



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

Patrícia Andréa Cordeiro da Silva

**INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS
NAS PROPRIEDADES E NA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTES ISOLADOS DO GÊNERO
*CANDIDA***

Recife
2008

Patrícia Andréa Cordeiro da Silva

**INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS
NAS PROPRIEDADES E NA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES ISOLADOS DO GÊNERO
*CANDIDA***

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

Área de Concentração: **Desenvolvimento de Processos Ambientais**

Orientadora: Prof^a. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

**Recife
2008**

S586i

Silva, Patrícia Andréa Cordeiro da

Influência dos parâmetros físico-químicos nas propriedades e na produção de biossurfactantes isolados do gênero *Candida* / Patrícia Andréa Cordeiro da Silva ; orientador Galba Maria de Campos Takaki ; co-orientador Leonie Asfora Sarubbo, 2008. xi, 76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2008.

1. Leveduras. 2. Biossurfactantes. 3. *Candida lipolytica*. I. Título.

CDU 574.6

INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS NAS PROPRIEDADES E NA PRODUÇÃO DE BIODERIVADOS ISOLADOS DO GÊNERO CANDIDA

Patrícia Andréa Cordeiro da Silva

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP, Recife-PE
Orientadora

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE, Recife-PE

Profa. Dra. Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP, Recife-PE

Coordenadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Defendida em _____

DEDICATÓRIA

*Ao meu companheiro, amigo e esposo,
Almir Buarque, a quem dedico todo o meu amor
e que faz de mim uma mulher cada dia mais feliz.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por me proteger e iluminar em mais uma conquista em minha vida;

Aos meus pais, Fernando Cordeiro e Carminha, pelo dom da vida e apoio incondicional, educação e formação de meu caráter;

A meu irmão, Adriano Fábio Cordeiro da Silva, pelo incentivo constante no prosseguimento de meus estudos transmitindo-me perseverança e confiança;

As minhas irmãs Sandra Margareth Cordeiro e Fernanda Michelle Cordeiro, pelo carinho e paciência acreditando sempre na conquista deste curso de mestrado;

À minha orientadora e Coordenadora do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, admirada e dedicada, exemplo de força e símbolo de sabedoria, que acreditou no meu trabalho e na minha vontade de aprender, superando as minhas dificuldades;

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, pelo carinho e amizade, que além dos ensinamentos científicos, passou tranquilidade e admiração dando votos de confiança para a realização deste trabalho;

A todos os Professores deste curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais que se eternizaram em nós, através da transmissão de seus conhecimentos e experiências.

Aos colegas do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, pela paciência, orientação, amizade, troca de conhecimentos e aprendizado.

À Nicéas Izabel Alves, secretária da Pós-Graduação pela atenção e gentileza no atendimento prestado durante o curso.

À Sônia Maria de Souza, secretária do NPCIAMB, pela gentil e valiosa contribuição prestada ao trabalho;

Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J., pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
CAPÍTULO 1.....	viii
CAPÍTULO 2.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
CAPÍTULO 1.....	ix
CAPÍTULO 2.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1.....	10
1.1 Introdução.....	11
1.2 Objetivos.....	13
1.2.1 Objetivo geral.....	13
1.2.2 Objetivos específicos.....	13
1.3.1 Surfactantes e biossurfactantes: considerações gerais.....	14
1.3.2. Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC).....	15
1.3.3. Classificação e natureza química dos biossurfactantes.....	17
1.3.4 Produção de surfactantes por microrganismos.....	19
1.3.5 Função fisiológica dos biossurfactantes.....	24
1.3.6 Fatores que influenciam a produção de biossurfactantes.....	25
1.3.7 Propriedades e aplicações dos biossurfactantes.....	25
1.4 Referências Bibliográficas.....	31
CAPÍTULO 2	
INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS QUÍMICOS E FÍSICOS NA PRODUÇÃO DE AGENTES EMULSIFICANTES POR AMOSTRAS DE <i>CANDIDA LIPOLYTICA</i>	44
1. Introdução.....	45
2. Amostras de <i>Candida lipolytica</i> produtoras de biossurfactantes e origem microbiana.....	47
3. Influência dos parâmetros químicos e físicos na produção de agentes emulsificantes por amostras de <i>Candida lipolytica</i>.....	49
4. Perspectivas econômicas dos emulsificantes produzidos por <i>Candida lipolytica</i>.....	63
5. Vantagens e desvantagens na produção de biossurfactantes.....	64
6. Conclusões.....	66
AGRADECIMENTOS.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	71

LISTA DE FIGURAS

página

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica ligada à cadeia de hidrocarboneto; (b) micela circular; (c) micela cilíndrica; (d) camada micelar; (e) representação de uma vesícula 15
- Figura 2 - (a) Monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça..... 16
- Figura 3 - Posicionamento das moléculas dos surfactantes em fase líquida:..... 16
- a) moléculas na interface ar-água; b) formação de micelas 16
- Figura 4 - Formação de micelas na CMC 17
- Figura 5 - Estruturas de biossurfactantes: (a) Soforolipídios; (b) Mono-raminolipídios; 19
- (c) Di-raminolipídios; (d) Surfactina 19

CAPÍTULO 2

Figura 1. Metabolismo intermediário relacionado a síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos como substrato. Enzimas chaves no controle do fluxo de carbono: (A) fosfofrutquinase; (B) piruvato quinase; (C) isocitrato desidrogenase; (D) citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos); (E). piruvato desidrogenase; F. piruvato carboxilase. (FONTES et al., 2008)⁴⁰50

Figura 2. Metabolismo intermediário relacionado a síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves são: (A) isocitrato liase; (B) malato sintase; (C) fosfoenolpiruvato carboxilase; (D) frutose – 1,6 bifosfatase. (FONTES et al., 2008)⁴⁰,54

Figura 3. Perfil dos ácidos graxos componentes das fontes hidrofóbicas (óleos vegetais) na produção de agentes emulsificantes utilizados por *Candida lipolytica*.....55

LISTA DE TABELAS

página

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.....	18
Tabela 2 - Biossurfactantes produzidos por microrganismos	20
Tabela 3 – Potencial de aplicações dos biossurfactantes	20
Tabela 4 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes	29

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Origem das amostras de <i>Candida lipolytica</i> produtoras de biossurfactantes	48
Tabela 2A- Influência das fontes de carbono (Solúvel) e Nitrogênio, do pH, agitação e do tempo na atividade de emulsificação e na constituição dos biossurfactantes produzidos em batelada por amostras de <i>Candida lipolytica</i>	49
Tabela 2B- Distribuição em grupos os bioemulsificantes produzidos por amostras de <i>Candida lipolytica</i> em função das fontes carbono glicose, Nitrogênio (YNB), pH, agitação e o tempo da fermentação influenciando na constituição química dos polímeros.....	49
Tabela 3 - Composição química dos ácidos graxos saturados, moninsaturados e Poliinsaturados dos óleos vegetais utilizados como fontes hidrofóbicas e carbono por <i>Candida lipolytica</i> para a produção de biossurfactantes.....	53
Tabela 4A- Influência das Fontes de carbono (óleo de babaçu) e nitrogênio, do pH, agitação e tempo na atividade de emulsificação e na constituição dos biossurfactantes produzidos em batelada por amostras de <i>Candida lipolytica</i> ..	56
Tabela 4B- Distribuição em grupos os bioemulsificantes produzidos por amostras de <i>Candida lipolytica</i> em função das fontes hidrofóbicas, Nitrogênio , pH, agitação e o tempo da fermentação influenciando na constituição química dos polímeros.....	56
Tabela 5 A- Influência de fontes de carbono (insolúveis) e nitrogênio, do pH, da agitação e do tempo na atividade de emulsificação (UEA) dos biossurfactantes produzidos por amostras de <i>Candida lipolytica</i>	61
Tabela 5B- Distribuição em grupos os bioemulsificantes produzidos por amostras de <i>Candida lipolytica</i> em função das fontes hidrofóbicas, Nitrogênio, pH, agitação e o tempo da fermentação influenciando na constituição química dos polímeros.....	61
Tabela 6 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.....	63

RESUMO

Estudos sobre a produção de biossurfactantes por leveduras foram realizados, considerando o potencial biotecnológico e o grande número de publicações com leveduras do gênero *Candida*, estado anamorfo. A partir dessas informações foram realizadas avaliações *Candida lipolytica*, estado anormofo, para esclarecer a influência dos parâmetros químicos e físicos (pH, agitação, tempo de cultivo e composição do meio), associado às fontes de carbono (solúveis e insolúveis) e nitrogênio, na produção de agentes emulsificantes e na composição química dos biopolímeros. Neste sentido, o comportamento de quatro amostras de *C. lipolytica* de Coleções de Culturas de distintas foi avaliado, tendo como variável resposta atividade de emulsificação e a composição química dos emulsificantes. O perfil dos ácidos graxos constituintes dos óleos vegetais empregados nos processos fermentativos foi estabelecido como: saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. A avaliação inicial foi com a fonte de carbono glicose, indicando dois grupos distintos de estrutura química dos biossurfactantes, em função da concentração (1 e 1,5%). Com o uso de óleo de babaçu (elevado teor de ácidos graxos saturados) como fonte de carbono observou-se três perfis distintos em função da velocidade de agitação e do tempo da fermentação, constituídos de: Proteínas-Carboidratos- Lipídeos e Carboidratos- Proteínas-Lipídeos. Contudo, quando a fonte de nitrogênio mudou ocorreu a formação do complexo Proteínas- Carboidratos-Lipídeos. O uso de óleos vegetais, resíduo de refinaria e hidrocarboneto, permitiu a formação de três grupos, onde apenas o hidrocarboneto formou um biopolímero de constituição apenas por Carboidratos-Proteínas. Os demais complexos formados foram constituídos por Proteínas-Lipídeos- Carboidratos. Portanto, os estudos realizados evidenciaram a relação direta da fonte de carbono/nitrogênio/agitação com os aspectos metabólicos da produção dos biossurfactantes. Assim, os perfis aqui descritos relacionadas à estrutura química dos biossurfactantes produzidos por *Candida lipolytica*, no estado anamorfo, sugerem a estabilidade da estrutura, em resíduos industriais, da redução dos custos do processo de obtenção, da eficiência do substrato e de baixo custo, além das excelentes propriedades de emulsificação, redução da tensão superficial, biodegradabilidade e biocompatibilidade.

Palavras-Chave: Leveduras; emulsificantes; *Candida lipolytica*, substratos solúveis; substratos insolúveis.

ABSTRACT

Studies on the production of biosurfactants by yeasts were performed, considering the biotechnological potential and the large number of publications with *Candida* yeasts, anamorph state. Based on these data was performed with the yeast *Candida lipolytica*, state anormofo, evaluations to clarify the influence of chemical and physical parameters (pH, agitation, cultivation time and medium composition), associated with carbon sources (soluble and insoluble) and nitrogen on the production of emulsifying agents, and chemical composition of the polymers. In this sense, the behaviors of four strains of *C. lipolytica* from Culture for Collection were evaluated, with the variable response emulsification activity and chemical composition of the emulsifiers. The profile of the constituent fatty acids of vegetable oils used in fermentation processes was established as: saturated, monounsaturated and polyunsaturated. Initial evaluation was done with the carbon source glucose, indicating two distinct groups of biosurfactants chemical structure was influenced by carbon source concentration (1 and 1.5%). In the use of babassu oil (high level of saturated fatty acids) as carbon source was observed three distinct profiles in terms of speed of agitation and time of fermentation, consisting of: Protein-Carbohydrate-Lipids and Carbohydrate-Protein-Lipids. However, the nitrogen source was changed the formation of the complex Protein-Carbohydrate-Lipids. The use of vegetable oils, and hydrocarbon refinery residue, allowed the formation of three groups, where only the hydrocarbon polymer formed a constitution just for carbohydrates and proteins. The other complexes were formed consisting of Proteins-Lipids- Carbohydrates. Therefore, studies showed the direct influence of the carbon/nitrogen / sources, and agitation with the metabolic aspects of the production of biosurfactants. Thus, the profiles described here related to the chemical structure of biosurfactants produced by *Candida lipolytica*, anamorph state, suggest the stability of the structure, using industrial waste, reducing the process of costs production, the efficiency as substrate and low cost, and the excellent emulsifying properties, surface tension reduction, biodegradability and biocompatibility.

Key words: Yeasts; emulsifiers; *Candida lipolytica*; soluble and insoluble substrate

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento industrial, relacionado aos problemas ambientais e legislações de controle do meio ambiente, levou à procura por surfactantes naturais, como alternativa aos produtos existentes.

Os compostos de origem microbiana, denominados de biossurfactantes, exibem propriedades de redução da tensão superficial e alta capacidade emulsificante, consistindo de produtos do metabolismo de bactérias e fungos (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Um biossurfactante possui uma estrutura constituída por uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, permitindo interagir com ambas as fases aquosa e orgânica de uma emulsão. Essa dupla possibilidade de reação faz com que a região de maior estabilidade da molécula seja na interface entre os dois líquidos. Quando um biossurfactante é adicionado à água, suas moléculas tendem se arranjar de modo a minimizar a repulsão entre grupos hidrofóbicos e a água. Os grupos polares ficam na solução aquosa, próximos à superfície, e os grupos apolares ficam na interface água-óleo, minimizando o contato com a água, gerando uma diminuição na tensão superficial da água, devido a um desarranjo da superfície. O mesmo fundamento serve para biossurfactantes solúveis em óleo (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

O recente interesse por biossurfactantes é baseado nas propriedades funcionais que esses compostos possuem como detergência, lubrificação, emulsificação, separação de fases, ação umectante; espumante, solubilizante, inibição da corrosão e redução da viscosidade de óleos. Desta forma, os surfactantes sintéticos podem ser substituídos por surfactantes microbianos em diversas áreas industriais (MUKHERJEE et al., 2006).

Os biossurfactantes também têm atraído atenção devido à baixa toxicidade, biodegradabilidade, aceitação ecológica e habilidade de serem produzidos a partir de fontes renováveis; contudo, essas moléculas, por razões funcionais e custos de produção, tornam-se compostos ainda não competitivos em relação aos surfactantes químicos. Entretanto, o uso de substratos de baixo custo ou resíduos podem reduzir drasticamente o custo da produção de biossurfactantes. Desta forma, resíduos orgânicos e industriais estão sendo apontados como possíveis substratos para a produção de biossurfactantes (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Apesar dos grandes esforços realizados por inúmeras investigações descritas pela literatura, são raros os trabalhos desenvolvidos associando a influência dos parâmetros físicos e químicos na produção de biossurfactantes por leveduras.

