento do biossurfactante

com potente atividade superficial permitiu a redução da tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, formando 100% emulsificante estável com uma variedade de água e compostos insolúveis. A atividade efetiva do biossurfactante também foi evidenciada pela reduzida CMC (0,028 g/L).

Outro bom substrato para a produção de biossurfactantes é o soro láctico. Soro láctico é composto por 75% lactose, 12-14% proteínas, ácidos orgânicos e vitaminas. A disposição final do soro é um dos maiores problemas de poluição para os países que dependem dele economicamente. Kock et. al (1996) testaram com sucesso a produção de biossurfactantes utilizando lactose a partir de bactérias.

1.3.2.6 APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES

O maior mercado para estes biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem a biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação avançada de petróleo (MEOR), que consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos do seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os surfactantes reduzem a tensão superficial óleo – rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas (SEN, 2008; SINGH et al., 2007).

A produção de agentes surfactantes representa uma alternativa não só para o controle e prevenção da poluição ambiental, mas também para os diversos setores industriais, como o de produtos de limpeza, sabão e detergentes, de petróleo, de cosméticos e de alimentos (NEVES et al., 2004).

1.3.2.6.1 Aplicações ambientais dos biossurfactantes

Os soforolípídeos vêm sendo utilizados na remoção de óleos de areias (COOPER; PADDOCK, 1984). Algumas aplicações reportadas na literatura mostram o potencial de remediação de solo contaminado por metais pesados. São produzidos em grandes rendimentos possuindo bom potencial econômico.

1.3.2.6.2 Biorremediação por biossurfactante

Um dos problemas associados à biodegradação de compostos hidrofóbicos, os quais incluem os hidrocarbonetos do petróleo, é sua ligação às partículas do solo e a pouca solubilidade em água, resultando em baixa biodisponibilidade para os microrganismos, o que pode retardar ou até mesmo paralisar o processo de degradação. Um dos métodos mais investigados para a resolução deste problema é a utilização de compostos surfactantes (JENNINGS; TANNER, 2000).

A maior utilização dos surfactantes é na indústria de produtos de limpeza, sabão e detergentes, petróleo, cosméticos e de produtos de higiene. Em relação às aplicações industriais, uma destaca-se, é a recuperação melhorada do petróleo (MEOR). Neste sentido, o estudo da produção de agentes surfactantes representa uma alternativa não só para o controle e prevenção da poluição ambiental, mas também para os diversos setores industriais.

A limpeza de locais marítimos e terrestres contaminados por derramamentos de petróleo, remoção da borra oleosa de tanques de estocagem, remoção de metais pesados de solos e córregos contaminados, assim como um aumento geral nos processos de recuperações de óleo de reservatórios são possíveis aplicações para os biossurfactantes (VAN DYKE et al., 1991).

Segundo Kosaric e colaboradores (1984), os biossurfactantes têm um enorme potencial de aplicação nas indústrias em geral. Na indústria petrolífera, podem ser utilizados na emulsificação e redução da viscosidade de óleos, dispersão de sólidos e modificação das propriedades reológicas dos fluidos durante a perfuração dos poços, na recuperação do petróleo, na emulsificação e dispersão dos sedimentos e do iodo na limpeza dos poços e tanques de armazenagem e ainda como agente

inibitório da corrosão de equipamentos, oleodutos e tanques de caminhões transportadores.

1.3.2.7 PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Muitos biossurfactantes e seus processos de produção já foram patenteados, embora poucos tenham sido comercializados. O atual custo de produção de biossurfactantes é governado principalmente pelo ganho econômico na produção versus o custo da aplicação. O processo de fermentação possui a chave para reduzir os custos do processo de produção (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Estima-se que o material bruto represente até 30% do custo final de produção. Geralmente, os biossurfactantes são produzidos durante o crescimento em hidrocarbonetos, os quais são caros, aumentando o custo total do processo. Por outro lado, substratos solúveis e menos dispendiosos podem ser utilizados em algumas ocasiões. Na procura de substratos de baixo custo, os óleos vegetais e os efluentes industriais surgem como promissores. O uso de resíduos agrícolas, resíduos das indústrias de processamento de batatas e resíduos gordurosos de frangos tem sido mencionado. A manipulação da composição do meio de cultura também tem permitido o aumento da produtividade, assim como a otimização das condições de cultivo (GALLERT; WINTER, 2002; TULEVA et al., 2002). Devido às considerações econômicas das indústrias petrolíferas, a maioria das aplicações dos biossurfactantes podem envolver o líquido metabólico ou preparações brutas (TULEVA et al., 2002). Depois das indústrias de óleos, as indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticos representam um volume menor, sendo categorias que podem absorver os maiores custos dos biossurfactantes (RON; ROSENBERG, 2002).

