



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

Danyelle Khadydja Felix dos Santos

**UTILIZAÇÃO DE GORDURA ANIMAL E RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL COMO SUBSTRATOS DE BAIXO
CUSTO PARA A PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE COM POTENCIAL DE
APLICAÇÃO NA ÁREA AMBIENTAL**

Recife
2013

Danyelle Khadydja Felix dos Santos

**UTILIZAÇÃO DE GORDURA ANIMAL E RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL COMO SUBSTRATOS DE BAIXO
CUSTO PARA A PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE COM POTENCIAL DE
APLICAÇÃO NA ÁREA AMBIENTAL**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof^a. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro

Recife

2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Dra. Juliana Moura de Luna
Bolsista de Pós Doutorado do PNPd – CAPES / UNICAP

Defendida em _____

Coordenadora: Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro

À Deus, responsável pelas minhas vitórias. À minha mãe, pelo amor incondicional e apoio sempre presente. Ao meu pai, pelo exemplo de coragem, simplicidade e persistência.
À minha família, pela confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meu caminho durante esta caminhada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, não somente pelo seu papel de excelente pesquisadora, mas sobretudo pelo seu papel de amiga e conselheira, sempre presente em minha vida. Não somente pela dedicação e compreensão, mas pela paciência e garra de querer sempre o melhor para aqueles que ama, e por confiar, acima de tudo, no meu potencial.

À Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro, onde sua participação foi fundamental para realização do projeto com isso passando tranqüilidade, admiração e apoio.

A todos que fazem parte do grupo dos Biossurfactantes, em especial, a Raquel Diniz Rufino, Juliana Moura de Luna, Gabriel Neves e Nathália Padilha pela compreensão, dedicação, disponibilidade em me ajudar nos experimentos.

À minha família, por sempre acreditar em mim e me apoiar.

Aos meus companheiros pelas palavras amigas nas horas difíceis, pelo auxílio nos trabalhos e principalmente por estarem comigo nesta caminhada tornando-a mais agradável.

Enfim, a todos que de alguma forma tornaram este caminho mais fácil de ser percorrido.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
CAPÍTULO 1	
1. Introdução.....	19
2. Objetivos.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3. Revisão da Literatura.....	25
3.1 Surfactantes.....	25
3.2 Biossurfactantes.....	27
3.3 Classificação.....	29
3.4 Micro-organismos produtores.....	29
3.5 Propriedades.....	31
3.6 Aplicações do biossurfactante.....	32
3.6.1 Biorremediação.....	3
3.6.2 Limpeza de reservatórios de óleos.....	34
3.6.3 Recuperação avançada de petróleo – MEOR.....	34
3.6.4 Dispersão de manchas de petróleo.....	34
3.6.5 Indústria de alimentos.....	35
3.6.6 Indústria farmacêutica.....	36
3.6.7 Mineração.....	36
3.6.8 Agricultura.....	37
3.6.9 Medicina.....	37

3.7 Utilização de resíduos industriais na produção de biossurfactantes.....	38
3.7.1 Substratos utilizados na produção de biossurfactantes.....	41
3.7.1.1 Efluente de óleo de oliva verde (OOME).....	41
3.7.1.2 Gordura animal.....	41
3.7.1.3 Óleos de fritura.....	41
3.7.1.4 Borra de sabão.....	42
3.7.1.5 Melaço.....	42
3.7.1.6 Efluente de amido.....	43
3.7.1.7 Milhocina.....	43
3.8 Perspectivas de utilização.....	43
3.8.1 Desenvolvimento de bioprocessos para a produção e recuperação de biossurfactantes.....	44
3.8.1.1 Otimização das condições operacionais.....	47
3.9 Economia na produção de biossurfactantes.....	49
4. Referências Bibliográficas.....	51
CAPÍTULO 2	
Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by <i>Candida lipolytica</i> using animal fat and corn steep liquor.....	61
Abstract.....	63
1. Introduction.....	64
2. Materials and methods.....	65
2.1. Materials.....	66
2.2. Microorganism.....	66
2.3. Growth conditions.....	66
2.4. Biomass estimation.....	67
2.5. Emulsifying activity with different hydrophobic compounds.....	67
2.6. Surface tension and determination of critical micelle concentration.....	68
2.7. Effect of environmental factors on biosurfactant activity.....	68
2.8. Biosurfactant isolation.....	69

2.9. Biosurfactant composition.....	69
2.10. Biosurfactant characterisation by thin-layer chromatography.....	70
2.11. Determination of biosurfactant ionic character.....	70
2.12. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant removal from sand.....	71
2.13. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant spreading.....	71
2.14. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant cleaning test.....	71
2.15. Statistical analysis.....	72
3. Results and discussion.....	72
3.1. Biosurfactant production.....	72
3.2. Biosurfactant emulsification capacity.....	73
3.3. Biosurfactant stability related to surface tension and emulsification.....	74
3.4. Biosurfactant isolation.....	76
3.5. Biosurfactant characterisation.....	77
3.6. Surface tension and critical micelle concentration of biosurfactant.....	77
3.7. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant removal.....	78
3.8. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant spreading.....	80
3.9. Cleaning test.....	80
Acknowledgments.....	81
References.....	81
Legends to figures.....	88
Tables.....	89
Figures.....	96
CONCLUSÕES GERAIS.....	98
ANEXOS.....	99