Neste sentido, foram investigados os aspectos físicos e químicos relacionados às propriedades e produção de biossurfactantes por leveduras do gênero *Candida*, associando as fontes de carbono e nitrogênio, substratos, temperatura, pH, agitação que possam influenciar nas propriedades (tensão superficial e emulsificação) na produção e na estrutura química dos biossurfactantes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Selecionar e avaliar a influência dos parâmetros fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura e agitação na produção e propriedades dos biossurfactantes isolados a partir de leveduras do gênero *Candida*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Investigar os biossurfactantes produzidos por leveduras do gênero *Candida*;
- Selecionar dentre as leveduras do gênero *Candida* a *C. lipolytica* como a mais estudada considerando a habilidade de produção de biossurfactantes;
- Identificar os tipos de substratos, solúveis e insolúveis na composição dos meios de cultivo utilizados para os biossurfactantes produzidos por *C. lipolytica*;
- Avaliar a influência do tempo, do processo de fermentação, do pH, da agitação, da temperatura e dos substratos na estrutura química dos biossurfactantes produzidos por *C. lipolytica*;
- Empregar modelagem para validar a influência dos parâmetros físicos e químicos relacionadas à produção de biossurfactantes por *C. lipolytica*.

1.3 Revisão de Literatura

1.3.1 Surfactantes e biossurfactantes: considerações gerais

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais (RON; ROSENBERG, 2001; NITSCHKE; PASTORE 2002;).

A produção mundial de surfactantes chega a ultrapassar 3 milhões de tonelada por ano (BANAT et al., 2000).

Os primeiros surfactantes foram produzidos a partir de recursos renováveis (gorduras e óleos), embora atualmente a maior parte utilizada seja derivada de petróleo (DELEU; PAQUOT, 2004). Considerando, entretanto, a grande preocupação ambiental, as indústrias pressionadas pela legislação e organizações de defesa ao meio ambiente, buscam alternativas para minimizar os impactos ambientais e os riscos à saúde humana, aumentando o interesse por surfactantes de origem microbiana (BOGNOLO, 1999; BANAT et al., 2000).

Os biossurfactantes apresentam uma imensa gama de aplicações: na área de indústrias de processamentos de alimentos, na área médica, na recuperação de resíduos oleosos, na indústria cosmética, dentre outras aplicações. (BEZBORODOV, 1991 citado por TURKOVSKAYA et al. 1999; LANG, 2002; DELEU; PAQUOT, 2004).

Os biossurfactantes são compostos de origem anfipática que apresentam uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica na mesma molécula, tendendo a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas, com diferentes graus de polaridade (água/ óleo e óleo/ água). Os biossurfactantes são capazes ainda de formar estruturas tais como: micelas, estruturas lamelares, vesículas esféricas ou irregulares (CHAMPION et al., 1995; CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). (Figura 1).

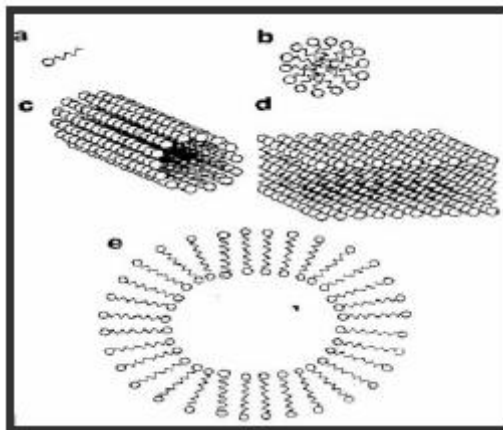


Figura 1 - (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica ligada à cadeia de hidrocarboneto; (b) micela circular; (c) micela cilíndrica; (d) camada micelar; (e) representação de uma vesícula.

Fonte: (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Os biossurfactantes têm a propriedade de aumentar a capacidade emulsificante e de reduzir a tensão superficial e interfacial pelo remanejamento molecular do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as pontes de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas e hidrofílicas (ANNA, 2000).

Atualmente, a utilização de técnicas para a obtenção de biossurfactantes a partir de microrganismos representa um elevado interesse ambiental, pois os biossurfactantes consistem em produtos do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras, sendo ainda menos tóxicos, menos alergênicos e com maior potencial de biodegradação. Os biossurfactantes de um modo geral reduzem e minimizam os impactos ambientais (SEM; SWAMINATHAN, 2005; MULLIGAN, 2005).

1.3.2. Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC)

A tensão superficial dos biossurfactantes é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002) (Figura 2).

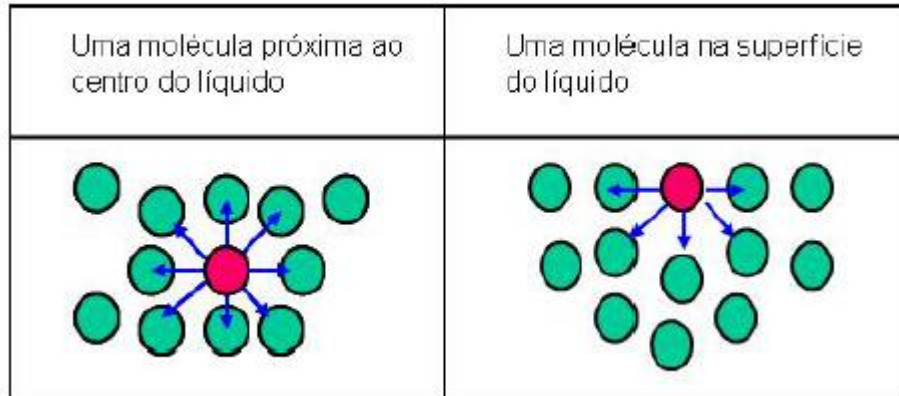


Figura 2 - (a) Formação de micelas na superfície e no interior do líquido
(Fonte: RUFINO, 2006)

A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a face externa do meio líquido e hidrofóbicas para a face interna (Figura 3).

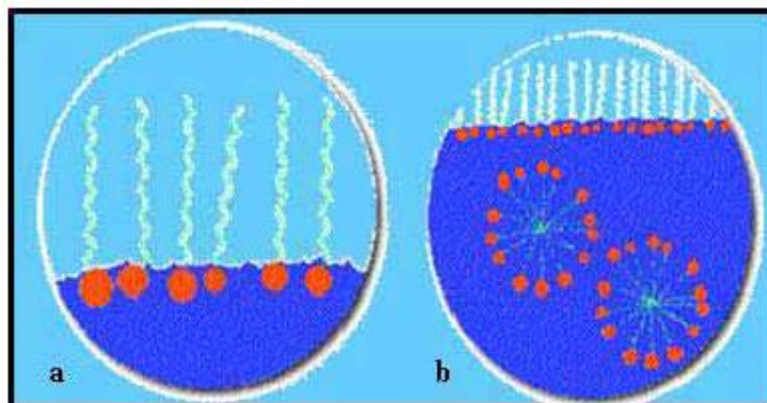


Figura 3 - Posicionamento das moléculas dos surfactantes em fase líquida:
a) moléculas na interface ar-água; b) formação de micelas
(Fonte: RUFINO, 2006)

A concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde a mínima concentração de biossurfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao valor máximo. Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (Figura 4).

A CMC é uma propriedade característica de um surfactante que pode ser obtida a partir de um gráfico semi-logarítmico da tensão superficial de uma solução contra a concentração surfactante (KOSARIC, 1996).

A CMC determina também, as características básicas e essenciais de eficiência e efetividade de um bom surfactante. Entretanto, a eficiência é medida através da CMC que varia de 1 a 2000mg/L, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais, as quais devem atingir valores em torno de 31 a 1 mN/m, respectivamente (RON; ROSENBERG, 2001).

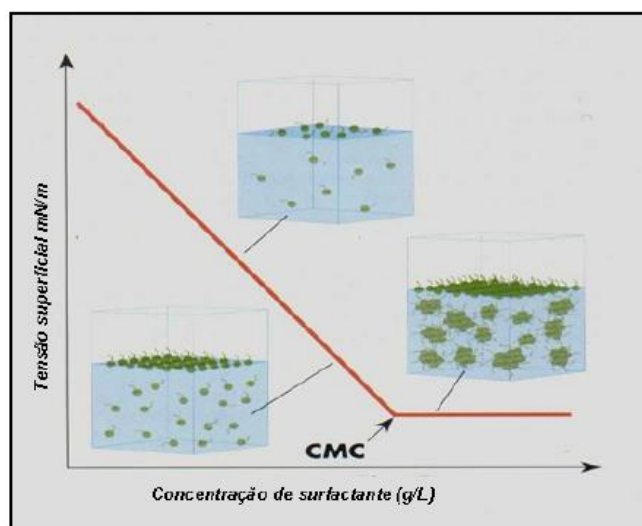


Figura 4 - Formação de micelas na CMC
(Fonte: RUFINO, 2006)

1.3.3. Classificação e natureza química dos biossurfactantes

De um modo geral, todos biossurfactantes possuem uma mesma estrutura comum: uma porção lipofílica, usualmente composta de hidrocarboneto com um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados ou hidroxilados e ligados a uma outra porção hidrofílica, que pode ser um éster, grupo hidróxi, fostato ou carboxilato (COOPER, 1986; LANG, 2002).

Os surfactantes são caracterizados por uma estrutura anfipática onde as propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas dependem da carga do grupo polar, o qual pode ser: aniônico, catiônico, neutro ou anfotérico (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Na Tabela 1, está apresentado os biossurfactantes de acordo com a classificação, em função da composição química da molécula e com o microrganismo que o originou. As cinco classes dos biossurfactante são: glicolipídeos, lipoproteínas e lipopeptídeos, lipídeos neutros, ácidos graxos e fosfolipídeos, poliméricos e particulados (DESAI; BANAT, 1997). A Figura 5 ilustra algumas estruturas químicas de biossurfactantes.

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

Classe / Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídeos	
-ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola, T. apicola</i>
-trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
-Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
-Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
-Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
-Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
-Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
-Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
-emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-liposan	<i>Candida lipolytica</i>
-carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
-vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-células	Várias bactérias

Fonte: DESAI; BANAT (1997)

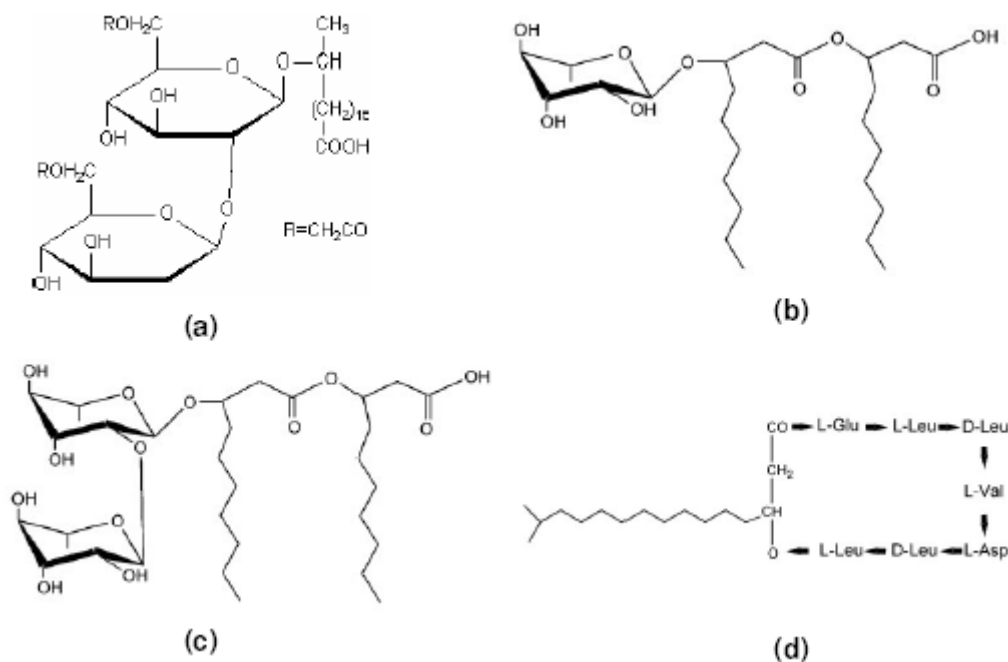


Figura 5 - Estruturas de biossurfactantes: (a) Soforolipídios; (b) Mono-raminolipídios; (c) Di-raminolipídios; (d) Surfactina

(Fontes: KOWALL et al., 1998; BOGNOLO, 1999; SANDOVAL et al., 1999; LANG, 2002).

1.3.4 Produção de surfactantes por microrganismos

Os microrganismos (bactérias, leveduras e alguns fungos filamentosos) que utilizam substratos insolúveis como fonte de carbono apresentam inicialmente o processo de degradação, produzindo uma variedade de biossurfactantes (KARANTH et al., 1999).

Os sferolipídeos que são produzidos por várias espécies de *Torulopsis*, atualmente classificada como *Candida* (KARANTH et al., 1999). Alguns microrganismos são capazes de mudar a estrutura de sua parede celular, sintetizando lipossacarídeos ou surfactantes não iônicos, tendo como representantes desse grupo *C. lipolytica*, *C. tropicalis* e bactérias (*Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium* sp e *Arthrobacter* sp) (KARANTH et al., 1999). A tabela 2 apresenta os principais biossurfactantes e os microrganismos produtores.

Tabela 2 - Biossurfactantes produzidos por microrganismos

Tipo de biossurfactante	Microorganismo produtor
Manoproteína	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Soforolipídeos	<i>Wickerhamiella domercqiae</i>
	<i>Candida bombicola</i>
	<i>Torulopsis petrophilum</i>
	<i>Candida bogorienses</i>
Manosileritritol – lipídeos	<i>Candida antarctica</i>
	<i>Candida sp. SY16</i>
	<i>Kurtzmanomyces sp. I-11</i>
	<i>Pseudozyma fusiformata</i> ,
	<i>P. parantarctica</i> ,
	<i>P. tsukubabaensis</i>
	<i>P. rugulosa</i>
Complexo carboidrato – proteína - lipídeo	<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682
	<i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589
	<i>Debaryomyces polymorphus</i>
	<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055
	<i>Candida lipolytica</i> ATCC 8662
Complexo carboidrato - proteína	<i>Candida ingens</i>
	<i>Candida utilis</i>
Ácido graxo ND ^a	<i>Candida valida</i>
	<i>Candida boleticola</i>
	<i>Rhodotorula glutinis</i> ,
Polióis – lipídeos	<i>Rhodotorula graminis</i>

Fonte: Fontes et al., (2008)

Entre as leveduras mais utilizadas, o gênero *Candida* têm sido empregado nos processos de fermentação de hidrocarbonetos e conseqüentemente, na produção de biossurfactantes (RUFINO, 2006).

Em 1977, Kappeli e Fiechter isolaram um complexo ácido graxo-polissacarídeo da superfície celular de *C. tropicalis* crescida em alcanos, obtendo como resultado um polímero caracterizado por um manano constituído de 4% de ácidos graxos (KAPPELI et al., 1978).

Em 1979, Pareilleux observou a produção de um polímero extracelular por *C. lipolytica* com propriedades emulsificantes quando crescida no solvente orgânico n-tetradecano ou na mistura de hidrocarbonetos lineares, observando que qualquer n-alcano utilizado como fonte de carbono levava a formação de polímeros com moléculas de estruturas inalteradas. Por outro lado, Cirigliano e Carman (1984), isolaram um bioemulsificante a partir de *C. lipolytica* quando crescida em n-hexadecano. O emulsificante obtido, denominado de Liposan era composto principalmente, por carboidratos. Posteriormente, o polímero obtido foi isolado e purificado demonstrando ser constituído por 83% de carboidratos e 17% de proteínas (CIRIGLIANO; CARMAN, 1985).