A produção de biossurfactantes com aplicações específicas e o desenvolvimento de propriedades de alto valor associado à modelagem computacional, é considerado o ponto central do desenvolvimento de diversos projetos em andamento (Figura 11).

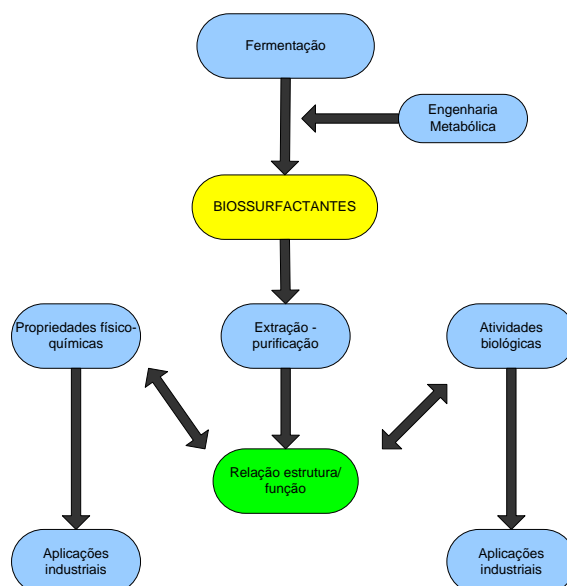


FIGURA 11- PROCESSO DE PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

O “Jeneil Biosurfactant Corporation” começou a produção comercial de biossurfactantes, como os raminolipídeos. O custo de produção é alto e limita a aplicação comercial dos mesmos, porém, eles podem ser reduzidos utilizando substratos mais econômicos como os resíduos industriais (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

De acordo com a “Technical Insights”, da divisão de Frost & Sullivan (USA), surfactantes não-iônicos e microbiológicos começaram a surgir fortemente no mercado industrial. Pattanathe (2008) estimou que os biossurfactantes capturassem em torno 10% do mercado dos surfactantes comerciais até 2020, o que representa investimento de U\$ 200 milhões. O mercado atual de surfactantes químicos está representado na figura 12. Segundo MULLIGAN (2009) as aplicações mais promissoras é no derramamento de óleo e a limpeza de tanques de estocagem, a remoção de óleo bruto, a recuperação de óleo e a biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos ou outros poluentes como os metais pesados.

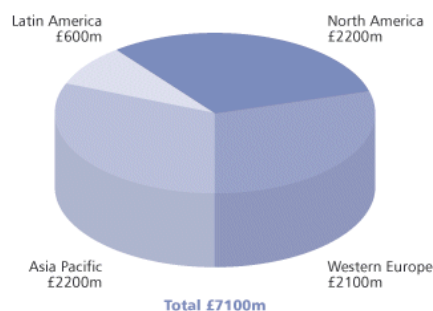


FIGURA 12 - MERCADO MUNDIAL DE SURFACTANTES QUÍMICOS

1.3.2.8 EXTRAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

A recuperação e concentração de biossurfactantes a partir de líquido metabólico obtido no processo fermentativo é um dos fatores determinantes do alto custo de produção. As baixas concentrações obtidas e a natureza anfipática dos surfactantes microbianos limitam sua recuperação (DELEU; PAQUOT, 2004). Vários métodos para isolamento de biossurfactantes são utilizados, incluindo centrifugação a altas rotações, ultrafiltração, precipitação com ácidos e sais, extração por solventes e cromatografia por adsorção (SYLDAKT; WAGNER, 1987; MULLIGAN, 2009).