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Molécula surfactante com porção apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica).....	25
Figura 2	Formação da Micela	26
Figura 3	Gráfico ilustrativo das regiões onde ocorre a formação de micelas (CMC).....	26
Figura 4	Micela formada.....	27

CAPÍTULO 2

Figura 1	Biosurfactant components detected by thin layer chromatography; the samples were applied in 20 µL volumes in TLC plates and developed with a CHCl ₃ :MeOH:H ₃ COOH (65:15:2, v/v) solvent system.....	77
Figura 2	Surface tension versus concentration of biosurfactant isolated from <i>C. lipolytica</i> cultivated in distilled water supplemented with 5.0% animal fat and 2.5% corn steep liquor for 144 h at 200 rpm and 28 °C.....	78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Exemplos de Concentração Micelar Crítica de biossurfactantes e surfactantes químicos.....	28
Tabela 2	Matérias-primas de baixo custo e respectivos micro-organismos utilizados na produção de biossurfactantes	40
Tabela 3	Métodos de recuperação de biossurfactante com base nas propriedades físico-químicas.....	45
Tabela 4	Processos de recuperação de biossurfactantes.....	50

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Composition of fatty acids in animal fat.....	66
Tabela 2	Surface tension and biomass values obtained after <i>C. lipolytica</i> cultivation for 144 h at 200 rpm and 28 °C.....	73
Tabela 3	Emulsification index (EI) of hydrophobic substrates by cell-free broth containing biosurfactant from <i>C. lipolytica</i> cultivated in distilled water supplemented with 5.0% animal fat and 2.5% corn steep liquor for 144 h at 200 rpm and 28 °C.....	73
Tabela 4	Influences of salt concentration, temperature and pH on surface-tension-reducing activity and emulsifying activity of cell-free broth containing biosurfactant from <i>C. lipolytica</i> cultivated in distilled water supplemented with 5.0% animal fat and 2.5% corn steep liquor for 144 h at 200 rpm and 28 °C.....	74
Tabela 5	Removal of motor oil adsorbed in standard sand samples by biosurfactant produced by <i>C. lipolytica</i> UCP0988 cultivated in distilled water supplemented with 5.0% animal fat and 2.5%	

corn steep liquor for 144 h at 200 rpm and 28 °C and by
distilled water (control).....

79

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
g	Grama
L	Litro
rpm	Rotação por minuto
mg	Miligrama
m	Metro
N	Newton
Da	Dalton
mN/m	Mili Newton por metro
µg/mL	Microgramas por mililitro
\$/mg	Valor por miligrama
\$/kg	Valor por quilograma
mg/L	Miligrama por litro
COD/m ³	Demanda química de oxigênio por metro cúbico
kg	Quilo ou Quilograma
mg/kg	Miligrama por quilograma
g/L	Grama por Litro
mL	Mililitro
U.S.	Dólar

LISTA DE ABREVIATURAS

YMA	Yeast Malt Agar
CMC	Concentração Micelar Crítica
P	Fósforo
N	Nitrogênio
Mg	Magnésio
O	Oxigênio
Fe	Ferro
NaCl	Cloreto de Sódio
OH	Hidroxila
Cl	Cloro
NH ₂	Radical amino
NO ₂	Dióxido Nítrico
SO ₃	Anidrido sulfúrico ou óxido sulfúrico ou trióxido de enxofre
HPAS	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
CWO ₄	Tungstato de carbono
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
RNA	Ácido ribonucléico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
C	Carbono
OOME	Efluente do Óleo de Oliva Verde
CMD	Diluição Micelar Crítica
UNICAP	Universidade Católica de Pernambuco
NPCIAMB	Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio Hepta-Hidratado
KH ₂ PO ₄	Di-Hidrogenofosfato de Potássio Monobásico
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto Férrico Hexa- hidratado
YMB	Yeast Mold Broth
NaOH	Hidróxido de Sódio

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
NI	Não informado
h	Hora
K	Potássio
MEOR	Microbial enhanced oil recovery