Cooper e Paddock (1984), utilizando a *C. bombicola* ATCC 22214 obtiveram altos rendimentos de biossurfactantes utilizando duas fontes de carbono, óleo vegetal e carboidrato. O produto obtido consistia num glicolipídeo.

Sarkar et al., (1986), isolaram uma goma do tipo glucana a partir de *Moniliella pollinis* num meio mineral simples, obtendo como resultado da análise do polissacarídeo a presença de glicose em maior proporção, ácido urônico e manose.

Em 1990, Sing e colaboradores demonstraram que a *C. tropicalis* produziu "SCP" (single cell protein) utilizando n-hexadecano como fonte de carbono e ainda, ocorreu a produção extracelular de um bioemulsificante.

Kitamoto et al., (1990a), utilizando a *C. antarctica* T-34, observaram o acúmulo de biossurfactantes quando a levedura foi cultivada em óleo de soja como fonte de carbono. Os biopolímeros isolados consistiam em glicolipídeos. Posteriormente, Kitamoto et al. (1990b), utilizaram como teste, três amostras de *C. antarctica* produtoras de biossurfactantes. Os biopolímeros produzidos eram similares àqueles obtidos a partir da *C. antarctica* T-34, mas diferentes na composição das misturas dos lipídeos. A amostra *C. antarctica* T-34 foi identificada como a melhor produtora em termos de rendimento a partir de vários óleos vegetais, mas não teve a capacidade de utilizar n-alcenos e carboidratos.

Davila et al., (1992) utilizaram a *C. bombicola* CB 56009, onde obtiveram a produção de glicolipídeos a partir de ácidos graxos de óleo de linhaça e glicose, resultando em uma alta produção utilizando fermentação em batelada alimentada.

Zhou e Kosaric, (1993) a partir da *Torulopsis bombicola*, hoje considerada como *Candida*, testaram a produção simultânea de glicolipídeos intra e extracelulares num único processo fermentativo utilizando variáveis fontes de carbono. Nesta pesquisa foi investigado o efeito da lactose, galactose, óleo de oliva, óleo de açafrão e soro de leite na produção de biossurfactante, observando que a glicose e o óleo de açafrão constituem boas fontes de carbono na produção de glicolipídeos. A lactose juntamente com óleo de oliva foram as fontes de carbono mais efetivas na produção simultânea destes polímeros.

Mais tarde, em (1993), Huse e Hommel, obtiveram como resultado, a partir de glicose e frutose, grandes quantidades de glicolipídeos por *C. apicola* durante a fase estacionária de crescimento.

Kitamoto et al., (1993), utilizaram células na fase estacionária de crescimento da *C. antarctica* T-34, onde observou um aumento considerável da produção de glicolipídeos, a partir de fontes de carbono hidrofóbicas, sendo o maior rendimento obtido com células da levedura em crescimento.

Mais tarde, SARUBBO et al., (2001) demonstraram resultados a partir da *C. lipolytica* utilizando como substrato óleo de babaçu. A partir dos resultados obtidos novas pesquisas foram estimuladas sobre os mecanismos de produção de biossurfactantes por levedura do gênero cândida dentro do grupo de pesquisadores.

Brandão (2006) selecionou quatro leveduras produtoras de biossurfactantes após uma pré-seleção avaliando o potencial de atividade de emulsificação (AE) por *C. albicans*, *C. pelliculosa*, *C. tropicalis* e *C. sphaerica*. Após nova avaliação quanto ao poder de emulsificação, foram selecionadas *C. tropicalis* e *C. sphaerica*. Os biossurfactantes produzidos com as leveduras crescidas em fonte de carbono alternativa (óleo de babaçu-5%) foram caracterizados como moléculas com maior percentual de proteínas, seguido de lipídeos e carboidratos como a menor fração.

Vance-Harrop et al., (2003) e (2004), demonstrou que a *C. lipolytica* IA 1055 possui excelente potencial na produção de biossurfactantes com habilidade de emulsificação, em meios de cultivo de baixo custo. Considerando o potencial biotecnológico de *C. lipolytica*, novas investigações foram realizadas utilizando os meios de cultivo à base de água do mar, adicionados de óleo de babaçu e glicose como controle da fonte de carbono. Observou-se maior produção de biossurfactantes com os meios Yeast Salt Water-Babaçu (YSW-B2) e Yeast-Salt Water-Babaçu (YSW-B3), cujas biomoléculas produzidas apresentaram excelente capacidade de emulsificação, sendo consideradas como novos bioemulsificantes de constituição química de carboidratos, proteínas e lipídeos.

Rufino (2006) e Rufino et al. (2007,2008) a partir da *C. lipolytica* UCP0988, testou um meio mineral contendo resíduo de refinaria de óleo de soja como substrato de baixo custo. Os resultados obtidos demonstraram um rendimento de 4,5 g/L de biossurfactante, com redução da tensão superficial do meio para 32 mN/m. O biossurfactante isolado apresentou em sua constituição 50 % de proteínas, 20% de lipídeos e 8 % de carboidratos. Neste estudo, foi concluído que o biossurfactante produzido por *C. lipolytica* quando cultivada em meio de baixo custo contendo resíduo de refinaria de óleo de soja, representando uma alternativa de produção

de um biopolímero com perspectivas de aplicações futuras no controle da poluição ambiental causada por petróleo e derivados.

Amaral et al., (2006), detectaram atividade de emulsificação no meio de cultura por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ50682. O bioemulsificante, secretado durante o crescimento em glicose como fonte de carbono, foi isolado e caracterizado com sucesso. O emulsificante isolado foi nomeado de Yasan, sendo diferente de outros emulsificantes anteriores identificado por *Y. lipolytica*. O biossurfactante apresentou uma alta atividade de emulsificação e estabilidade na faixa de pH de 3,0 a 9,0, sendo capaz de estabilizar emulsões de óleo em água com vários hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos.

Albuquerque et al., (2006) usaram um planejamento fracionário completo 2^4 para estudar o bioemulsificante produzido, investigando os efeitos e interações de óleo de milho, uréia, sulfato de amônia e ortofosfato de potássio, tendo como variável resposta a atividade de emulsificação (AE).

Luna, (2006), em seu trabalho, teve como objetivo produzir agentes surfactantes e uma nova linhagem *C. glabrata* UCP 1002, isolada de sedimento de mangue, utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos.

Bezerra, (2006), no intuito de avaliar a produção de biossurfactante, utilizou um substrato não convencional, melaço de cana-de-açúcar, proveniente da indústria açucareira, para reduzir os custos de produção. A linhagem codificada como AP029/GLVIA, isolada de poços de petróleo do Estado do Rio Grande do Norte utilizada nos ensaios, pertencia à coleção de cultura do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os cultivos foram submetidos a diferentes condições utilizando um planejamento fatorial, no qual os fatores estudados foram concentração de melaço, concentração de nitrato (fonte de nitrogênio), agitação e razão de aeração.

Albuquerque, (2006) desenvolveu um softsensor baseado em redes neurais para determinar a inferência da concentração de biomassa e da atividade de emulsificação do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*, visando de otimizar os componentes do meio de cultivo e ampliar o processo para escala de biorreator. A otimização dos componentes dos meios de produção de bioemulsificante foi realizada usando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta, onde a variável resposta, atividade de emulsificação demonstrou um aumento de 262,8%.

1.3.5 Função fisiológica dos biossurfactantes

Segundo (RUFINO, 2006; SINGH et al., 2007) estudos ainda são necessários para elucidar totalmente a função fisiológica dos biossurfactantes, embora algumas funções possam ser atribuídas a esses compostos:

- transporte de hidrocarbonetos: função atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *C. tropicalis* (COOPER et al., 1981), onde um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando o microrganismo cresce em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo - ácido graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos;
- emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos (COOPER et al., 1981), porém quando isolados *Bacillus subtilis* produzem surfactantes apenas em substratos hidrossolúveis (FRANCY et al., 1991);
- atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos. Os raminolipídeos de *P. aeruginosa* e o surfactin de *B. subtilis*, funcionam como antibióticos solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN, 1996);
- aderência-liberação da célula a superfícies, uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. Os elementos chave nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsáveis pela aderência das células às superfícies. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local, de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG; RON, 1998).

1.3.6 Fatores que influenciam a produção de biossurfactantes

Existem vários fatores que influenciam qualitativamente e quantitativamente na produção de biossurfactantes; dentre eles podemos citar os fatores físico-químicos relacionados à estrutura química, metabolismo celular, substrato, pH, temperatura, força iônica e salinidade, além da agitação, dos meios de cultura, dos tipos de cultivo (frasco ou reator) e tipos de processos produtivos.

Um importantíssimo fator, relacionado à produção de biossurfactantes, são os substratos. Os substratos influenciam no custo, quantidade e qualidade da produção de biossurfactantes, na constituição de sua estrutura química como também nos processos de fermentação, entre outros fatores. Os substratos, em geral, podem ser classificados em solúveis (glicose, sacarose, glicerol, etanol) ou insolúveis (hidrocarbonetos, óleos vegetais) (SOUMEN et al., 2006).

Para reduzir custos dos processos de produção alguns substratos baratos são usados na produção de biossurfactantes. Dentre esses substratos pode-se destacar: óleos de babaçu, milho, girassol, soja, jojobá, entre outros. Existem ainda os substratos baratos provenientes de recursos renováveis, aqueles que apresentam fonte de carbono, especialmente os de resíduos agroindustriais como: polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais e mandioca, entre outros (GUTIERREZ et al., 1992; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Os processos de fermentação são normalmente complexos, devido à síntese de produtos pelo microrganismo, influência de fatores externos e internos (concentrações de substrato, produto, pH, etc), entre outros. Estes processos são descritos por equações não lineares, tendo o tempo como o parâmetro variado. Geralmente o resultado ótimo e o perfil de controle são calculados para os parâmetros que são assumidos serem constantes (não podem ser percebidas as ótimas soluções na prática) ou quando os parâmetros são funções das condições físicas ou químicas do processo, como pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido, entre outros (TSONEVA et al., 1998).

1.3.7 Propriedades e aplicações dos biossurfactantes

Entre diversas composições químicas e propriedades, algumas são comuns a maioria dos biossurfactantes, pois apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes convencionais, ressaltando (VAN HAMME et al., 2006):

- Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações;
- Seletividade para interfaces específicas: um dos vários princípios das moléculas biológicas é sua notável especificidade comparada aos materiais quimicamente sintetizados;
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: os biossurfactantes possuem elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas;
- Biodegradabilidade: diferentes dos surfactantes químicos os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo;
- Baixa toxicidade: a baixa toxicidade dos biossurfactantes permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (efeitos alérgicos).

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa, produzidos a partir de microrganismos, está baseado nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades fornecem potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, agrícola, de construção, de bebidas, de papel, de metal, têxtil, farmacêutica e cosmética (FIECHTER, 1992; BOGNOLO, 1999; MULLIGAN et al., 2001; NITSCHKE; PASTORE, 2006; RUFINO, 2006) (Tabela 3).

Tabela 3- Potencial de aplicações dos biossurfactantes

Funções	Campos de Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosmético e sistema de liberação de drogas

Fonte: CAMEOTRA, 2000

Continuação da Tabela 3- Potencial de aplicações dos biossurfactantes

Funções	Campos de Aplicação
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulação, oleodutos
Dispersantes	Mistura carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação melhorada do petróleo

Fonte: CAMEOTRA, 2000

Em seguida, são destacados os seguintes aspectos relacionados à aplicabilidade:

Controle da poluição

- *Biorremediação*

Os biossurfactantes aumentam a interação óleo/água, acelerando o processo de degradação de vários óleos por microorganismos e promovem a biorremediação de águas e solos. A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água faz com que aumente a degradação destes compostos no meio ambiente. Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo (KARANTH et al., 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

- *Recuperação de reservatórios de óleos*

Muitos resíduos ficam depositados no fundo dos reservatórios de óleo e isso requer um tratamento manual de lavagem que utiliza solventes muito perigosos. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição da viscosidade e a formação de emulsões, facilitando o bombeamento do resíduo e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão. Os resíduos sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte menos contaminante ao meio ambiente (MUKHERJEE et al., 2006).

- **Recuperação melhorada de petróleo (MEOR)**

A MEOR consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos do seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos produzem polímeros e surfactantes que 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 (MANEERAT, 2005).

A utilização de biossurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de biossurfactantes no reservatório e subsequente propagação “*in situ*”, ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento dos microrganismos produtores de biossurfactantes (MULLIGAN, 2005).

Aplicações terapêuticas

A surfactina, um dos mais conhecidos biossurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membrana, atividade anti-bacteriana e antifúngica, atividade antiviral e antitumoral. O biossurfactante produzido por *R. erythropolis* inibiu o vírus da herpes e o vírus parainfluenza (VAN HAMME et al., 2006).

Agricultura

Os biossurfactantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em solução aquosas (KARANTH et al., 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Mineração

Compostos tenso-ativos, produzidos por culturas de *Pseudomonas* sp e *Alcaligenes* sp, foram utilizados para flotação e separação da calcita e eschelita. O Biodispersan, polissacarídeo aniônico produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* A2, foi utilizado na prevenção da floculação e dispersão de mistura de pedra calcárea e água. Biosurfactantes de *C. bombicola* demonstraram eficiência na solubilização de carvão (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Produtos de higiene e cosméticos

Devido à compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. A preparação de biossurfactantes pela ação enzimática (principalmente lípases) sobre moléculas hidrofóbicas promoveu um novo direcionamento na produção destes compostos, principalmente para utilização em produtos de higiene e cosméticos (KARANTH et al., 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Indústria de alimentos

Os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas. Os agentes tenso-ativos encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne (GAUTAM; TYAGI, 2006).

A tabela 3 apresenta as principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.

Tabela 4 – Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo

Fonte: BANAT et al., (2000)

1.4 Referências Bibliográficas

ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces**, 6th. Ed. New York: John Wiley e Sons Inc., 1997.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 328-336, 2004.

ALBUQUERQUE, C.D.C; FILETTI, A.M.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. **Canadian Journal Microbiology**, p. 575-583, 2006.

ALBUQUERQUE, C.D.C. **Processo de Produção de Bioemulsificante por *Candida lipolytica*: Otimização, Ampliação de Escala e Desenvolvimento de Softsensor Baseado em Redes Neurais Artificiais**. 1v, p.150. (Doutorado), UNICAMP, 2006.

ALBUQUERQUE, C.D.C.; SARUBBO, L.A.; FILETTI, A.M.F., CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by *Candida lipolytica* using experimental design. **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 17 a 20 de novembro de 2003, Florianópolis, SC, CD-ROM.