Uma grande variedade de solventes orgânicos como metanol, etanol, acetato de etila, pentano, acetona, clorofórmio e diclorometano têm sido utilizados, isoladamente ou combinados, na extração de biossurfactantes (DESAI; BANAT, 1997). As misturas de clorofórmio e metanol em diferentes proporções têm fornecido os melhores resultados, uma vez que facilitam o ajuste da polaridade do agente extrator ao material a ser extraído. Contudo, o uso de clorofórmio para extrações preparativas que demandam um grande volume de solvente não é economicamente garantido (HEITMANN et al., 1996). Consequentemente existe uma necessidade urgente em se buscar solventes mais baratos e menos tóxicos para a extração de biossurfactantes e que sejam adequados para as aplicações industriais.

1.4 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A M; LÉPINE, F; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323-1336, 2010.
- ADAMCZAK, M; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnol Letter**, v. 22, n. 4, p. 313-316, jan. 2000.
- ALBRECHT, A.; RAUL, U.; WAGNER, F.. Initial steps of sophoroselipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 67-73, 1996
- ALBUQUERQUE, C D C; FILETI, A M F; CAMPOS-TAKAKI, G M. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. **Canadian Journal Of Microbiology**, v. 52, p. 575-583, jun. 2006.
- ALMEIDA, R. G.; et al. Planejamento Fatorial como Ferramenta Estatística Aplicada à Produção de Biossurfactantes por *Candida Tropicallis*. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 10, 2006, Goiana. **Anais...** . Goiana: X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006.
- AMARAL, P. F. F; et al. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1894-1898, ago. 2006.
- AMÉZCUA-VEGA, C A et al. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p.237-240, jan. 2007.
- ANDRADE, R. F. S.; et al. Produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* utilizando manípueira como substrato. In: WORKSHOP MEIO AMBIENTE, CIÊNCIAS E TECNOLOGIA - DE MÃOS DADAS PARA O FUTURO, 1., 2006, Recife. **Anais...** . Recife: Workshop Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia - De Mãos Dadas Para O Futuro, 2006.
- ANON. EMULSULL. **Chemical Week**, ., v. 135, p.56-58, 1984.
- ARAJI, L et al. MICROBIAL SURFACTANT MINIREVIEW. **Asia Pacific Journal Of Molecular Biology And Biotechnology**, v. 15, n. 3, p.99-105, 2007.

BANAT, I M et al. Microbial biosurfactants production, applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, n. , p.427-444, 2010.

BARTH, G; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **Fems Microbiol. Rev**, v. 19, n. , p.219-237, 1997.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons: colloids and surfaces. **Physicochemical Engineering Aspect**, v. 152, n. , p.41-52, 1999.

BRITISH PETROLEUM. **Deepwater horizon accident investigation report**. Golfo Do Mexico, 2010. 192 p. Disponível em:
<http://www.bp.com/liveassets/bp_internet/globalbp/globalbp_uk_english/incident_response/STAGING/local_assets/downloads_pdfs/Deepwater_Horizon_Accident_Investigation_Report.pdf>. Acesso em: 06 fev. 2011.

CALVO, C.; et al. Application of bioemulsifiers in soil bioremediation processes: future prospects. **Science Of The Total Environmental**, v. 407, n. , p.3634-3640, 2009.

CAMEOTRA, S S; MAKKAR, R S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 50, n. , p.520-529, 1998.

CAMERON, D R; COOPER, D G; NEUFELD, R J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, n. 6, p.1420-1425, jun. 1988.

CASAS, J; OSCHOAS, F G. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 88, n. 5, p.488-494, 1999.

CIRILIANO, C; CARMAN, G. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 50, p.846-850, 1985.

COIMBRA, C. D.; et al. Studies of the Cell Surface Properties of *Candida* Species. **Curr Microbiol**, v. 58, p.245-251, 2009.

COOPER, D. G. et al. Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **App Environmental Microbiol**, v. 42, p.408-412, 1981.