RESUMO

Os surfactantes são agentes anfipáticos com aplicação em vários segmentos industriais, destacando as indústrias petrolíferas, alimentícias e farmacêuticas. Os biossurfactantes, agentes tensoativos obtidos por via microbiológica, apresentam inúmeras vantagens frente aos surfactantes sintéticos como biodegradabilidade e toxicidade reduzida, embora ainda não sejam comercializados em grande escala em virtude do alto custo de produção. Nesse sentido, um meio de cultivo formulado com 5% de gordura animal e 2,5% de milhocina como substratos foi previamente selecionado para a produção de um biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988 durante 144h a 200 rpm. O biossurfactante, isolado a partir de diferentes sistemas de extração, demonstrou capacidade de redução de tensão superficial da água de 50 para aproximadamente 30 mN/m a uma CMC de 80 mg/L, estabilidade térmica e a diferentes pHs relacionadas à capacidade de emulsificação e redução da tensão superficial, além de tolerância a elevadas concentrações salinas. A caracterização do biossurfactante indicou sua natureza aniônica e a presença de 70% de lipídeos e 30% de carboidratos, sugerindo uma estrutura glicolipídica. O biossurfactante bruto foi eficaz na recuperação de cerca de 70% de óleo de motor adsorvido em amostras de areia e no deslocamento de 54% do óleo em água do mar. O biotensoativo foi eficaz na remoção de 100% do óleo de motor presente em superfície sólida. Os resultados obtidos nas condições testadas demonstram que o biossurfactante de *C. lipolytica* apresenta propriedades promissoras para aplicação na biorremediação de compostos hidrofóbicos em águas e solos.

Palavras-chave: biossurfactante, *Candida*, resíduos industriais.

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic agents with application in several industries, highlighting the oil industry, food and pharmaceutical. The biosurfactants, surfactants obtained through microbiology, have numerous advantages compared to their similar synthetics as biodegradability and reduced toxicity, although they have not yet commercialized on a large scale because of the high production cost. Thus, a culture medium formulated with 5% animal fat and 2.5% corn steep liquor as substrates was previously selected for production of a biosurfactant by *Candida lipolytica* CPU 0988 for 144h at 200 rpm. The biosurfactant was isolated from different extraction systems and demonstrated the ability to reduce the surface tension of water from 50 to around 30 mN/m at a CMC of 80 mg/L. The biosurfactant showed thermal stability and related to different pHs and tolerance to saline conditions regarding its emulsifying capacity and surface tension reduction ability. The characterization of the biosurfactant revealed its anionic nature and indicated the presence of 70% fat and 30% carbohydrate, suggesting a glycolipidic structure. The crude biosurfactant was effective in the recovery of approximately 70% of engine oil adsorbed on sand samples and displacement of 54% of the oil in sea water. The biotensioactive was effective in removal of 100% of engine oil present in solid surface. The results demonstrate that under the conditions tested the biosurfactant from *C. lipolytica* shows promising properties for application in bioremediation of hydrophobic compounds in soil and water.

Key-words: biosurfactant, *Candida lipolytica*, industrial residues, petroleum contamination.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

As refinarias são grandes geradoras de poluição. Elas consomem enormes quantidades de água e de energia, produzem muitos despejos líquidos, liberam diversos gases nocivos para a atmosfera e produzem resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição. Em decorrência de tais fatos, a indústria de refino de petróleo, pode ser, e é muitas vezes, uma grande degradadora do meio ambiente, pois tem potencial para afetar o mesmo em todos os níveis: ar, água e solo (GONZINI et al., 2010; SEN, 2008).

Um bom exemplo da gravidade do problema de poluição provocada por refinaria de petróleo é a poluição da Baía da Guanabara, atualmente em processo de despoluição. Segundo a FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente), a REDUC (Refinaria Duque de Caxias) despeja diariamente seis toneladas de resíduos de petróleo nas águas da Baía de Guanabara, além de manter cerca de oitenta mil toneladas de resíduos de tanques e unidades de produção estocados em terreno reservado da refinaria, incluindo cerca de oito mil tambores com borras, que podem alcançar o lençol freático da região, assim como a própria Baía da Guanabara (MARIANO, 2006).

A questão da poluição, não apenas aquela provocada pelas refinarias de petróleo, mas a produzida pela indústria de um modo geral, constitui um desafio para a gerência das empresas, que precisa posicionar-se de maneira efetiva e eficaz perante a situação, abandonando, de uma vez por todas, a tendência de minimizar a questão.

Os acidentes ocorridos com derramamentos de petróleo e seus derivados no Brasil, no período de 1975 a 2005, atingiram milhões de litros que contaminaram solos, rios e mares. Diante dessa realidade, a possibilidade de contaminação ambiental é real e iminente, havendo necessidade urgente de desenvolvimento de novas tecnologias que possam conter possíveis contaminações (SILVA et al., 2009).

A contaminação por petróleo e derivados normalmente é tratada através de metodologias físicas, químicas ou biológicas. Entretanto, as novas diretrizes de recuperação de águas e solos têm restringido o uso de produtos químicos (MUTHUSAMY et al., 2008; SINGH et al., 2007). Dentre as técnicas de remediação disponíveis, a biorremediação tem se destacado, embora a solubilidade reduzida dos hidrocarbonetos dificulte o acesso dos micro-organismos e a conseqüente biodegradação do poluente (CALVO et al., 2009).