AMARAL, P.F.F.; DA SILVA, J.M.; LEHOCKY, M.; A.M.V., BARROS-TIMMONS; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.41, p.1894-1898, 2006.

ANNA, L. M. M. S. **Produção de biossurfactantes do tipo raminolípido por *Pseudomonas sp.*** Rio de Janeiro/RJ. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

ATLAS, R. M. **Bioremediation of petroleum pollutants**. International Biodeterioration Biodegradation, Oxford, v. 35, n.1-3, p. 317-327, 1995.

BANAT, I. M.; MAKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.495-508, 2000.

BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* **Biotechnology Letters**. v. 15, p. 591-594, 1993.

BEZERRA, M.S. **Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melaço como substrato**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, v. 2, p.101, 2006.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**. v. 30, p. 231–236, 1999.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. v. 2, São Paulo/SP, Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. **Tecnologia das Fermentações**. v.1, São Paulo/SP, Editora da Universidade de São Paulo, 1975.

BRANDÃO, L V.C. **Produção de biossurfactantes por leveduras do gênero *Cândida*, isoladas de solo de mata e solo poluído com chumbo**, tese (Doutorado) UNESP, 2006.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**. v. 7, p. 262–266, 2004.

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

CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 170, p. 569-574, 1995.

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

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 846-850, 1985.

COOPER, DG, MACDONALD, CR, DUFF, SJB, KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408-412. 1981.

COOPER, D.G., PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n. 2, p. 173-176, 1984.

COOPER, DG. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**. v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.

COSTA, J. A. V. **Produção de Amiloglicosidase por Fermentação em Estado Sólido em Biorreator de Coluna**. Campinas/SP. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas), 1996.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**. v. 22, p. 211-219, 2005.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G.; PEREIRA, D. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**. v. 30, p. 32-37, 2002.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: A text book of industrial microbiology**. Madison: Science Tech. p. 297, 1984.

DAVILA, A.-M., MARCHAL, R., VANDECASTEELE, J.P. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 39, n. 1, p. 6-11, 1992.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chimie**. v. 7, p. 641-646, 2004.

DESAI, J. D.; BANAT, IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbial Molecular Review**, v. 61, p. 47-64. 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Em Biosurfactants: production, properties, Applications. **Surfactant science series**, KOSARIC, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993, cap. 3.

DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DIEZ, M.; DESGRANGES, C. Solid-state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant, **Biotechnology Advances**. v. 11, p. 591-597, 1993.

FECHTER, A. Biosurfactants – moving towards industrial application. **Oxford: Trends in Food Science & Technology**. v.10, p. 208-217, 1992.

GAUTAM, K.K.; TYAGI, V.K. Microbial Surfactants: A review. **Journal of Oil Science**. v. 55, p. 155-166, 2006.

GUDINO, J.M.T.; CRISPIM, J. A. S. Producción de un biosurfactante microbiano por *Torulopsis magnoliae* em cultivos sumergidos por carga. **Ciência**, v. 9, p. 305 – 312, 2001.

GUTIERREZ, R. M.; HUERTA-OCHOA, S.; ULIBARRI, R. L.; CASTANEDA, G. S.; TORREZ, E. F.; GONZALES, G. V. Solid state fermentation in bioconversion of agro-industrial raw materials. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 5, p. 203-380, 1992.

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

HONG, KJ, TOKUNAGA, S.,KAJIUCHI, T. Evolution of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. **Chemosphere**, v.49, n.4, p. 381-384, 2002.

HUA, Z.; CGEN, J; LUN, S; WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida lace* propellies of microorganism and biodegradation of n- alkanes. **Water Research**, v. 37, p. 4143-4150, 2003.

JAIN, D. K.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactantes on biodegradation of selected hydrocarbon in soil. Basingstoke: **Journal of Industrial Microbiology**. v.10, p. 87-93, 1992.

JIA, X.; ZHANG, T.; WANG, F.; HAN, F. Multi-objective modeling and optimization for cleaner production processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, p. 146-151, 2006.

JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V.S. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 6, p. 487-490, 1992.

KAPPELI, O., FIECHTER, A. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. **Journal of Bacteriology**, v. 131, n. 3, p. 917-921, 1977.

KAPPELI, O.; MULLER, M.; FIECHTER, A. Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. **Journal of Bacteriology**, v. 139, n. 2, p. 952-958, 1978.

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

KIM, S.H.; LIM, E.; J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, T.H. Purification and characterization of surfactant from *Nocardia* sp. L - 417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249-253, 2000.

KITAMOTO, D., AKIBA, S., HIOKI, C., TUTUCHI, T. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 54, n. 1, p. 31-36, 1990a.

KITAMOTO, D., HANEISHI, K., NAKAHARA, T., TABUCHI. Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antarctica* from vegetable oils. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 54, n. 1, p. 37-40, 1990b.

KITAMOTO, D., FUZISHIRO, T., YANAGISHITA, H. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 4, p. 305-316, 1993.

KOSARIC, N. Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, 39 (4) 295–304, 2001.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 1731-1737, 1992.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. **Biosurfactants**. ed. Marcel Decker: New York, 1987.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T. FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 204, p. 1-8, 1998.

LANG, S.; WAGNER, F. Biosurfactants: production, properties, Applications, **Surfactant science series**, KOSARIC, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial surfactants **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 51, p. 21-32, 1999.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Colloid & Interface Science**, v. 7, p.12-20, 2002.

LEAL-CALDERON, F., POULIN, P. "Progress in understanding emulsion metastability and surface forces", **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 4, p. 223-230, 1999.

LENZ, J.; HÖFER, M.; KRASENBRINK, J.-B.; HÖLKER, U. A survey of computational and physical methods applied to solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 65, p. 9-17, 2004.

LIMA, C. J. B.; VIEIRA, R. B.; FRANÇA, F. P.; SÉRVULO, E. F. C.; CARDOSO, V. L. Produção de biossurfactante empregando culturas de *Pseudomonas aeruginosa*. Universidade Federal do Rio de Janeiro - **Escola de Química**, 1998.

LIN, S. C. Biossurfactantes: recent advances. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**. v. 66, p.109-120, 1996.

LUNA, J. M. **Influência do óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção de biossurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata***. Recife. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2006. 65p.

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

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. Champaign: **Journal of surfactants and Detergents**. v. 2, p. 237-241, 1999.

MANEERAT, S. Biosurfactante from marine microorganisms. **Journal of Science and Technnology**. v. 27,, n. 06, p.1263-1272, 2005.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, B.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering**. v. 68, p. 61-138, 2003.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MORAES, A. F. **Enriquecimento protéico do farelo de arroz por fermentação semi-sólida em biorreator de coluna com leito fixo**. Rio Grande/RS. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos – Fundação Universidade Federal do Rio Grande), 1999.

MORÁN, A.C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J.L.; SIÑERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **Biodegradation** v.11, p. 65, 2000.

MORIKAWA, M.; ITO, M.; IMANAKA, T. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-I, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 74, p. 255-261, 1992.

MUKHERJEE, S.; PALASHPRYA D. A.; RAMKRISHNA, S.E.N. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

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

MULLIGAN, C.N.; YONG R.N.; GIBBS, B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 85, p.111-125, 2001.

NEVES, E.; FORGIARINI, E.; SCHOENHALS, M.; CAMPREGHER, N.; GUZZI, R. **Biossurfactantes**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M; PASTORE,G.M., Biosurfactants: Properties and Applications, **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p.772-776, 2002.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**. v. 77, p. 149–162, 1999.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 26, p. 335-361, 1991.

PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant: effects on respiratory activity and growth. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 91-101, 1979.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Short communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcerans*. London: **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13,p.133-135, 1997.

QUEIROGA, C.L.; NASCIMENTO, L.R.; SERRRA, G.E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p. 1321-324, 2003.

- RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTAS, Y ; PETSAS, I.MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n- alkanes in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresouruce Technology**, v. 90, p. 159-168, 2003.
- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Volume 1. Editora e Gráfica Universitária – UFPEL. Pelotas/RS, 1996.
- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Volume 3. Editora e Gráfica Universitária – UFPEL. Pelotas/RS, 2000.
- ROBERT, M.; MERCADE, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T 1. **Biotechnology Letters**. v. 11, p. 871-874, 1989.
- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. **Surface active polymers from the genus Acinetobacter**. In: Kaplan DL (ed) Biopolymers from renewable resources. Springer, Berlin Heidelberg New York. p. 281-291. 1998.
- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants, **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-230, 2001.
- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation, **Current Opinion in Biotechnology**, v 13, p. 249-252, 2002.
- ROSATO, Y.B. Biodegradação do petróleo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. EMBRAPA, São Paulo. p. 307-304, 1997.
- ROY, D., KOMMALAPATI, R.R., MANDAVA, S.S., Soil washing potential of a natural surfactant. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 670-675, 1997.
- RUFINO, RD; **Produção de Biossurfactante por *Candida lipolytica***. Recife. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2006. 97p.

RUFINO, R. D. ; SARUBBO, L. A. ; BARROS NETO, B. ; Campos-Takaki, G.M. . Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 907-914, 2008

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

SANDOVAL, J.C.M.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography A**. v. 864, p.211 – 220,1999.

SANTOS,L.C.dos; RIBEIRO,V.M.; MILLIOLI,V.S.(2003). Efeito da adição de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com óleo cru, utilizando-se reator de lama. Apresentado na 26a Reunião Anual do SBQ (Sociedade Brasileira de química). **Resumo**. Poços de Caldas - MG – Brasil de 26 a 29 de maio de 2003.

SARKAR, J.M., HENNEBERT, G.L., MAYAUDON, J. Optimization and characterization of an extracellular polysaccharide produced by *Moniliella pallinis*. **Biotechnology Letters**, Surrey, v. 8, n. 5, p. 319-322, 1986.

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

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C. R.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. P. C.; PORTO, A. L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 95, p.59-67, 2001.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2953-2958, 2005.

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

SING, M., SAINI, V.S., ADHIKARI, D.K., DESAI, J.D., SISTA, V.R. Production of bioemulsifier by a SCP-producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. **Biotechnology Letters**, Surrey, v. 12, n. 10, p. 743-746, 1990.

SMITS, J. P.; VAN SONSBEK, H. M.; TRAMPER, J.; KNOL, W.; GEELHOED, W.; PEETERS, M.; RINZEMA, A. Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. **Bioprocess Engineering**. v. 20, p. 391-404, 1999.

MUKHERJEE, M.; DAS, P.; and SEN, R..Towards commercial production of microbial surfactants. **Elsevier Publisher**, 2006.

TADROS, T.F. Surfactants, Academic Press INC. (London) LTD, 1984. URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of oil contaminated soils. **Journal of Colloid and interface**, p. 456-464, 2004.

TREVAN M. D. T., BOFFEY S., GOULDING K. H., STANBURYK P.; **Biotecnología: Principios biológicos**; Editorial Acribia, S. A.; Zaragoza – España, p.284, 1990.

TSONEVA, R.G.; PATARINSKA, T.D.; POPCHEV, I.P. Augmented Lagrange decomposition method for optimal control calculation of batch fermentation processes. **Bioprocess Engineering**. v. 18, p. 143 -153; Springer-Verlag, 1998.

TURKOVSKAYA, O. V.; DMITRIEVA, T. V.; MURATOVA, A. Y. A Biosurfactant-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strain. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 37, n. 1, p. 71-75, 1999.

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

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

VANCE-HARROP, M. H. **Potencial biotecnológico de *Candida lipolytica* na produção de biossurfactantes, nos processos de remoção e bioabsorção do pireno (derivado do petróleo)**. Recife, 2004. Tese (Doutorado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2004. 138f.

YOUSSEF, N.H; DUCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N; KNAPP, R.M.; INERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56. p. 339-347, 2004.

ZHOU, Q.H.; KOSARIC, N. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 5, p. 477-482, 1993.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS QUÍMICOS E FÍSICOS NA PRODUÇÃO DE AGENTES EMULSIFICANTES POR AMOSTRAS DE *CANDIDA LIPOLYTICA*

Patrícia Andréa Cordeiro da Silva^{1,2}, Leonie Asfora Sarubbo² e Galba Maria de Campos Takaki^{2*}

¹Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista - 50050900 - Recife - PE – Brasil e Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco
Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista - 50050900 - Recife - PE - Brasil.

INFLUENCE OF CHEMICAL AND PHYSICAL PARAMETERS IN THE EMULSIFYERS AGENTS PRODUCED BY *CANDIDA LIPOLYTICA* STRAINS. Biosurfactants are amphipathic molecules with both hydrophilic and hydrophobic moieties that partition preferentially at the interface between fluid phases. This review evaluated the experimental results obtained with emulsifier agents produced by strains of *Candida lipolytica*, anamorph state, on the influence of the physical (pH, time of cultivation and agitation), and chemical parameters (soluble and insoluble carbon and nitrogen sources) related to the chemical structure of the biosurfactant. The results suggest the key point of the chemical structure, and a brief on the recent developments for bioemulsifiers production.

Key words: *Candida lipolytica*, biosurfactant, emulsifier, physical and chemical parameters.

* Autor para correspondência: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais- NPCIAMB, UNICAP.
Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. UNICAP. Boa Vista. Recife - PE
CEP 50050-590/Fax: 081 2119-4043 - e-mail: takaki@unicap.br

1. Introdução

Os biossurfactantes são moléculas constituídas por porções hidrofóbicas e hidrofílicas, que se acumulam nas interfaces entre as fases fluidas, com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo), reduzindo a tensão superficial e interfacial aumentando a área superficial de compostos insolúveis, permitindo assim, o aumento da mobilidade, biodisponibilidade e subsequente biodegradação. São compostos com baixa toxicidade e alta biodegradabilidade¹, com possibilidade de produção *in situ* e a partir de fontes renováveis. Apresentam as mesmas propriedades dos surfactantes químicos, tais como: emulsificação, detergência, capacidade espumante, capacidade molhante, lubrificação, dispersão e solubilização de fases², sendo sua aceitabilidade ecológica, a vantagem mais importante sobre os surfactantes químicos³.

Os biossurfactantes apresentam uma grande diversidade de aplicações, ressaltando-se a indústria petrolífera, principalmente, na recuperação terciária do petróleo e biorremediação de hidrocarbonetos. Contudo, são também relatados processos de solubilização e emulsificação de compostos químicos tóxicos. Os biossurfactantes também apresentam aplicações nas indústrias de cosméticos, farmacêutica, tintas, alimentícias, produtos de limpeza, na agricultura, entre outras⁴.

Os biossurfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A grande maioria dos biossurfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com as novas legislações de controle do meio ambiente levam à procura de surfactantes naturais, como alternativas aos produtos existentes⁵.

Portanto, a biodegradação apresenta-se como um método efetivo, uma vez que, o petróleo é usado como fonte de carbono através dos processos microbianos, resultando na quebra das moléculas em compostos de baixa massa molecular⁵. Porém, geralmente a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos para a conversão microbiana é baixa, limitando assim, a taxa de biodegradação no meio aquoso. A dispersão e a solubilização de compostos orgânicos apresentam baixa solubilidade em água, sendo no entanto, um passo importante para a biorremediação⁶. O uso de compostos tensoativos, como biossurfactantes, torna-se uma alternativa com possibilidade de aumento do processo de biodegradação dos hidrocarbonetos⁷.