COOPER, D G. BIOSURFACTANTS. **Microbiol Science**, v. 3, n. 5, p.145-149, 1986.

- COOPER, D. G.; CAVALERO, D. A.. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **J Biotechnol**, v. 103, p.31-41, 2003.
- COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A.. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 47, p.173-176, 1984.
- DANIEL, H J; REUSS, M; SYLDACTK, C. Production of a sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and a *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. **Biotechnol Lett.**, v. 20, p.1153-1156, 1998.
- DAS, K; MUKHERJEE, A K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-east India. **Bioresource Technology**, v. 98, p.641-643, 2004.
- DELEU, M; PAQUOT, M. From renewable vegetable resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 4, p.641-643, 2004.
- DESAI, J D; BANAT, I M. Microbial production of surfactant and their commercial potential. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 61, 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; A JUWARKAR,. Distillery and curd whey wastes as viable alternative source for biosurfactants production. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 17, p.61-69, 2001.
- FONTES, G C; A BALA, G. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.2091-2099, 2008.
- FOX, S L; A BALA, G. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p.235-240, 2000.
- GALLERT, C; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Z. Naturforsch**, v. 89, p.483-396, 2002.
- GOUVEIA, e R et al. Bacterias produtoras de biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, n. 39, p.39-45, 2003.

GUERRA-SANTOS, L H; KAPPELI, O; A FLECHTER,. A dependece of pseudomonas aruginosas continuos cultura biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **App Microbiol Biotechnol**, v. 24, p.443-448, 1986.

GUILMANOV, V et al. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by Candida bombicola. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 77, n. 5, p.489-494, 2002.

GUSMÃO, C A B; RUFINO, R D; A SARUBBO, L. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from Candida glabrata UCP 1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal as hydrophobic contaminant. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p.1683-1692, 2010.

HABA, e et al. Screenig and production of rhamnolipids pseudomonas aeruginosa 47T2 NCIB 40044 form waste flying oils. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 88, p.379-387, 2000.

HARITASH, A K; KAUSHIK, C O. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1-3, p.1-15, 2009.

HAYES, M e; NESTAU, e; HREBENAR, K R. Microbial surfactant. **Chemtech**, v. 16, p.239-245, 1986.

HOMMEL, R.k.; HUSE, K.. Regulation of sophorose lipid production by Candida (Torulopsis) apicola. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 8, p.853-858, 1993.

HOMMEL, R.k. et al. Production of sophorose lipid by Candida (Torulopsis) apicola grown on glucose. **Journal Of Biotechnology**, ., v. 33, n. 2, p.147-155, 1994.

HEITMANN, D et al. Replacement of chloroform through glycosphingolipid isolation. **Biomedical Chromatography**, v. 10, n. 5, p.245-250, 1996.

HISTATSUK, K I. Formation of rhaminolipid by pseudomonas aeruginosa and its function in hydrocarbon fermentation. **Acricultural And Biological Chemistry**, v. 5, p.686-692, 1971.

JAVAHERI, M. et al. Anaerobic Production of a Biosurfactant by Bacillus licheniformis JF-2. **Appl Environ Microbiol.**, v. 50, n. 3, p.698-700, 1985.

JENNINGS, E. M.; TANNER, R. S.. Biosurfactant - producing bacteria foun in contaminated and uncontaminated soils. **Proceeding Of The Conference On Hazardous Waste Research**, p.299-305, 2000.

JOHNSON, V. et al. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters** v. 14, n. 6, p.487-490, 1992.

JING, C.; et al. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p.501-504, 2006.

KAKINUMA, A.; et al. Determination on of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. **Agric Biol Chem**, v. 33, p.971-972, 1969.

KAKUGAWA, K et al. Isolation of yeast *Kluyveromyces sp i-11*, novel producer of mannosylerythritol. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, n. 1, p.188-181, 2002.

KIM, H. S. et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida sp. SY16* using fed-batch fermentation. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 70, n. 4, p.391-396, 2006

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.

KITAMOTO, D et al. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 4, p.305-310, 1992.