A biorremediação teve importante papel na limpeza do derramamento de 41 milhões de litros de petróleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989, dando início ao desenvolvimento dessa tecnologia, demonstrando que há boas razões para se acreditar na aplicação efetiva deste método no tratamento de futuros derramamentos de óleo em circunstâncias apropriadas. No citado acidente com o Exxon Valdez, a primeira medida tomada

foi a lavagem física com jatos de água a alta pressão. Subsequentemente, surfactantes foram aplicados nas áreas poluídas para acelerar o crescimento e a atividade dos microrganismos degradadores de petróleo. Duas ou três semanas depois, as regiões tratadas com os surfactantes estavam significativamente mais limpas do que as áreas controle. Contudo, foi difícil avaliar os efeitos de tratamento devido à heterogeneidade da contaminação. De qualquer forma, outros estudos demonstraram a importância do uso de surfactantes para aumentar a biodegradação do petróleo (SAPTURE et al., 2010).

Nesse sentido, a utilização de compostos surfactantes torna-se uma alternativa atrativa na remoção de contaminantes hidrofóbicos gerados pela indústria de petróleo.

Os surfactantes são compostos anfipáticos que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, apresentando várias aplicações industriais. Os surfactantes possuem estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, que exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro ou micro emulsões, ação espumante, solubilidade e detergência, todas ligadas à capacidade de redução da tensão superficial (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

A tensão superficial é um efeito que ocorre na camada superficial de um líquido, que leva sua superfície a se comportar como uma membrana elástica, ou seja, é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. 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 parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (CORTIS; GHEZZEHEI, 2007). A concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (VAN-HAMME et al., 2006). A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (BANAT et al., 2010; BARROS et al., 2007).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a necessidade de preservação ambiental e as legislações de controle do ambiente têm levado pesquisadores à procura por produtos naturais como alternativas aos produtos existentes. Nesse contexto, destacam-se os surfactantes de origem microbiológica, produzidos principalmente por bactérias e leveduras (CORTIS; GHEZZEHEI, 2007).

Os biosurfactantes incluem uma grande variedade de estruturas químicas tais como glicolípídeos, lipopeptídeos, complexos proteínas-polissacarídeos, fosfolípídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros produzidos por microrganismos quando cultivados em substratos insolúveis (óleos, resíduos e hidrocarbonetos) e solúveis (carboidratos) (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Os primeiros estudos na área de biossurfactantes ocorreram na década de 80 e, desde então, as pesquisas permitiram o desenvolvimento e a comercialização de dois produtos, a Surfactina, uma lipoproteína produzida pela bactéria *Bacillus subtilis*, e os Raminolipídeos, grupo de glicolipídeos produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e comercializados pela Jeneil Biosurfactants Company (USA). Esses dois biossurfactantes, embora extremamente eficientes, são comercializados a um alto custo em função dos substratos utilizados para suas produções e do nível de pureza exigido para aplicações nas áreas farmacêutica e médica (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010; BARROS et al., 2007; SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

Segundo a literatura, os custos típicos dos biossurfactantes variam de cerca de 10 U\$/mg para Surfactina pura (98% de pureza) e utilizada em pesquisas médicas, a 24 U\$/kg para fórmulas propostas no início da década de 1980 para limpeza de tanques e/ou recuperação avançada de petróleo. Estimativas realizadas na década passada situaram os custos dos biossurfactantes em 3-20 U\$/kg, enquanto o custo de produção de surfactantes sintéticos como etoxilatos e alquil-poliglicosídeos pelas indústrias químicas estão na faixa de 1-3 U\$/kg (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

Uma das alternativas para reduzir os custos relacionados aos biossurfactantes, consiste na substituição dos substratos comumente utilizados por matérias-primas de baixo custo, como os resíduos industriais (MANEERAT, 2005). Nesse sentido, propõe-se o uso de resíduos de óleos lubrificantes, óleos residuais de fritura, resíduos de amido, de destilaria de óleos, de indústrias lácteas, de melado de cana-de-açúcar e de glicerina, esta última gerada na obtenção de biodiesel, na produção de novos biossurfactantes com potencial de aplicação industrial (RUFINO et al., 2007; 2008; SOUZA-SOBRINHO et al., 2008; COIMBRA et al., 2009; SILVA et al., 2009; GUSMÃO et al., 2010). Vale ressaltar que a disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que 10 % a 30 % da matéria-prima representem o custo total de um produto biotecnológico. Por outro lado, resíduos poluentes são gerados a cada ano por todo o mundo (MULLIGAN, 2009). O tratamento e a remoção destes resíduos também se traduzem em um alto custo para várias indústrias. Com relação aos processos de purificação, que representam cerca de 60% do custo total de produção, estes não serão computados uma vez que os biossurfactantes a serem produzidos poderão ser aplicados no meio ambiente na forma bruta, eliminando essa dispendiosa etapa (SHAH et al., 2007).