Muitos microrganismos são capazes de emulsificar hidrocarbonetos em solução através da produção de biossurfactantes⁸, conseqüentemente, aumentando a adesão de células ao substrato⁹. Neste sentido, uma variedade de microrganismos é capaz de produzir

biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares¹⁰, no entanto, o potencial de produção é determinado pela genética microbiana. Contudo, outros fatores como a natureza dos substratos (carbono e nitrogênio), o pH, agitação e tempo de cultivo associados à relação carbono e nitrogênio influenciam fortemente a produção de biossurfactantes e a estrutura química¹¹.

Entre as leveduras, consideradas como GRAS (generally regarded as safe), o gênero *Candida*, vem sendo bastante empregado com sucesso nos processos fermentativos utilizando substratos hidrofóbicos, com consequente produção de biossurfactantes tenso-ativos ou emulsificantes, ou ambos. O interesse por *Candida* vem crescendo significativamente, devido ao seu potencial biotecnológico, diversidade metabólica, natureza ecológica, possibilidade de produzir através de processos fermentativos vários metabólitos secundários, como enzimas, antibióticos, proteínas, lipídios e biossurfactantes, com excelente atividade de emulsificação, estabilidade gente condições de estresse, redução da tensão superficial, interfacial e da concentração micelar crítica (CMC)^{12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,23}.

Considerando, a habilidade de *Candida lipolytica* utilizar um grande número de substratos insolúveis, ressalta-se que existem grandes quantidades de resíduos graxos liberados (1890 toneladas/ano), principalmente, a partir de refinarias de óleo vegetal na região Nordeste do Brasil, cujos resíduos poderiam ser reutilizados como substratos para a produção de biossurfactante, como forma alternativa de reduzir o custo de produção²⁴.

Este trabalho está fundamentado em um grande número de investigações que vêm sendo realizadas com sucesso utilizando *C.lipolytica* na produção de biossurfactantes, visando à redução dos custos de obtenção de moléculas com atividade emulsificante e que podem também reduzir a tensão superficial. Desta forma, a presente revisão foi dirigida para investigações com a levedura *C. lipolytica* no estado anamorfo, identificando a origem microbiana das linhagens trabalhadas, destacando a influência dos parâmetros físico-químicos e os prováveis pontos chave entre fontes de carbono e nitrogênio na fisiologia de produção de biossurfactantes, como também, a relação indireta com a composição química do biopolímero, além de perspectivas futuras.

2. Amostras de *Candida lipolytica* produtoras de biossurfactantes e origem microbiana

Os biossurfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com as novas legislações de controle do meio ambiente levam à busca de surfactantes naturais, como alternativas aos produtos existentes²⁴.

O aparecimento de bioemulsificantes ou compostos de superfície ativa no meio de cultura ou unido às paredes celulares é geralmente considerado um pré-requisito para as interações iniciais entre os hidrocarbonetos e a célula microbiana, os quais reduzem a tensão superficial entre o óleo e a fase aquosa, reduzindo o diâmetro médio das gotas de óleo e propiciando o aumento da área interfacial²⁵. Desta forma, os biossurfactantes possuem a capacidade de emulsificar e dispersar os hidrocarbonetos em água, tornando-os disponíveis e com isso, retirá-los do ambiente "naturalmente", através de processos como mineralização e solubilização²⁶.

Assim, os recentes avanços no campo de surfactantes microbianos, vêm sendo atribuídos ao rápido desenvolvimento de avaliação do potencial de linhagens microbianas, cujas Coleções de Cultura são responsáveis pela manutenção do patrimônio genético. Os microrganismos representam um acervo em expansão da economia mundial, e são de grande interesse, especialmente, para a indústria. A habilidade notável de degradação de compostos por microrganismos é consequência da evolução dos sistemas enzimáticos, os quais vêm coexistindo, durante bilhões de anos, com uma enorme variedade de substâncias naturais. Esta diversidade de substratos potenciais ao crescimento microbiano resultou no aumento do conhecimento pela habilidade de produção de metabólitos secundários, através de sistemas enzimáticos aptos a produzir e transformar moléculas orgânicas. Segundo Van der Meer²⁷ e Van Der Meer et al. ²⁸ existem duas possibilidades para a adaptação dos microrganismos às moléculas sintéticas:

1. Existência de enzimas produzidas pelas células microbianas que reconhecem a estrutura do composto como substrato, conduzindo a uma "adaptação bioquímica";

2. Alteração dos sistemas enzimáticos, pelo estímulo na expressão de novos genes necessários à conversão do composto, conduzindo a uma "adaptação genética". Como exemplo, o tratamento com derivados do petróleo que permite uma adaptação genética, com diferentes graus de respostas a esses compostos^{28,29}.

Assim, as diversas amostras de leveduras foram avaliadas a habilidade na produção de agentes surfactantes e ou emulsificantes, ou ambos, destacando o potencial biotecnológico da *Candida lipolytica*, dentre as leveduras a mais investigada na literatura. As leveduras estão agrupadas de acordo com a capacidade de reprodução, sendo considerada duas grandes Classes: Ascomycetes, estado sexuado, conhecido como “leveduras verdadeiras”, ou ainda que formam ascósporos no interior da células, dependendo da condição de cultivo. Outras são capazes de produzir esporos externos, pertencentes à Classe dos Basidiomycetes, consideradas “falsas leveduras”, onde somente a reprodução assexuada é conhecida formando um conjunto artificial denominado de Deuteromycetes. Desta forma, baseada nas características muitas dessas leveduras que se reproduz somente assexuadamente (Deuteromycetes), conhecido como estado anamorfo, podem existir os Ascomycetes e ou Basidiomycetes (estados sexuado ou teleomorfo e assexuado ou anamorfo)^{30,31,32}. No caso de *Candida lipolytica* (estado anamorfo) o estado sexuado ou teleomorfo denominado de *Yarrowia lipolytica*, é considerado como levedura não convencional, aeróbia obrigatória, da classe Ascomycetes, subclasse Hemiascomycetes³³.

Desta forma, as investigações aqui descritas foram realizadas com o estado anamorfo *C. lipolytica*, considerando os biossurfactantes com habilidade emulsificantes e a origem microbiana, como apresentado na **Tabela 1**. Esta tabela apresenta as amostras utilizadas de *C. lipolytica* de diferentes Coleções de Culturas, destacando-se os vários estudos realizados por diversos autores com as mesmas linhagens para produção de biossurfactantes emulsificantes. Desta forma, neste trabalho está sendo considerada a necessidade de avaliação do potencial de produção de biossurfactantes, visando estabelecer conhecimentos mais aprofundados com o metabolismo microbiano na produção de emulsificantes e a estrutura química. Portanto, os estudos selecionados que demonstram a versatilidade da levedura *Candida lipolytica*, no estado anamorfo, vem sendo objeto de várias pesquisas de sucesso com processos fermentativos usando diferentes substratos, solúveis e insolúveis, inclusive resíduos industriais, para a produção de biossurfactantes que apresentam excelente redução da tensão superficial e atividade de emulsificação^{15,16,17,18,19,20,21,22,24,34,35,36,37}.

Tabela 1. Origem das amostras de *Candida lipolytica* produtoras de biossurfactantes

Amostras de <i>Candida lipolytica</i>	ORIGEM DA LEVEDURA	REFERÊNCIA
<i>C. lipolytica</i> ATCC 8662	Amostra padrão da ATCC	Cirigliano, Carman (1984, 1985) ^{15,16}
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	Coleção do Departamento de Antibióticos-UFPE	Marçal (1991) ¹⁷
<i>C. lipolytica</i> IA 1120	Coleção do Departamento de Antibióticos-UFPE	Sarubbo et al., (1997) ¹⁸
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	Coleção do Departamento de Antibióticos	Sarubbo et al., (1999) ¹⁹
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	Coleção do Departamento de Antibióticos	Sarubbo et al., (2001) ²⁰
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	Coleção do Departamento de Antibióticos-UFPE	Vance-Harrop et al., 2003) ²²
<i>C. lipolytica</i> UCP 0998	Coleção de Culturas (UCP), Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-UNICAP	Albuquerque et al. (2006) ²⁴
<i>C. lipolytica</i> UCP 0998	Coleção de Culturas (UCP), Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-UNICAP	Sarubbo et al., (2007) ²¹
<i>C. lipolytica</i> UCP 0998	Coleção de Culturas (UCP), Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-UNICAP	Rufino et al.,(2006, 2007,2008) ^{36,37,38}
<i>C. lipolytica</i> UCP 0998	Coleção de Culturas (UCP, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-UNICAP	Andrade et al.,(2008) ²⁶

UCP=Universidade Católica de Pernambuco
UFPE= Universidade Federal de Pernambuco

3. Influência dos parâmetros químicos e físicos na produção de agentes emulsificantes por amostras de *Candida lipolytica*

Em geral, a estrutura dos biossurfactantes produzidos por *C. lipolytica* inclui uma parte hidrofílica, a qual pode ser constituída por aminoácidos, peptídeos anions ou cátions, como também mono-di ou polissacarídeo, e outra parte hidrofóbica, podendo apresentar ácidos graxos saturados ou insaturados, observando-se na sua maioria estruturas químicas complexas³⁸.

O comportamento fisiológico particularmente de linhagens de *C. lipolytica* de procedência de três coleções, em dezessete estudos de produção de agentes emulsificantes testando fontes de carbono solúveis e insolúveis, associados ao pH inicial e final da fermentação, tempo de cultivo e agitação, sob a resposta atividade de emulsificação e composição química do emulsificante estão sendo apresentados nas tabelas 2 (A-B), 3, 4(A-B) e 5 (A-B).

A tabela 2 (A) apresentam a composição das fontes carbono e nitrogênio, associado aos parâmetros pH inicial e final da fermentação, agitação e tempo de cultivo influenciando na

produção de agentes emulsificantes e na composição química dos bioemulsificantes produzidos por amostras de *C. lipolytica*. Observou-se que o pH da fermentação não é alterado, apenas a agitação e a concentração da fonte de carbono exerceu um efeito na composição dos biopolímeros. A tabela 2(B) mostra que os emulsificantes produzidos pelas amostras de *C. lipolytica* que podem ser agrupados em função da concentração da glicose, mesmo fonte de nitrogênio, pH, a velocidade e tempo de agitação da fermentação, de acordo com a composição química, podendo ser distribuídos em dois grupos. Essas informações são apoiadas pela utilização de fontes de carbono solúveis, como a glicose, explicadas através da Figura 1, que demonstra o metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante³⁸.

A avaliação da fonte de carbono glicose, indicou dois grupos distintos de estrutura química dos biossurfactantes, em função da concentração (1 e 1,5%).

Tabela. 2A- Influência das fontes de carbono (Solúvel) e Nitrogênio, do pH, agitação e do tempo na atividade de emulsificação e na constituição dos biossurfactantes produzidos em batelada por amostras de *Candida lipolytica*.

Amostra de <i>Candida lipolytica</i>	Fontes de carbono e nitrogênio	pH inicial e final	Agitação / tempo de cultivo	Atividade de Emulsificação (UAE)	Composição química dos biossurfactantes	Referência
<i>C. lipolytica</i> IA 1120	1% glicose 0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base)	5,3- 2,0	150 rpm/ 144h	1,0	60% Carboidratos, 23% Proteínas, e 11% lipídeos	Sarubbo et al., (1997) ¹⁸
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	1,5% glicose 0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base)	5,3- 2,0	1 150 rpm/ 144h	1,5	47% Proteínas, 45% Carboidratos e 5% Lipídeos	Sarubbo et al., (2001) ²⁰
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	1,5% glicose 0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base)	5,3- 2,0	1 150 rpm/ 144h	1,5	54,3% Proteínas, 35,5% Carboidratos e 8,4% Lipídeos	Vance-Harrop et al., (2003) ²²

Tabela. 2B- Distribuição em grupos os bioemulsificantes produzidos por amostras de *Candida lipolytica* em função das fontes carbono glicose, Nitrogênio (YNB), pH, agitação e o tempo da fermentação influenciando na constituição química dos polímeros

Grupo I - Glicose 1%+ 0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base) Agitação 150rpm	Grupo II - Glicose 1,5%+ 0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base) Agitação 150rpm	
60% Carboidratos 23% Proteínas 11% Lipídeos	47% Proteínas 45% Carboidratos 5% Lipídeos	54,3% Proteínas, 35,5% Carboidratos e 8,4% Lipídeos

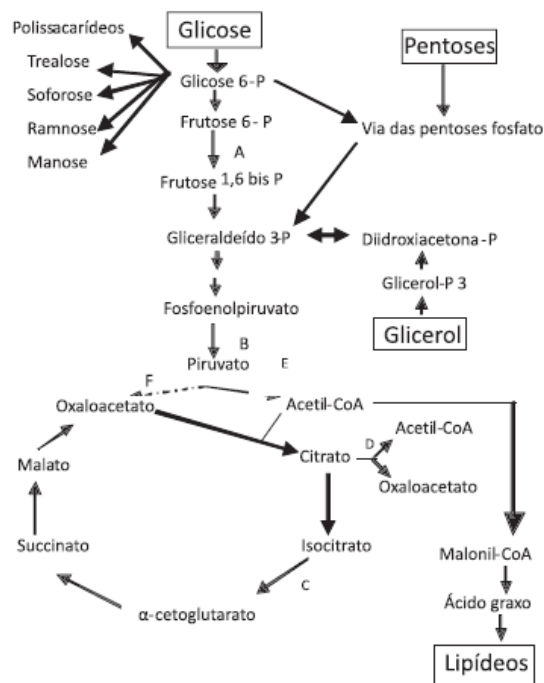


Figura 1. Metabolismo intermediário relacionado a síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos como substrato. Enzimas chaves no controle do fluxo de carbono: (A) fosfofrutquinase; (B) piruvato quinase; (C) isocitrato desidrogenase; (D) citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos); (E). piruvato desidrogenase; F. piruvato carboxilase. (FONTES et al., 2008)⁴⁰.

Portanto, as leveduras são conhecidas como produtoras de biomoléculas extracelulares com atividade de emulsificação, quando cultivada em substratos miscíveis (glicose). Existem vários fatores que influenciam qualitativamente e quantitativamente na produção de biossurfactantes; dentre eles podemos citar os fatores físico-químicos relacionados à estrutura química, metabolismo celular, substrato, pH, temperatura, força iônica e salinidade, além da agitação e a composição dos meios de cultura. Desta forma, a quantidade e qualidade dos biossurfactantes produzidos pelas diversas espécies de microrganismos são influenciadas tanto pela concentração da fonte de carbono quanto de nitrogênio, além das condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação³⁹. Os parâmetros utilizados para medir a eficiência dos biossurfactantes são: redução da tensão superficial, redução da tensão interfacial, emulsificação e concentração micelar crítica².