KOCH, A. et al. Genetic construction of lactose-using strains of *P. aeruginosa* their applications in biosurfactants production. **Biotechnology**, v. 6, n. , p.1335-1339, 1996.

KOSARIC, N. et al. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. **Journal Of American Oil And Chemistry Society**, v. 61, p.1735-1743, 1984.

LAUFENBERG, G; KUNZ, B; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B): practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p.167-198, 2003.

LUKONDEH, T et al. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, n. 12, p.715-720, 2003.

LUNA, J M; A SARUBBO, L; CAMPOS-TAKAKI, G M. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 52, n. 4, p.785-793, 2009.

LUNA, J M et al. Produção de biosurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**, v. 6, n. 2, p.209-215, 2008.

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

MAKKAR, R S; CAMEOTRA, S S. Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by bacillus subtilis at thermophilic conditions. **Journal Of Surfactants And Detergents**, v. 2, p.371-376, 1999.

MANEERAT, S. Biosurfactant from marine microorganisms. **Journal Of Science And Technology**, v. 27, n. 6, p.1263-1272, 2005.

MARÍM, M et al. Study of factors influencing the degradation of heating oil by Acinetobacter calcoaceticus MM5. **International Biodegradation e Biodegradation**, p.69-75, 1996.

MATA-SANDOVAL, J. C; A TORRENS,; KARNIS, J. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by P. aeruginosa UG2. **Microbiol. Res.**, v. 155, p.249-256, 2001.

MCINERNEY, M J; JAVAHERI, M; NAGLE, D P. Properties of the biosurfactant produced by bacillus licheniformis strain JF-2. **Journal Of Indian Microbiology**, v. 5, p.95-102, 1990.

MEESTERS, P. A. E. P.; EGGINK, G.. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast Cryptococcus curvatus using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 45, n. 5, p.575-579, 1996.

MERCADE, M e; A MANRESA, M. The use of agro industrial by products for biosurfactant production. **Journal Of American Oil And Chemistry Society**, v. 71, p.61-64, 1994.

MORITA, T et al. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, Pseudozyma antarctica JCM 10317T. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 104, n. 1, p.78-81, 2007.

MOURITA, T. et al. Discovery of Pseudozyma rugulosa NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 73, n. 2, p.305-313, 2006.

MOUSSA, T. A. A. et al. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production. **Appl. Sci. Res.**, v. 2, n. , p.844-850, 2006.

MUKHERJEE, S; PALASHPRYA, D. A.; RAMKRISHNA, S. E. N.. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends In Biotechnology**, v. 24, n. 11, p.509-511, 2006.

MULLIGAN, C N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion In Colloid & Interface Science**, v. 14, p.372-378, 2009.

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

MULLIGAN, C N; GIBBS, B F. Factors influencing the economics of biosurfactants. **Biosurfactants Production, Properties, Applications**, p.329-371, 1993.

MULLIGAN, C N; GIBBS, B F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal Of Chemical Technology And Biotechnology**, v. 47, p.23-29, 1990.

MUTHUSAMY, K et al. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p.736-745, 2008.

NEVES, e et al. **Biossurfactantes**. Florianopolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

NITSCHKE, M; COAST, S G. Biosurfactants in food industry. **Trend Foods Sci. Technol**, v. 18, p.252-259, 2007.

NITSCHKE, M; PASTORE, G M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, v. 25, p.772-776, 2002.

NITSCHKE, M; PASTORE, G M. Production and properties of a surfactant obtained from bacillus subtilis grow on cassava waste water. **Bioresource Technol**, v. 97, p.336-341, 1990.

PANDEY, A.; SOCCOL, C R; MITCHELL, D A.. New developments in solid-state fermentantion: bioprocess and production. **Process Biochemistry**, v. 35, p.1153-1169, 2000.

PATTANATHU, A.. Hydrocarbon assimilation by Candida lipolytica: Formation of a biosurfactant; Effects on respiratory activity and growth. **Applied Microbiology And Biotechnology Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 8, n. 1-2, p.91-101, 1979.

PATTANATH, Ks M; RAHMAN; GAKPE, e. Production, characterization and applications of biosurfactants - review. **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p.360-370, 2008.