Nos últimos anos, os estudos voltados para a produção de biossurfactantes têm se intensificado em função das características desses compostos como biodegradabilidade, baixa toxicidade, especificidade e estabilidade sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade (FELSE et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2006). Nesse contexto, as indústrias de petróleo e petroquímica destacam-se como os maiores campos de aplicação dos biossurfactantes. A limpeza de solos e águas contaminados por derramamentos de petróleo, a remoção da borra oleosa de tanques de estocagem, a remoção de metais pesados de solos contaminados, assim como um

aumento geral nos processos de recuperação de óleo de reservatórios são possíveis aplicações para os biossurfactantes. Os biossurfactantes ainda podem ser utilizados como agente inibitório da corrosão de equipamentos, oleodutos e tanques de caminhões transportadores (MUTHUSAMY et al., 2008).

A aplicação de biossurfactantes no tratamento de resíduos oleosos torna-se um dos pré-requisitos importantes para que ocorram interações entre os resíduos e a célula microbiana, devido à redução da tensão superficial mediada entre o óleo e a fase aquosa.

A remoção de resíduos e frações de óleos pesados requer lavagens com solventes ou mesmo manuais, ambas perigosas, demoradas, e caras já que os resíduos e as frações de óleos pesados que sedimentem no fundo dos tanques são altamente viscosos e podem não ser removidos através de bombeamento convencional. Um processo alternativo a esta limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo bruto, após a quebra da emulsão (NITSCHKE; COSTA, 2007).

Nesse contexto, o Pólo Petroquímico de SUAPE, embora venha permitindo ao Estado de Pernambuco alcançar níveis de desenvolvimento elevados, pode se inserir como um empreendimento de alto risco para o meio ambiente em função da instalação da Refinaria Abreu e Lima, a qual tem despertado a preocupação das indústrias instaladas no seu entorno, que estão sujeitas ao perigo iminente de derramamento ou vazamento de petróleo e/ou derivados.

Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias tecnológicas inovadoras para prevenir problemas indesejáveis causados por possíveis acidentes ambientais provocados pelo derramamento de óleos. Assim, o desenvolvimento de uma tecnologia de aplicação de biossurfactantes na contenção de resíduos de derivados de petróleo apresenta-se como solução para evitar danos à indústrias e ao próprio meio ambiente marinho.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Produzir um biossurfactante com possibilidades de baixo custo com potencial de aplicação na descontaminação ambiental de petróleo e derivados.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência de diferentes combinações de substratos e selecionar nas condições testadas o melhor meio de cultivo para a produção do biossurfactante.
- Avaliar a capacidade tensoativa e emulsificante do biossurfactante frente a diferentes substratos hidrofóbicos e condições ambientais específicas.
- Testar diferentes metodologias de isolamento de acordo com o maior rendimento.
- Avaliar a eficiência do biossurfactante através da determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).
- Caracterizar bioquimicamente o biossurfactante produzido através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada.
- Determinar a carga iônica do biossurfactante.
- Aplicar o biossurfactante na remoção de composto hidrofóbico adsorvido em areia.
- Realizar testes de aplicação do biossurfactante na dispersão de manchas de derivados de petróleo em água do mar.
- Avaliar a capacidade de remoção de derivados de petróleo aderidos a superfícies sólidas.
- Estabelecer as possíveis condições de aplicação do biossurfactante na remoção dos poluentes hidrofóbicos, considerando os parâmetros avaliados.

3. Revisão da Literatura

3.1 Surfactantes

Os surfactantes são compostos anfipáticos, contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (SINGH et al., 2007; MUKHERJEE et al., 2006; BANAT et al., 2010), como ilustrado na Figura 1.