Zhang e Miller⁴⁰ e Benincasa^{41,42} relatam que a concentração necessária de biossurfactante para se atingir a CMC está entre 1 a 200 mg/L; contudo, estudos devem ser realizados para definir a melhor relação entre carbono, nitrogênio, no sentido de se obter uma alta produção de biossurfactantes. A literatura descreve que, após o total consumo de nitrogênio do meio de cultivo, o metabolismo microbiano é dirigido para a produção de biossurfactantes, que aumenta após na fase estacionária de crescimento.

Os biossurfactantes são produzidos por uma grande variedade de microrganismos, sendo secretados extracelularmente ou ligados a alguma parte da célula, predominantemente produzido durante o crescimento em substratos imiscíveis². Desta forma, estudos são necessários para elucidar totalmente a função fisiológica dos biossurfactantes, embora algumas funções possam ser atribuídas ao uso de fonte de carbono imiscível⁴³.

O transporte de hidrocarbonetos tem uma função atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *C. tropicalis*, onde um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido graxo, presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarboneto⁴⁴.

Observa-se, que biossurfactantes complexos são produzidos por um grande número de linhagens de *C. lipolytica*, cujos estudos foram descritos inicialmente por Parellieux¹⁴. Em 1979, o autor observou que um biopolímero extracelular era produzido por *C. lipolytica*, o qual apresentava propriedades emulsificantes, quando a levedura era crescida em n-tetradecano ou numa mistura de hidrocarbonetos lineares. O autor observou ainda, que qualquer n-alcano utilizado como fonte de carbono ocorria à produção de biopolímero e suas respectivas proporções na molécula permaneciam inalteradas, favorecendo a propriedade surfactante do polímero como sendo, um possível papel na assimilação dos hidrocarbonetos pelas células. Por outro lado, Cirigliano e Carman^{15,16}, isolaram um bioemulsificante a partir de *C. lipolytica*, amostra da Coleção da ATCC (American Type Culture Collection), quando crescida em n-hexadecano. O emulsificante produzido foi denominado de Liposan, de constituição, principalmente, por carboidratos. Pouco depois, o polímero obtido foi isolado e purificado, sendo constituído por 83% de carboidratos e 17% de proteínas¹⁶. O liposan é biossurfactante extracelular, polimérico, solúvel em água, sintetizado por *C. lipolytica*, solúvel em água e a porção carboidrato é um heteropolissacarídeo, constituído por glicose, galactose, galactosamina e ácido urônico;

contudo, a porção heteropolissacarídica não permite a capacidade de emulsificação, porém torna-se um potente agente emulsificante quando associado às proteínas ou lipídeos³⁹.

No entanto, a natureza insolúvel de substratos como os n-alcenos e outros hidrocarbonetos em meio aquoso, requer a existência de mecanismos que facilitem seu consumo. Estes substratos podem ser transportados de alguma forma para atingir o contato com a célula, sob três formas de transporte^{43,45,46,47,48}:

- a) A interação das células com hidrocarbonetos dissolvidos na fase aquosa aplica-se quase que exclusivamente à hidrocarbonetos de cadeia curta, pois a dissolução de alcenos de cadeia longa em meio aquoso, através de processos físicos, é muito lenta e estas condições não favoreceriam o desenvolvimento celular;
- b) Contato direto das células com grandes gotas de hidrocarbonetos: ocorre quando as células microbianas aderem à superfície das gotas de hidrocarbonetos maiores que as próprias células, sendo o substrato consumido por difusão. A superfície das células tem sido sugerida como o fator limitante para o consumo de substrato. A emulsificação dos hidrocarbonetos através da produção de agentes biossurfactantes aumenta a superfície entre estas duas fases; e
- c) A interação das células com as gotas de hidrocarbonetos se faz mediante a produção de enzimas que interagem com partículas de hidrocarbonetos pseudosolubilizadas. A emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos fornecem substratos que facilitam o crescimento de microrganismos, porém os microrganismos podem também produzir surfactantes em substratos hidrossolúveis, utilizados como fonte de carbono.

A produção de biossurfactantes vem sendo fortemente influenciada pela análise genética, que através de manipulações da engenharia genética produzem microrganismos hiperprodutores⁴⁷. É possível sugerir que a produção dos biossurfactantes apresente etapas em comuns com as vias biossintéticas utilizadas apresentada na Figura 2. Estudos têm demonstrado ser possível atingir elevadas concentrações celulares (>50 g/L) com altos teores de polímero (cerca de 60% da massa celular seca) utilizando carboidratos. Por outro lado, a composição dos óleos vegetais utilizados, considerando a composição dos ácidos graxos (Tabela 3). A tabela apresenta a composição química dos óleos vegetais em função de saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

Com os resultados obtidos com o uso de fonte de carbono hidrofóbicos os perfis observados foram biossurfactantes com maior conteúdo em proteínas na composição química. No entanto, quando as fontes hidrofóbicas apresentavam maior conteúdo em ácidos graxos saturados (Tabela 3 e Figuras 2 e 3).

Desta forma, é observado que o microrganismo produtor de biossurfactantes a partir de fontes hidrofóbicas permite explorar matérias-primas renováveis e abundantes no Brasil, considerando a necessidade de se obter materiais bastante diversos em composição química e propriedades⁴⁹. Ao mesmo tempo, outros caminhos são sugeridos utilizando outras fontes de carbono. A utilização de fontes hidrofóbicas (óleos vegetais), os quais são degradados a ácidos graxos, provavelmente, por lipases ou esterases, liberando ácidos graxos que são oxidados até acetil-CoA, através do ciclo da beta-oxidação, podendo seguir ou para o ciclo de Krebs ou para a síntese de biossurfactantes⁴³.

A elevada produtividade de biossurfactantes é sem dúvida, uma estratégia de grande potencial biotecnológico, podendo ser de grande utilidade o desvio de rotas metabólicas, visando a ampliação de escala, cuja biossíntese e regulação necessitam de maiores esclarecimentos.

Tabela 3 - Composição química dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e Poliinsaturados dos óleos vegetais utilizados como fontes hidrofóbicas e carbono por *Candida lipolytica* para a produção de biossurfactantes.

Ácidos graxos (%)	Óleos Vegetais					
	Soja	Milho	Babaçu	Côco	Canola	Dendê
Saturados	14,0	13,9	50,0	88,5	4,0	76,0
Monoinsaturados	23,2	26,6	40,0	9,0	53,0	15,0
Polinsaturados	62,8	59,5	10,0	2,5	43,0	9,0

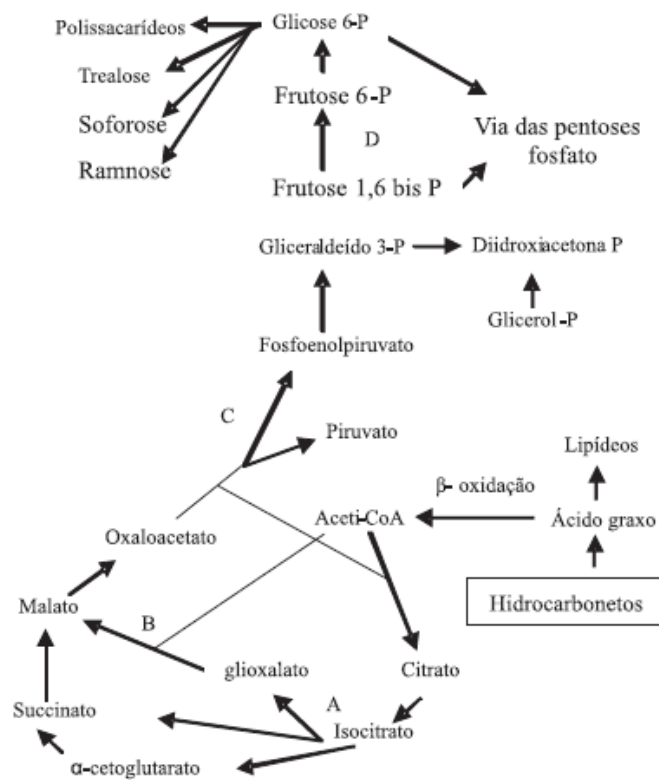


Figura 2 – Metabolismo intermediário relacionado a síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves são: (A) isocitrato liase; (B) malato sintase; (C) fosfoenolpiruvato carboxilase; (D) frutose – 1,6 bifosfatase. (FONTES et al., 2008)⁴⁰

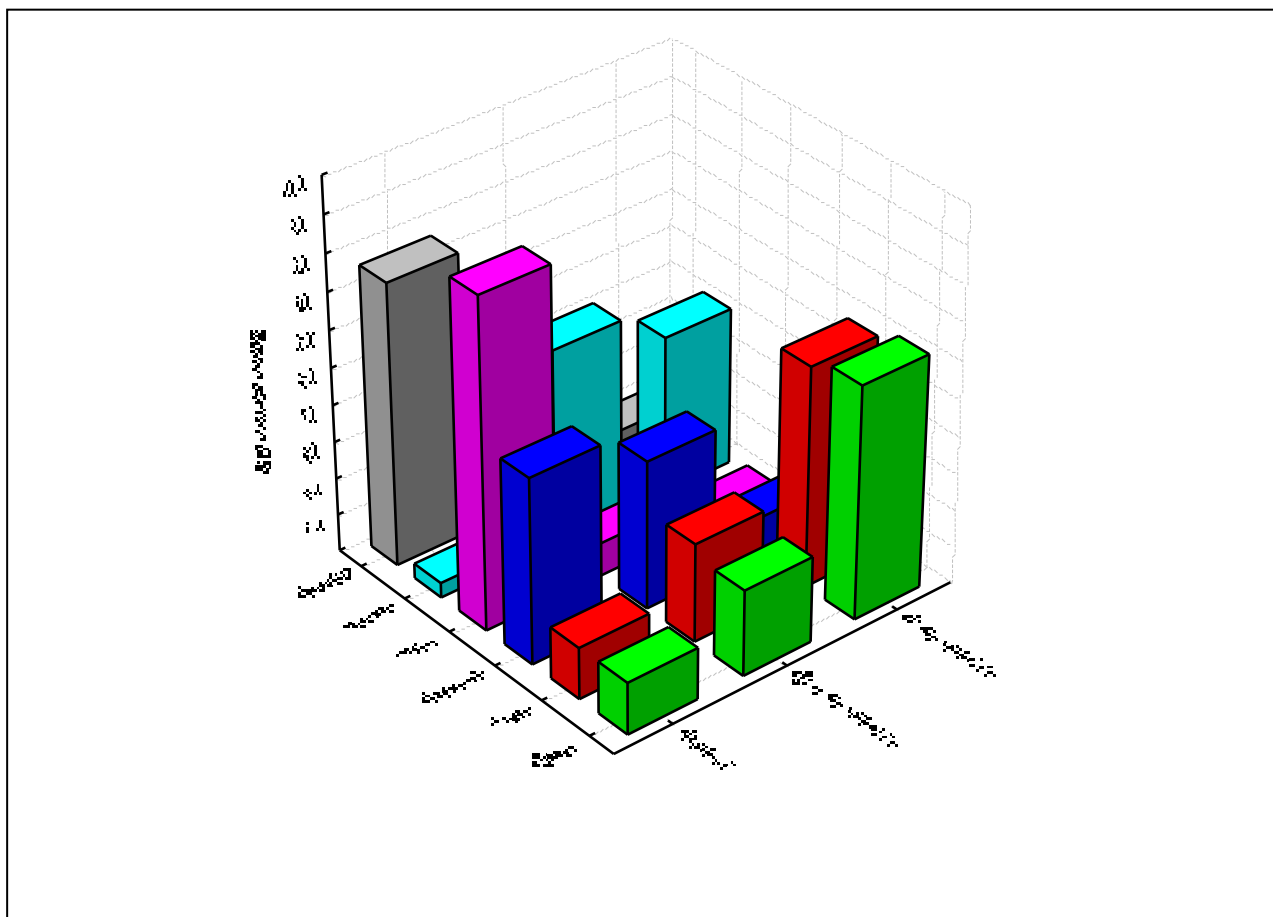


Figura 3. Perfil dos ácidos graxos componentes das fontes hidrofóbicas (óleos vegetais) na produção de agentes emulsificantes utilizados por *Candida lipolytica*.

Desta forma, as fontes hidrofóbicas forma previamente utilizadas por Pareilleux¹⁴, o qual observou a produção de um polímero extracelular por *C. lipolytica* com propriedades emulsificantes quando crescida em n-tetradecano ou em uma mistura de hidrocarbonetos lineares. O autor observou que qualquer n-alcano utilizado como fonte de carbono produzem polímeros, onde suas respectivas proporções na molécula permaneciam

inalteradas. A propriedade surfactante do biopolímero está relacionada ao possível papel na assimilação dos hidrocarbonetos pelas células da levedura.

Mais tarde, Sarubbo et al.^{18,19,20,21} demonstraram resultados a partir da *C. lipolytica* utilizando como substrato óleo de babaçu. A partir deste resultado, surgiu espaço para novas pesquisas, utilizando glicose como fonte alternativa de carbono na produção de bioemulsificantes para aplicação em indústria de alimentos. Observou-se que com o uso de óleo de babaçu (elevado teor de ácidos graxos saturados) como fonte de carbono observou-se três perfis distintos em função da velocidade de agitação e do tempo da fermentação, constituídos de: Proteínas-Carboidratos-Lipídeos e Carboidratos-Proteínas-Lipídeos. Contudo, quando a fonte de nitrogênio mudou ocorreu a formação do complexo Proteínas-Carboidratos-Lipídeos, conforme descrito nas tabelas 4A e 4B.

Tabela 4A- Influência das Fontes de carbono (óleo de babaçu) e nitrogênio, do pH, agitação e tempo na atividade de emulsificação e na constituição dos biossurfactantes produzidos em batelada por amostras de *Candida lipolytica*.

Amostras de <i>Candida lipolytica</i>	Fontes de carbono e nitrogênio	pH inicial e final	Agitação/ tempo de cultivo	Atividade de Emulsificação (UAE)	Composição química dos biossurfactantes	Referência
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	5% óleo babaçu 0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base)	5,3-2,0	200rpm /144h	19,79	70,3% Proteínas 17,3% Carboidratos 2,1% Lipídeos	Marçal (1991) ¹⁷
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	5% babaçu 0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base)	5,3-2,3	150rpm / 60h	0,66	60% Carboidratos 23% Proteínas 11% Lipídeos	Sarubbo et al., (1997;1999, 2001) ¹⁹
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	5% óleo babaçu 0,025% uréia; 0,01% (NH ₄) ₂ SO ₄	5,3-5,9	150rpm / 168h	0,15	43% Proteínas 40% Carboidratos 16% Lipídeos	Vance-Harrop et al., (2003) ²²

Tabela 4B- Distribuição em grupos os bioemulsificantes produzidos por amostras de *Candida lipolytica* em função das fontes hidrofóbicas, Nitrogênio, pH, agitação e o tempo da fermentação influenciando na constituição química dos polímeros

Grupo I – Óleo de babaçu + YNB (Yeast Nitrogen Base)		Grupo II - Óleo de babaçu 5%+ uréia
Agitação 200rpm/144h	Agitação 150rpm/60h	Agitação 150rpm/168h
70,3% Proteínas 17,3% Carboidratos 2,1% Lipídeos	60% Carboidratos 23% Proteínas 11% Lipídeos	43% Proteínas 40% Carboidratos 16% Lipídeos

Neste sentido, estudos foram selecionados sobre a produção de biossurfactante por *C. lipolytica* utilizando fontes hidrofóbicas, como apresentado na Tabela 5A. Observa-se que ocorre uma grande diversidade de substratos hidrofóbicos, desde hidrocarbonetos lineares, fontes agroindustriais, como também resíduos industriais graxos. Os óleos côco e dendê que apresentam porcentagem elevada de ácidos graxos saturados (Tabela 3) contribuíram para produzir emulsificante com maior conteúdo em proteínas, seguido de carboidratos e lipídeos. No entanto, com o resíduo de refinaria de óleo de soja observou-se composição química distinta, no conteúdo mais elevado em proteínas e lipídeos, seguido de carboidratos (Tabela 5A e 5B).