PIRÔLLO, M P S. **Estudo da produção de biossurfactante utilizando hidrocarbonetos**. 2006. 150 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em

Ciências Biológicas, Departamento de Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

PEFUMO, A. et al. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. **Handbook Of Hydrocarbon And Lipid Microbiology**, p.1501-1512, 2010.

RAU, U. et al. Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 68, n. 5, p.607-613, 2005.

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

RON, E. Z; E., Rosemberg. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p.229-236, 2002.

ROSEMBERG, E.; RON, E. Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 52, p.154-162, 1999.

RUFINO, R D. **Produção de biossurfactant por Candida lipolytica**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Micologia, Departamento de Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

RUFINO, R D; A SARUBBO, L; CAMPOS-TAKAKI, G M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using residue as substrate. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 23, p.734-741, 2007.

RUFINO, R D et al. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, p.907-914, 2008.

SANTANA, W J et al. Prdução de biossurfactantes por candida lipolytica UCP 0665 utilizando o óleo de pequi (*Carycar coriaceu* Camb) proveniente do endocarpo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos. **Anais... .** Santos: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005.

SAPTURE, S K et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**:, v. 28, p.436-458, 2010.

SARACHAT, T et al. Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. **Bioresource Technology**: v. 101, n. 1, p.324-330, 2010.

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

SARUBBO, L A. et al. Biemulsifer production in bath sulture using glucose as carbon sorce by candida lipolytica. **Applied Biochemistry And Biotechnology**: v. 95, p.59-67, 2001.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial eor. **Process In Energy And Combustion Science**:, v. 34, p.714-724, 2008.

SHALE, S. Biological and ecological effects of oils: the fate and effects of oil in freshwater. In: SHALE, S. **The fate and effects of oil in freshwater**. London: Elsevier, 1989. p. 81-172.

SHEPERD, R. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal Of Biotechnology**, v. 30, n. 3, p.207-217, 1995.

SILVA, S. N. R.L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by pseudomonas aeruginosas ucp 0992. **Collids And Surfaces B: Biointerfaces**:, p.1-11, 2010. Article in press.

SINGH, S; PAKSHIRAJAN, K; A DAVEREY,. Screening and optimization of media constituents for decolourization of Mordant Blue-9 dye by Phanerochaete chrysosporium. **Clean Technologies And Environmental Policy**, v. 12, n. 3, p.313-323, 2010.

SINGH, A. ; HAMME, J D Van; WARD, O P. Surfactants in microbiology and biotechnology, part 2. **Application Aspects Biotechnol**, ., v. 25, n. , p.99-121, 2007.

SINGH, M; DESAI, J D. Hydrocarbon emulsification by Candida tropicalis and Debaryomyces polymorphus. **Indian J Exp Biol.**, v. 27, n. 3, p.224-226, 1989.

SOBRINHO , H. B. S. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by candida sphaerica ucp 0995. **Process Biochemistry**: v. 43, n. , p.912-917, 2008.

SOLAIMAN, D. K. Y. et al. Production of sophorolipids by Candida bombicola grown on soy molasses as substrate. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 15, p.1241-1245, 2004.

SUDHAKAR-BABU, P. et al. Kinetics of biosurfactants production by pseudomonas aeruginosa strain bs2 from industrial wastes. **Biotechnology Letters**, v. 18, p.263-268, 1996.

SYLDATK, C; WAGNER, F. Production of biosurfactants. **Biosurfactants And Biotechnology**, v. 45, p.89-120, 1987.

TAYLER, R T. Isolation and characterization of the human pulmonar surfactant apoprotein gene. **Nature**, v. 317, p.361-365, 1985.

THANOMSUB, B. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 96, n. 3, p.588-592, 1985.

TOKUMOTO, H et al. Real-time observation of oxygen and hydrogen adsorption on silicon surfaces by scanning tunneling microscopy. **Journal Of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, And Films**, v. 8, n. 1, p.255-258, 2009.

TULEVA, B K; IVANOV, G R; CHRISTOVA, N E.. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Z Naturforsch**, v. 57, p.356-360, 2002.