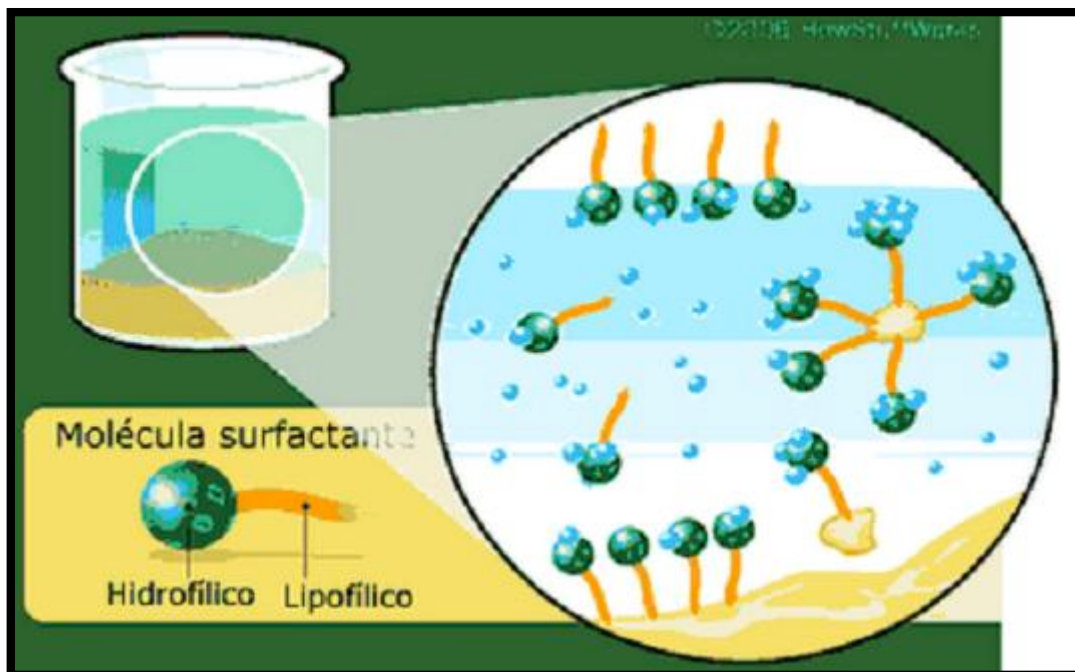


Figura 1 - Molécula surfactante com porção apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica)

Fonte: <http://pensandoprafrente.blogspot.com/2010/08/surfactante-desenvolvido-em-projeto.html>

Essas características permitem aos surfactantes reduzir a tensão superficial e interfacial e com isso formar microemulsões onde os hidrocarbonetos possam se solubilizar em água ou onde a água possa se solubilizar em hidrocarbonetos (RON; ROSENBERG, 2002). Tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (AL-ARAJI et al., 2007).

A propriedade de maior importância para os agentes tensoativos é a tensão superficial, que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. 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 parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (Figura 2). A concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Figura 3). Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas, como mostra na Figura 4 (CORTIS; GHEZZEHEI, 2007; VAN-HAMME et al., 2006).

A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (BARROS et al., 2007).

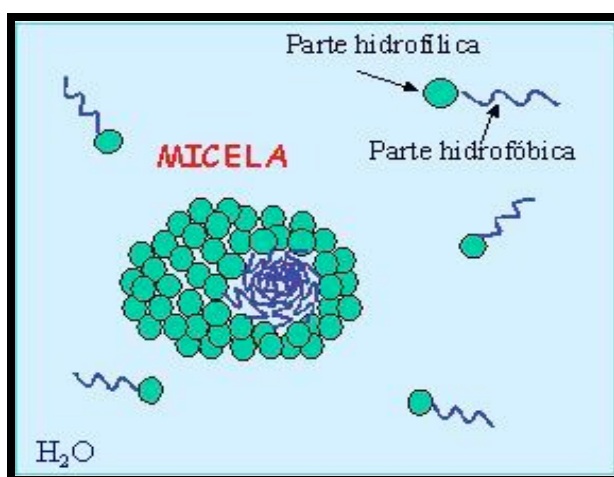


Figura 2 - Formação da Micela

Fonte: <http://www.quimicadostensoativos.blogspot.com>

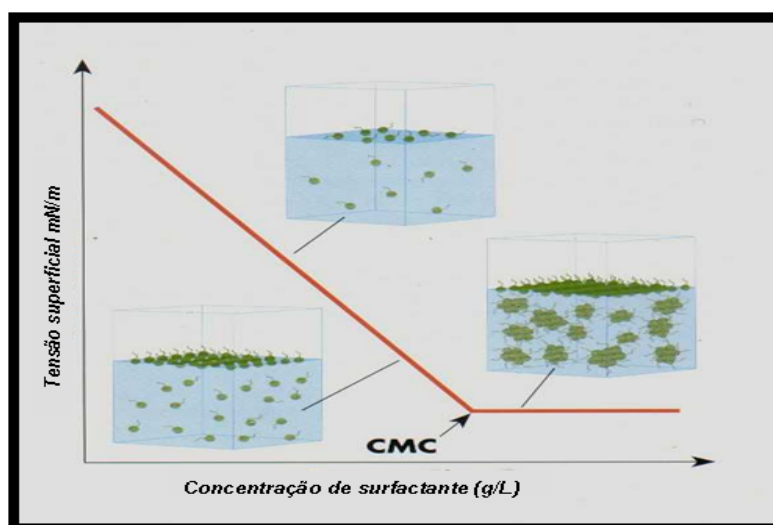


Figura 3 - Gráfico ilustrativo das regiões onde ocorre a formação de micelas (CMC)