Desta forma, para Cooper e Paddock²³, utilizando a *C. bombicola* ATCC 22214 obtiveram altos rendimentos de biossurfactantes utilizando duas fontes de carbono, óleo vegetal e carboidrato.

Em 1990, Sing⁴⁶ e colaboradores demonstraram que a *C. tropicalis* produziu “SCP” (single cell protein) utilizando n-hexadecano como fonte de carbono, resultando na produção extracelular de um bioemulsificante.

Kitamoto^{50,51}, utilizando a *C. antarctica* T-34, observaram o acúmulo de biossurfactantes quando a levedura foi cultivada em óleo de soja como fonte de carbono. Os biopolímeros isolados consistiam em glicolipídeos. Posteriormente, o autor como teste, utilizou três amostras de *C. antarctica* produtoras de biossurfactantes. Os biopolímeros produzidos eram similares àqueles obtidos a partir da T-34, mas diferentes na composição das misturas dos lipídeos. Destas, a amostra T-34 foi identificada como a melhor produtora em termos de rendimento a partir de vários óleos vegetais, mas não teve a capacidade de utilizar n-alcenos e carboidratos.

Davila⁵² utilizaram a *C. bombicola* CB 56009, onde obtiveram a produção de glicolipídeos a partir de ácidos graxos de óleo de “rapeseed” e glicose, resultando em uma alta produção devido à utilização da tecnologia de fermentação em batelada alimentada.

Em 1992, Johnson⁵³ e colaboradores observaram a produção de um agente emulsificante extracelular por *Rhodotorula glutinis* ITP-30 quando utilizava glicose durante em cultivo em batelada alimentada.

Zhou e Kosaric⁵⁴, a partir da *Torulopsis bombicola*, hoje considerada como *Candida*, testaram a produção simultânea de glicolipídeos intra e extracelulares num único processo fermentativo utilizando variáveis fontes de carbono. Os autores examinaram o efeito da lactose, galactose, óleo de oliva, óleo de açafrão e soro de leite. Obtendo os seguintes

resultados: A glicose e o óleo de açafrão também constituíram boas fontes de carbono para a produção de glicolipídeos e a lactose juntamente com óleo de oliva foram as fontes de carbono mais efetivas na produção simultânea destes polímeros.

Mais tarde, em 1993, Hommel e Huse⁵⁵, obtiveram como resultado, a partir de glicose e frutose, grandes quantidades de glicolipídeos por *C. apicola* durante a fase estacionária de crescimento. Kitamoto⁵⁸, utilizaram células na fase estacionária de crescimento da *C. antarctica* T-34, onde observou-se um aumento considerável da produção de glicolipídeos, a partir de fontes de carbono insolúveis em água, sendo o rendimento obtido maior do que ao se utilizar células da levedura em crescimento.

Brandão⁵⁶ selecionou quatro leveduras produtoras de biossurfactantes após uma pré-seleção avaliando o potencial de atividade de emulsificação (AE) por *C. albicans*, *C. pelliculosa*, *C. tropicalis* e *C. sphaerica*. Após nova avaliação quanto ao poder de emulsificação, foram selecionadas as *C. tropicalis* e *C. sphaerica*. Os biossurfactantes produzidos com as leveduras crescidas em fonte de carbono alternativa (óleo de babaçu-5%) foram caracterizados como moléculas com maior percentual de proteínas, seguido de lipídeos e carboidratos como a menor fração.

Vance-Harrop⁵⁷ demonstrou que a *C. lipolytica* IA 1055 possui excelente potencial na produção de biossurfactantes com habilidade de emulsificação, em meios de cultura de baixo custo. Considerando o potencial biotecnológico de *C. lipolytica*, novas investigações foram realizadas utilizando os meios de cultura de baixo custo, a base de água do mar, adicionados de óleo de babaçu e glicose como controle da fonte de carbono. Observou-se maior produção de biossurfactantes com os meios Yeast Salt Water-Babaçu (YSW-B2) e Yeast-Salt Water-Babaçu (YSW-B3), cujas moléculas produzidas apresentaram excelente capacidade de emulsificação, sendo consideradas como novos bioemulsificantes, constituídos quimicamente por carboidratos, proteínas e lipídeos.

Rufino^{34,35,36}, a partir da *C. lipolytica* UCP0988, testou um meio mineral contendo resíduo de refinaria de óleo de soja como substrato de baixo custo. Os resultados obtidos demonstraram um rendimento de 4,5 g/L de biossurfactante, com redução da tensão superficial do meio para 32 mN/m. O biossurfactante isolado apresentou em sua constituição 50 % de proteínas, 20% de lipídeos e 8% de carboidratos. Neste estudo, foi concluído que o biossurfactante produzido por *C. lipolytica* quando cultivada em meio de baixo custo como (resíduo de refinaria de óleo de soja) representa uma alternativa de produção de um biopolímero com perspectivas de aplicações futuras no controle da poluição ambiental causada por petróleo e derivados.

Albuquerque²⁴ usaram uma metodologia de superfície de resposta para estudar a produção de bioemulsificadores por *C. lipolytica*. Um planejamento fatorial 2⁴ foi realizado para investigar os efeitos e interações de óleo de milho, uréia, sulfato de amônia e ortofosfato de potássio e atividade de emulsificação (AE) do bioemulsificante produzido.

Luna⁴⁴ obteve como objetivo a produção de agentes surfactantes a partir de nova linhagem de *C. glabrata* UCP 1002, isolada de sedimento de mangue, utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos, onde foram avaliadas as cinéticas de crescimento, produção do biossurfactante e propriedades do biopolímero obtido, isolamento, caracterização preliminar e aplicação na remoção de óleos.

Bezerra⁵⁸, no intuito de avaliar a produção de biossurfactante, utilizou um substrato não convencional, melação de cana-de-açúcar, proveniente da indústria açucareira, para reduzir os custos de produção. A cepa identificada como AP029/GLVIA, isolada de poços de petróleo do Estado do Rio Grande do Norte e utilizada nos ensaios, pertencia à coleção de cultura do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os cultivos foram submetidos a diferentes condições utilizando um planejamento fatorial, no qual os fatores estudados foram concentração de melação, concentração de nitrato (fonte de nitrogênio), agitação e razão de aeração.

Albuquerque²⁴ desenvolveu um softsensor baseado em redes neurais para fazer inferência da concentração de biomassa e da atividade de emulsificação do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*, a fim de otimizar os componentes do meio de cultura e ampliar o processo para escala de biorreator. A otimização dos componentes dos meios de produção de bioemulsificante foi realizada usando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta, onde a atividade de emulsificação demonstrou um aumento da produção de bioemulsificante em 262,8%.

Os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes sintéticos devido ao seu alto custo de produção e, para que possam competir significativamente no mercado, devem ser seguidos dois pré-requisitos: 1) aumentar o conhecimento e a habilidade em manipular o metabolismo de microrganismos produtores, de forma que substratos de baixo custo possam ser usados; 2) otimização de tecnologias de processo para facilitar a recuperação do produto^{41,42}.

Um importantíssimo fator, relacionado à produção de biossurfactantes, são os substratos, associados ao pH, a temperatura, agitação e tipo de fermentação, apresentados nas **Tabelas 2, 3 e 4**. Os substratos influenciam no custo, quantidade e qualidade da produção de biossurfactantes, na constituição de sua estrutura química como também nos processos de fermentação, entre outros fatores. Os substratos, em geral, podem ser

classificados em solúveis (glicose, sacarose, glicerol, etanol) ou insolúveis (hidrocarbonetos, óleos vegetais). Para reduzir os custos dos processos de produção alguns substratos baratos são usados na produção de biossurfactantes, destacando-se os óleos de babaçu, milho, girassol, soja, jojobá, entre outros. Existem ainda os substratos baratos provenientes de recursos renováveis, aqueles que apresentam fonte de carbono, especialmente os de resíduos agroindustriais como: polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais e mandioca, entre outros^{59,60}.

Os hidrocarbonetos são substratos especiais, devido a sua forte influência na produção de biossurfactantes. Hidrocarbonetos incluem compostos formados por carbono e hidrogênio com propriedades químicas e físicas definidas pelo número de átomos e arranjo das moléculas. O petróleo, por exemplo, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos que podem ser divididos em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. A fração dos compostos saturados inclui os n-alcenos, alcenos ramificados (isoalcenos) e cicloalcenos. A fração aromática contém hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis como benzeno, tolueno e xileno; os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; os naftenoaromáticos e compostos de enxofre, tais como tiofenos e dibenzotiofenos. As resinas e a fração asfalteno consistem de moléculas polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio. As resinas caracterizam-se por serem sólidos amorfos dissolvidos no óleo, enquanto os asfaltenos apresentam-se como grandes moléculas coloidais dispersas no óleo⁶¹.

Os processos de fermentação são normalmente complexos, devido à síntese de produtos pelo microrganismo, influência de fatores externos e internos (concentrações de substrato, produto, pH, etc.), entre outros. Estes processos são descritos por equações não lineares, tendo o tempo como o parâmetro variado. Geralmente o resultado ótimo e o perfil de controle são calculados para os parâmetros que são assumidos serem constantes (não podem ser percebidas as ótimas soluções na prática) ou quando os parâmetros são funções das condições físicas ou químicas do processo, como pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido, entre outros⁶².

Tabela 5 A- Influência de fontes de carbono (insolúveis) e nitrogênio, do pH, da agitação e do tempo na atividade de emulsificação (UEA) dos biossurfactantes produzidos por amostras de *Candida lipolytica*

Amostras de <i>Candida lipolytica</i>	Fontes de Carbono e Nitrogênio	pH inicial e final	Agitação (rpm)/ tempo de cultivo (h)	Atividade de Emulsificação (UAE)	Composição química dos biossurfactantes	Referência
<i>C. lipolytica</i> ATCC 8662	1% hexadecano/0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base)	5,0-2.1	220 /140	1,40	83,0%Carboidratos e 17,0% Proteínas	Cirigliano, Carman, (1984, 1985) ^{15,16}
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	5% óleo coco/0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base)	5,3-2,0	200/144	20,49	85,6 % Proteínas, 12,3%Carboidratos e 1,9% lipídeos	Marçal (1991) ¹⁷
<i>C. lipolytica</i> IA 1055	5% óleo dendê/0,6% YNB (Yeast Nitrogen Base)	5,3-2,0	200/144	24,89	75,6% Proteínas, 22,5%Carboidratos e 1,0% lipídeos	Marçal (1991) ¹⁷
<i>C. lipolytica</i> UCP 0998	5% de óleo de milho/YSW (0,544% uréia; 2,131 % (NH ₄) ₂ SO ₄ e KH ₂ PO ₄)	5,3-2,5	150/ 127	4,41	Não informado	Albuquerque et al., (2006) ²⁶
<i>C. lipolytica</i> UCP 0998	10% glicose e 10% óleo canola, 0,1% NH ₄ NO ₃ e 0,2% extrato de levedura	5,7-2.5	150/ 144	2,19	40,2 % Proteínas, 24,0% Lipídeos e 19,5%Carboidratos	Sarubbo et al., (2007) ²¹
<i>C. lipolytica</i> UCP 0998	2,5% resíduo de refinaria de óleo de soja/0,1% NH ₄ NO ₃ , 0,1% extrato de levedura, 0,1% KH ₂ PO ₄ ; 0,02% MgSO ₄ .7H ₂ O ;	5,7-5,5	150/144	4,80	50,0% Proteínas, 20,0% lipídeos e 8,0% Carboidratos	Rufino (2008) ³⁶ ; Rufino et al. (2007) ³⁷

Tabela 5B- Distribuição em grupos os bioemulsificantes produzidos por amostras de *Candida lipolytica* em função das fontes hidrofóbicas, Nitrogênio, pH, agitação e o tempo da fermentação influenciando na constituição química dos polímeros

Grupo I –YNB (Yeast Nitrogen Base)		Grupo II – Resíduo de refinaria de óleo de soja	Grupo III - Óleo vegetal rico em ácidos graxos insaturados
Hexadecano Agitação 200rpm	Óleos dendê e côco Agitação 200rpm	0.1 % NH ₄ NO ₃ Agitação 150rpm	10% glicose + 10% óleo canola/ 0,1% NH ₄ NO ₃
83,0%Carboidratos e 17,0% Proteínas	75,6-86% Proteínas, 22,1-13% Carboidratos 2,3-1,9% Lipídeos	50% Proteínas 20% Lipídeos 8% Carboidratos	40,2 % Proteínas, 24,0% Lipídeos e 19,5%Carboidratos

4. Perspectivas econômicas dos emulsificantes produzidos por *Candida lipolytica*

Apesar de existirem vários estudos a respeito de aplicações industriais dos biossurfactantes produzidos devido às suas propriedades químicas, tecnológicas e funcionais indicam fortes possibilidades de uso tanto industrial, como ambiental. O maior mercado para os biossurfactantes tem sido a indústria petrolífera, ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações na área petrolífera incluem a biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagens e a recuperação terciária do petróleo. Grande parte do biossurfactante produzido (400-500 toneladas/ano) tem sido usada nas aplicações relacionadas ao petróleo⁴. Atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais, como apresentado na **Tabela 6**.

Contudo, as metodologias para recuperação utilizam extrações com solventes orgânicos, como clorofórmio-metanol, butanol, acetato de etila, pentano, hexano, ácido acético ou precipitação ácida. No entanto, esses métodos de recuperação necessitam ser estudados, visando à substituição por técnicas mais simples, menos onerosa, utilizando novos processos, incluindo a cristalização, adsorção e ultra-filtração⁴⁷.

A produção mundial de óleos e gorduras é de cerca de 147 milhões de toneladas²¹, sendo que 77,3% correspondem a óleos vegetais. Por outro lado, os milhões de toneladas de resíduos industriais gerados todos os anos, poderia ser transformados na sua grande maioria, com a finalidade de agregar valor e possibilitar o baixo custo na produção de insumos biotecnológicos.