THOMPSON, DN, FOX, SL, BALA, GA. Biosurfactants from potato process effluents. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 84, p. 917-930. 2000.

TULLOCH, A. P.; SPENCER, J. F. T.; DEINEMA, M. H.. A new hydroxy fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. **Can. J. Chem**, v. 46, n. 3, p.345-348, 1968.

VAN-DYRKE, M I. et al. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. **Can. J. Microbiol**, v. 39, n. 11, p.1071-1078, 1991.

VAN-HAMME, J D. et al. Physiological aspects. part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Adv.**, v. 24, p.604-620, 2006.

VANCE-HARROP, M H V; CAMPOS-TAKAKI, G M; GUSMÃO, N B. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using d-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brasilian Journal Of Microbiology**, v. 34, p.120-123, 2003.

VANCE-HARROP, M H. **Influencia das fontes de carbono d-glicose e óleo de babaçu no crescimento de candida lipolytica e na produção de biosurfactantes**. 2000. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

VOLLBRECHT, e; RAU, U.; LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-tri, and tetra-saccharide lipid (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella spec*. **Ftt/lipid**, v. 101, p.389-394, 1999.

ZAMORA, P P; TIBURTIUS, e R L; LEAL, e S. Contaminação de águas por btzs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p.441-446, 2004.

ZINJARDE, S S; A PAINT, . Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal Of Basic Microbiology**, v. 42, n. 1, p.67-73, 2002.

ZHOU, Q H; KOSARIC, N. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 1, p.67-71, 1995.

WEBER, L et al. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. **Biocatalysis**, v. 5, p.267-292, 1992.

YOON, S H; RHEE, S J. Lipid from yeast fermentation: Effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *rhodotorula glutinis*. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 7, p.1281-1286, 1983.

CAPÍTULO II

ARTIGO

LABORATORY PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF A NEW
BIOSURFACTANT FROM *CANDIDA GLABRATA* UCP1002
CULTIVATED IN VEGETABLE FAT WASTE APPLIED TO THE REMOVAL
OF HYDROPHOBIC CONTAMINANT

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- O resíduo industrial da fabricação de margarina associado ao extrato de levedura é uma alternativa atrativa de substratos para produção de biossurfactantes a partir de *Candida glabrata*;
- a eficiência do biossurfactante foi demonstrada pelos baixos valores de concentração micelar crítica aparente e tensão superficial alcançados;
- o biossurfactante produzido demonstrou habilidade em atuar sob condições ambientais especiais de salinidade, pH e temperatura;
- a utilização do solvente acetato de etila para o isolamento do biossurfactante permite reduzir a poluição ambiental provocada pelo descarte de organoclorados;
- a caracterização química preliminar demonstra que o biossurfactante pertence à classe dos heteropolímeros;
- o método de sonicação proposto neste trabalho apresentou-se se extremamente eficaz para a extração do biossurfactante intracelular;
- o percentual de remoção de óleo indica a capacidade do surfactante em remover poluentes hidrofóbicos em solos contaminados;
- o modelo proposto apresenta-se com potencial de aplicação, considerando os resultados previamente obtidos em frascos;
- a análise econômica preliminar indica a possibilidade real de utilização dos biossurfactantes nas indústrias e no meio ambiente.

CAPÍTULO IV

ANEXO I

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

ANEXO II

PARTES DESTE TRABALHO FORAM
PUBLICADOS E PREMIADOS

PRÊMIOS E TÍTULOS

- | | |
|------|---|
| 2008 | BayerYoung Environmental Envoy Program, United Nations Environment Programme and Bayer |
| 2008 | Programa Jovens Embaixadores Ambientais 2008, PNUMA - das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Grupo Bayer Brasil |

CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

GUSMÃO, C. A. B.

- Projeto: "Produção e caracterização de biosurfactante de baixo custo para
1. contaminar solos contaminados por petróleo e derivados" In: Lições de Protagonismo Juvenil - A memória dos primeiros cinco anos do Programa Bayer Jovens Embaixadores Ambientais.1, 2008, v.1

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (COMPLETO)

GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.