Fonte: <http://www.virtuallaboratory.net>

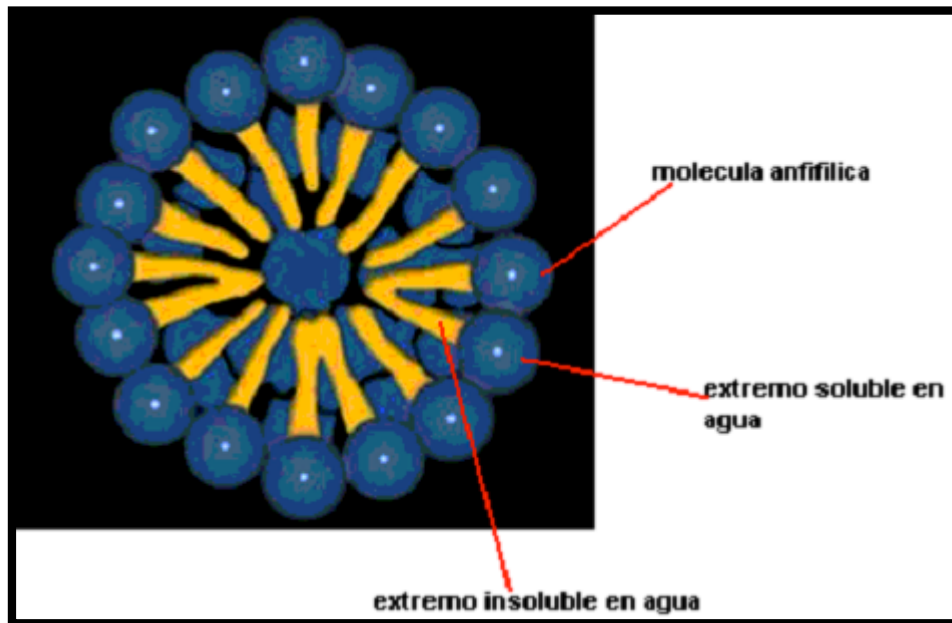


Figura 4 - Micela formada

Fonte: http://www.galileog.com/ciencia/biologia/celulas/celulas_procariotas.htm

3.2 Biossurfactantes

Os estudos relacionados aos biossurfactantes iniciaram-se em 1960 e a utilização desses compostos se estendeu nas últimas décadas, surgindo como alternativa aos surfactantes sintéticos, especialmente em indústrias farmacêuticas, alimentícias e refinarias. A razão desta notoriedade está relacionada à baixa toxicidade, biodegradabilidade, capacidade de ação em ambientes extremos, como pH, temperatura e salinidade, além de estruturas químicas únicas (MUTHUSAMY et al., 2008; CERQUEIRA et al., 2011; MAKKAR et al., 2011), habilidade de produção a partir de fontes renováveis/resíduos industriais e de subprodutos (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Esta última característica torna uma produção de biossurfactante com possibilidades de baixo custo, uma vez que permite a utilização de substratos, de modo que a aplicação do mesmo na remediação ambiental é considerado um dos maiores mercados para os surfactantes naturais (DAS; MUKHERJEE, 2007; NITSCHKE et al., 2011; REIS et al., 2011; DUBEY et al., 2012).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a preocupação ambiental entre os consumidores, combinada a novas legislações de controle do meio ambiente têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002; CERQUEIRA et al., 2011; DUBEY et al., 2012).

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até micro-organismos (glicolípídeos) e também no organismo humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais (MANEERAT, 2005).

Nessa área, as pesquisas biotecnológicas permitiram ampliar os limites de aplicação dos aditivos sintéticos, desenvolvendo novos produtos baseados na capacidade sintética dos microrganismos. Estas perspectivas, relacionadas a produtos de elevado interesse industrial, têm conduzido a investigação e o desenvolvimento de modelos que constituem as bases das novas tecnologias na produção de agentes surfactantes por microrganismos (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SINGH et al., 2007; BANAT et al., 2010).

A maioria dos biossurfactantes conhecidos é produzida em substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, embora muitos tenham sido obtidos a partir de substratos solúveis, ou pela combinação destes (VAN-HAMME et al., 2006).

A possibilidade de produção dos biossurfactantes a partir de substratos renováveis e por diferentes espécies microbianas, além da possibilidade de variação de inúmeros parâmetros de cultivo como tempo de cultivo, velocidade de agitação, pH do meio e nutrientes adicionados, permite a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência, embora os custos de produção ainda não permitam uma maior competitividade com seus similares petroquímicos (CANET et al., 2002).

Dados sobre a CMC são escassos e, mais uma vez, difíceis de interpretar ou correlacionar. A comparação entre os valores de CMC de biossurfactantes e de seus equivalentes químicos está apresentada na Tabela 1 e mostra CMCs muito mais baixas no caso dos biossurfactantes. Em princípio, quanto menor a CMC, mais eficaz o surfactante e mais favorável, do ponto de vista econômico, a sua utilização em processos industriais (BOGNOLO, 1999).

Tabela 1 - Exemplos de Concentração Micelar Crítica de biossurfactantes e surfactantes químicos

Agente surfactante	CMC (mg/L)
Fosfatidil etanolaminas	30
Ácidos fosfatídicos	70
Raminolípídeo	20
Surfactina	11
Alquil benzeno sulfonato	590
Lauril sulfato de sódio	2 000 – 2 900

Fonte: BOGNOLO (1999).