Os biossurfactantes são amplamente utilizados em diversas aplicações industriais, porém, apesar de muitos elementos favoráveis a sua produção industrial ainda é insuficiente para aplicação. Este fato, se deve principalmente, aos custos envolvidos em seu processo de produção, associado aos métodos pouco eficientes de recuperação do produto. Contudo, os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser utilizados em várias aplicações industriais, considerando os altos custos de produção, associados ao uso de substratos caros. O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, renováveis, facilmente disponíveis e de baixo custo. Com o aumento dos esforços no desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação, com o melhoramento genético das linhagens os microrganismos hiperprodutores poderão ser empregados nos processos de produção e, principalmente, devido a sua versatilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade.

Tabela 6 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

FUNÇÕES	CAMPOS DE APLICAÇÃO
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: Banat¹

5. Vantagens e desvantagens na produção de biossurfactantes

Segundo Rahman et al.⁷¹ as vantagens dos biossurfactantes naturais frente os surfactantes produzidos quimicamente são as seguintes:

Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados por vários microrganismos.

Baixa toxicidade: os biossurfactantes são apresentam baixa toxicidade ou total ausência de efeitos tóxicos, permitindo assim a ampliação na sua utilização.

Biocompatibilidade: considerando a baixa toxicidade os biossurfactantes apresentam ampla aplicação em diferentes setores industriais.

Produção a partir de resíduos agroindustriais: os biossurfactantes são produzidos a partir materiais brutos, como resíduos industriais para uma ampla produção e baixo custo.

Preservação e controle ambiental: os biossurfactantes podem ser usados cientificamente na preparação na biodegradação, na detoxificação e na biorremediação.

Especificidade: os biossurfactantes são moléculas orgânicas complexas, com grupos funcionais específicos que frequentemente apresentam ação de redução da tensão superficial, interfacial e emulsificação.

Os biossurfactantes também apresentam desvantagens no seu uso, segundo Pattanathu et al., destacando-se:

- Aumento da escala de produção, tendo em vista o alto custo. Contudo, alguns autores sugerem a utilização de resíduos industriais como substratos, ao mesmo tempo em que reduz as contaminações ambientais, minimizando os custos de produção.
- A dificuldade na obtenção de substâncias puras, cujos processos de recuperação requerem o envolvimento de vários passos para obter biossurfactantes sem contaminantes, com a finalidade de ampla aplicação.
- A dificuldade de encontrar amostras de microrganismos superprodutoras, como também os meios de produção, estável que proporcione crescimento microbiano e elevados níveis de produção de biossurfactantes e de baixo custo.
- A necessidade de ampliar o conhecimento das vias biossintéticas e de regulação da síntese e do crescimento microbiano e da produção de biossurfactante. Estabelecimento do fenômeno correlacionado com fase estacionária de crescimento e produção de metabólito secundário, com as possíveis mudanças morfológicas.
- O baixo rendimento na produção extracelular do biossurfactante, considerando que o mesmo fica diluído no líquido metabólico, devendo existir estratégias para uma maior recuperação do biopolímero.

6. Conclusões

Assim, os biossurfactantes poderão se tornar compostos de uso comum nas indústrias, num futuro próximo, considerando as várias investigações que possibilitam o surgimento de novas biomoléculas, com a redução de custos de produção, tendo em vista o reaproveitamento de resíduos industriais como substratos.

Pesquisas devem ser desenvolvidas visando selecionar substratos adequados e de baixo custo para a produção de biossurfactantes devem ser realizadas a partir dos perfis estabelecidos na presente revisão. Portanto, estudos devem ser realizados para reutilizar os resíduos agro-industriais oriundos dos processamentos dos óleos de soja, milho, coco, amendoim e canola, gorduras animais, associado a fontes solúveis como beterraba, sorgo, casca de soja, bagaço da cana-de-açúcar e resíduos do processamento de algumas frutas como maçã, banana e abacaxi. Esses resíduos são considerados uma forma estratégica e vantajosa para minimizar os custos e elevar a produção de biossurfactantes⁴⁶ pelo estado anamorfo de *C. lipolytica*, devido às facilidades de manuseio e estabilidade da levedura.

Deve-se levar em consideração ainda, que as inúmeras características e propriedades apresentadas pelos biossurfactantes produzidos por *Candida lipolytica*, principalmente, redução à tensão superficial não foi apresentada, considerando que a maioria dos trabalhos citados abordaram os agentes emulsificantes. Outros aspectos devem ser considerados, em especial, a estabilidade das emulsões e a redução dos custos de produção, cujos produtos obtidos de *C. lipolytica* torna-se uma realidade o potencial biotecnológico. Neste sentido, destaca-se o rufisan, como um polímero promissor, considerando a versatilidade de aplicação, biodegradabilidade, agente emulsificante, redução da tensão superficial e concentração micelar crítica-CMC.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro do CNPq, CAPES e FACEPE, bem como a UNICAP pelo acesso aos laboratórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 495, 508.
2. Desai, J. D.; Banat, IM. *Microbial Mol Rev.* **1997**, 47, 64.
3. Haba, E.; Espuny, MJ,; Busqueis, M.; Manresa, A. J. *Appl. Microbiol.* **2000**, 379, 387.
4. Bognolo, G. *Physicochem. Eng. Aspects.* 1999, 41, 52.
5. Zhang, G.; WU, Y.; Qian, X.; Meng, Q. J. *Zhejiang Univ. Science.* **2005** 725, 730.
6. Iqbal, S.; Khalid, Z.M.; Malik, K.A. *Letters Appl. Microbiol.* **1995**, 176, 179.
7. Urum, K.; Pekdemir, T. *Chemosphere* **2004**, 1139, 1150.
8. Koch, A.K.; Kappeli, O.; Fiechter, A.; Reiser, J. J. *Bacteriol.* **1991**, 4212, 4219.
9. Baldí, F.; Ivosec, N.; Minauí, A.; Pepi, M.; Fani, R.; Svetlicii, V.; Zutii, V. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 2041, 2048.
10. Deleu, M.; Paquot, M. *Computers Rendus Chimie.* **2004**, 641, 646.
11. Rahman, K.S.M.; Rahman, T.J.; Kourkoutas, Y ; Petsas, I.Marchant, R.; Banat, I. M. *Biores. Technol.* **2003**, 159, 168.
12. Barth, G. ; Gaillardin,C. *FEMS Microbiol. Rev.***1997**, 19(4), 219.
13. Albuquerque, C. D. C. ; Filetti, A. M. F.; Campos-Takaki, G. M. *Can. J. Microbiol.*, **2006**, 52 (6),575.
14. Pareilleux A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.***1979**, 91, 101.
15. Cirigliano, M. C.; Carman, G. M.; *J. Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, 747, 750.
16. Cirigliano, M. C.; Carman, G. M.; *J. Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, 846, 850.
17. Marçal, M.C.R.; Sarubbo, L.A.; Takaki,G.M.; *Dissertação, Mestrado em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil*, **1991**.
18. Sarubbo, L.A., Marçal, M.C.R., Campos-Takaki, G.M., 1997. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **1997**, 707, 720.
19. Sarubbo, L.A., Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., *Can. J. Microbiol.* **1999**, 423, 426.

20. Sarubbo, L.A.; Marçal, M.C.R.; Neves, M.L.C.; Silva, M.P.C.; Porto, A.L.F.; Campos-Takaki, G. M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, 95, 59.
21. Sarubbo, L.A., Farias, C.B.B., Campos-Takaki, G.M., 2007. *Curr. Microbiol.* **2007**, 54, 68-73.
22. Vance-Harrop, M. H.; Gusmão, N. B.; campos-takaki, G. M. *Braz. J. Microbiol.* **2003**, 120, 123.
23. Cooper, D.G., Paddock, D.A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, 173-176.
24. Albuquerque, C.D.C; Filetti, A.M.F.; Campos-takaki, G.M. *Can. J. Microbiol.* **2006**, 52, 575
25. Boguslawska-Was, E.;Czeszejko, K.;Bartkowiak, A.; Dabrowski, W.; Michniewicz, A.; Szameto, K. *Ele. J. Polish Agric. Univver.* **2005**, 8(3), 1.
26. Andrade, R.F.S.; Luna, J. M. ; Sarubbo, I. A. ; Campos-Takaki, G. M. *Workshop Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia - De mãos dadas para o futuro*, 2006, Recife. In: 1º Workshop Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia - De mãos dadas para o futuro, 2006.
27. Sobrinho, H.B.S.;Rufino,R.D.; Luna, J.M.; Salgueiro, A.A.; Campos-Takaki, G.M.;C. Leite, L.F.C.; Sarubbo, L.A. *Process Biochem.* 43(9), 912.
28. Van der Meer J.R. *Science and Technol.*, **1994**, 36, 20.
29. Van der Meer Leveau, J.H.; Werlen, C. **1994**, *EAWAG News (Swiss Federal Institute Science and Technology)*, 35E,8.
30. Shiosaki, R.K. Albuquerque, CD; Barros Neto, B.; Campos - Takaki, GM. 2nd *Bioremediation European Conference*, 2003, 1, 107.
31. Shiosaki, R.K. Albuquerque, CD; Okada, K.; Campos –Takaki, GM. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2008**, 51, 613.
32. Larpent, J.P.; Bervas, E.; Bezenger, M.C. *Biotechnologies de levure*, Paris, Masson, 425p. **1991**.
33. Raven, P.H. et al., *Biologia Vegetal*. 6ª ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001.
34. Shankar, J.; Gupta, P.D.; Sridhara,S.; B P Singh, B.P.; S N Gaur, S.N.; Arora, N. *Immunol. Investigations.* **2005**, 34(1), 37.
35. Flores, C. L., O. H. Martínez-Costa, V. Sanchez, C. Gancedo, and J. J. Aragon. *Microbiology.* **2005** 151:1465–1474.

36. Rufino, R.D. Dissertação. Mestrado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, **2006**.
37. Rufino, R. D., Sarubbo, L.A.; Barros Neto, B.; Campos-Takaki, G.M. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 23 (5),729.
38. Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Barros Neto, B.; Campos-Takaki, G.M. *Ind.J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 35, 907.
39. Vasileva-Tonkova, E.;Galabova, D.; Karpenko, E.; Shulga, A. *Letters Appl. Microbiol.* **2001**, 33,280.
40. Fontes, G.C.; Amaral, P.F.F.; Coelho,M.A.Z. *Quím. Nova*, **2008**, 31(8), 2091.
41. Ron, E.Z.; Rosenberg, E., *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 249,252.
42. Zhang, Y., Miller, R.M., *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, 3276, 3282.
43. Benincasa M.; Abalos, A.; Oliveira, I.; Manresa, A. *Antonie van Leeuwenhoek* **2004**, 85, 1.
44. Benincasa M.; Contiero, J.; Manresa, M.A.; Moraes, I.O.J. *Food Enginee.* **2002**, 283, 288.
45. Banat, I. M. *Acta Biotechnologica.***1995**, 251, 267.
46. Luna, J. M. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, **2006**
47. Sarkar, J.M., Hennebert, G.L., Mayaudon, J. *Biotechnology Letters*, **1986**, 319, 322.
48. Singh, A.; Van hamme, J. D.; Ward, O. P. **Application Aspects. Biotechnol.** 2007, 99, 121.
49. Cooper, CB, Macdonald, CR, Duff, SJB, Kosaric, N. *Applied and Enviromental Microbiology* **1981**, 408, 412.
50. Goswami, P; Singh, H.D. *Biotechnology and Bioengineering* **1990**, 1, 11.
51. Tsuge, T. 2002. *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, 579, 584.
52. Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C., Tutuchi, T. *Agric. Biological Chem. J.*, **1990a**, 31, 36.
53. Kitamoto, D., Haneishi, K., Nakahara, T., Tabuchi. *Agric. Biological Chem. J.*, **1990b**, 37, 40.
54. Davila, A.-M., Marchal, R., Vandecasteele, J.P. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1992**, 6, 11.
55. Johnson, V.; Singh, M.; Saini, V.S. *Biotechnol. Letters*, **1992**, 487, 490.

56. Zhou, Q.H.; Kosaric, N. *Biotechnol. Letters*, **1993**, 477,482.
57. Hommel, R.K., Huse, K. *Biotechnol. Letters*, **1993**, 853, 858.
58. Brandão. L V.C. tese (Doutorado) UNESP, 2006.
59. Vance-harrop, M. H. Recife, Tese (Doutorado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, **2004**. 138p.
60. Bezerra, M.S. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte,101, **2006**.
61. Makkar, R. S.; Cameotra, SS. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2002**, 428, 434.
62. Nitschke, M; Pastore,G.M.; *Quim. Nova* **2002**, 772, 776.
63. Balba, M.T.; Al-awadhi, N.; Al-daher, R. J. *Microbiol. Methods*, **1998**, 155, 167
64. Tsoneva, R.G.; Patarinska, T.D.; POPCHEV, I.P. *Bioprocess Eng.* **1998**, 143, 153.
65. Gallert, C.; Winter, J. *Naturwissenschaften*. **2002**, 483, 496.
66. Barbosa, S.P.P.; Carminha, M.C.C.; Paz, M.C.F.; Resumo do II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa, Brasil, **2007**.
67. Tsuge, T. 2002. *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, 579, 584.
68. Kappeli, O., Fiechter, *Journal of Bacteriology*, **1977**, 917,921.
69. Kitamoto, D., Fuzishiro, T., Yanagishita, H. *Biotechnology Letters*, **1993**, 305, 316.
70. Amaral, P.F.F.; DA Silva, J.M.; Lehocky, M.; A.M.V., Barros-Timmons; Coelho, M.A.Z.; Marrucho, I.M.; Coutinho, J.A.P. *Process Biochem*, **2006**, 23 (12),867.
71. Rahman, P.K.S.M.; Gakpe, E. *Biotechnol.* **2008**, 7(2), 360.

ANEXOS

NORMAS DE PUBLICAÇÃO

GERAL Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc., além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc., de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Notas Técnicas (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse

geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato .pdf, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line* de QN. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (gráficos, esquemas, etc.) deverão ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). As figuras, tabelas, esquemas, etc. deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm)

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc. idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de QN junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. No texto, deverá ser indicada apenas indicar a inserção de cada um (a).

REFERÊNCIAS

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473. *Patentes*:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

4. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771* **1979**. (CA 91:P193174v)

5. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004* **1988**. (CA 110:P23729y)

6. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI 9.604.468-3*, **1999**.

Livros:

7. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

8. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

9. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*, Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

10. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

11. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://jbcs.sbq.org.br>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em Q.N. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS - A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a **submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato PDF**. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo. pdf, a partir de arquivo.doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, **sendo obrigatória** a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar - Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples).

Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. **Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.**

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

MANUSCRITOS REVISADOS - Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de **prazo máximo** de três meses ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL - Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc.). Arquivos em formato.pdf não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif ou jpg, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão tif/jpg, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: cdr, eps, cdx ou opj. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do

manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.

Copyright © 2008 Sociedade Brasileira de Química

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.