- Avaliação dos Biosurfactante Produzido por Candida Glabrata Cultivada em
1. Resíduo Industrial In: VI Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental, 2008, Serra Negra.

Anais do VI Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental. , 2008.

GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.

- Caracterização do biosurfactante produzido por candida glabrata ucp1002
2. cultivada em resíduo industrial In: V Semana de Integração Católica-Sociedade, 2007, Recife.

Anais da 9ª Jornada de Iniciação Científica. Fasa, 2007.

Luna, J.M., Rufino, R.D., FARIAS, C.B.B., GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A., Takaki, G.M.C.

- Production of a bioemulsifier by Candida glabrata isolated from mangrove In: II
3. International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2007), 2007, Seville.

Anais do II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007). , 2007.

GUSMÃO, C. A. B.

- Isolamento e caracterização do biosurfactante produzido por Candida glabrata
4. cultivada em resíduo industrial como substrato In: 8ª Jornada de Iniciação Científica, 2006, Recife.

Anais da 8ª Jornada de Iniciação Científica. , 2006.

GUSMÃO, C. A. B., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A.

5. Resíduo Industrial como Substrato para a Produção de Biosurfactante por Candida Glabrata In: 1º Workshop Meio Ambiente Química e Tecnologia, 2006,

Recife.

Anais do 1º Workshop Meio Ambiente, Ciência e tecnologia. , 2006. p.1 - 10

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

- GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.
1. Estabilidade do Biossurfactante produzido por *Candida glabrata* UCP1002 In: III Simpósio em Microbiologia Aplicada, 2007, Rio Claro.
Anais do II Simpósio em Microbiologia Aplicada. , 2007.
 2. GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.
SELECTION OF A SOLVENT SYSTEM FOR ISOLATION OF THE BIOSURFACTANT FROM *Candida Glabrata* UCP 1002 In: Second Brazilian Sumposium on Petroleum Biotechnology old and New Energy Source, 2006, Natal.
Anais do II Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology. , 2006.
 3. GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.
VEGETAL OIL REFINERY WASTES AS SUBSTRATES FOR BIOSURFACTANT PRODUCTION In: Second Brazilian Sumposium on Petroleum Biotechnology old and New Energy Source, 2006, Natal.
Anais do II Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology. , 2006.
 4. GUSMÃO, C. A. B., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A.
Produção de Biossurfactante por *Candida glabrata* a partir de Resíduo Industrial como substrato In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.
Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2005.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO EXPANDIDO)

- GUSMÃO, C. A. B., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A.
1. INFULUENCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO NA REDUÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL PELO BIOSSURFACTANTE DE *Candida glabrata* In: X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006, Goiania.
Anais do X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. , 2006.
 2. GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Candida glabrata* CULTIVADA EM RESÍDUO DE MARGARINA In: X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006, Goiania.
Anais do X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. , 2006.
 3. GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.
Utilização de um Resíduo de Indústria de Margarina como Substrato por *Candida glabrata* In: VII Semana de Integração Universidade - Sociedade, 2005, Recife.
Anais do Semana de integração universidade-sociedade. , 2005.

DEMAIS PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

- GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.
1. **Apresentação de um modelo de remediação de solo contaminado por óleo motor utilizando um biossurfactante.** Prêmio petrobras de tecnologia. , 2008. (Outra produção bibliográfica)
GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.
 2. **Produção e Caracterização de biossurfactante de baixo custo para remediar solos contaminados por petróleo e derivados.** Premio Bayer Young Environmental Envoy. , 2008. (Outra produção bibliográfica)
GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.
 3. **Produção e Caracterização do Biossurfactante de Baixo Custo para Remediar Solos Contaminados por Petróleo.** Premio Petrobras de Tecnologia. , 2007. (Outra produção bibliográfica)
GUSMÃO, C. A. B., Sarubbo, L.A.
 4. **Utilização de um Resíduo Industrial como Substrato para a Produção de Agentes Surfactantes por Candida glabrata.** Prêmio Petrobras de Tecnologia. , 2007. (Outra produção bibliográfica)