3.3 Classificação

Os surfactantes sintéticos são classificados de acordo com a carga iônica que reside na parte polar da molécula. Em função da presença ou ausência de cargas elétricas, podem ser aniônicos, catiônicos, não-iônicos ou anfotéricos (MANEERAT, 2005; RON; ROSENBERG, 2001).

A maioria dos biossurfactantes é aniônica ou neutra. Apenas alguns são catiônicos, como os que contêm grupamentos amina. A parte hidrofóbica é caracterizada por ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que a porção hidrofílica pode ser carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, fosfato, um ácido carboxílico ou um álcool (BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes são comumente classificados de acordo com a natureza bioquímica ou com a espécie microbiana produtora. Quanto à estrutura, podem ser classificados em cinco grandes grupos (RAHMAN; GAKPE, 2008):

- Glicolipídeos, cujo grau de polaridade depende dos hidrocarbonetos utilizados como substratos. São exemplos os raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, e os soforolipídeos produzidos por espécies de *Candida*.
- Lipossacarídeos, os quais normalmente possuem massa molar elevada e são solúveis em água, como o conhecido Emulsan, emulsificante extracelular produzido por hidrocarbonetos a partir da bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*.
- Lipopeptídeos, como a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*, um dos biossurfactantes mais poderosos já relatados na literatura.
- Fosfolipídeos, estruturas comuns a muitos microrganismos, como o biossurfactante de *Corynebacterium lepus*.
- Ácidos graxos e lipídeos neutros (alguns classificados como glicolipídeos) e proteínas hidrofóbicas.

3.4 Micro-organismos produtores

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

Alguns micro-organismos podem produzir biossurfactantes quando crescem em diferentes substratos, variando desde carboidratos até hidrocarbonetos. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se deseja propriedades específicas para uma aplicação direcionada (COOPER, 1986). Diversos são os

estudos realizados por vários autores (GUSMÃO et al., 2010; SILVA et al., 2010; SOUZA-SOBRINHO et al., 2008; LUNA et al., 2009; LUNA et al., 2008; AMARAL et al., 2006; SARUBBO et al., 2006; KIM et al., 2006) na produção de biossurfactantes, envolvendo propriedades físico-químicas.

Uma grande variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e uma minoria de fungos filamentosos são capazes de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares (DELEU, PAQUOT, 2004).

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são descritas na literatura como grandes produtoras de biossurfactantes (SILVA et al., 2010; GUERRA SANTOS et al., 1986).

Os raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (GUERRA-SANTOS et al., 1984) têm sido extensivamente estudados (ROBERT et al., 1989). A composição e os rendimentos dependem do tipo do fermentador, do pH, da composição dos nutrientes, dos substratos e das temperaturas utilizadas (MULLLIGAN, 2005).

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

Entre as leveduras, espécies de *Candida* têm sido largamente empregadas com sucesso na fermentação de hidrocarbonetos e, conseqüentemente, para produção de biossurfactantes (FONTES; BALA, 2008). Em 1979, Pareilleux observou a presença de um polímero em *C. lipolytica* com propriedades emulsificantes, quando esta foi cultivada em n-tetradecano ou na mistura de hidrocarbonetos lineares. Os polímeros recuperados do líquido metabólico demonstraram ser moléculas complexas, constituídas por uma fração lipídica, uma protéica e outra carboidratos, sendo esta última, em maior quantidade. Cirigliano e Carman (1985) isolaram, inicialmente, um bioemulsificante produzido por *C. lipolytica* cultivada em meio contendo n-hexadecano, demonstrando perspectivas e potencial para uso em sistemas alimentares, enquanto que Marçal (1991) demonstrou a produção de biopolímeros por *C. lipolytica* com alta atividade de emulsificação utilizando substratos regionais. Sarubbo et al. (1999; 2001) também utilizaram a *C. lipolytica* na produção de agentes surfactantes em meios contendo óleo vegetal de babaçu e glicose como substratos. Sarubbo et al. (2006; 2007) demonstraram a possibilidade de combinação entre duas fontes, uma solúvel e outra insolúvel, para a produção de biossurfactantes por espécies de *Candida* enquanto que Rufino et al. (2007; 2008), Coimbra et al. (2009) e Souza-Sobrinho et al. (2008) aplicaram com sucesso um resíduo industrial de óleo de soja na produção de um biossurfactante por *Candida lipolytica*.

3.5 Propriedades

As propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes, como redução da tensão superficial, capacidade espumante, capacidade emulsificante e estabilizante, concentrações micelares críticas baixas, solubilidade e poder detergente são muito importantes na avaliação de seu desempenho e na seleção de micro-organismos com potencial de produção destes agentes (DELEU; PAQUOT, 2004).

Apesar da diversidade de composição química e de propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas dessas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (NITSCHKE et al., 2007):

- Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial a menores concentrações. A CMC dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente.
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: muitos biossurfactantes podem ser utilizados sob condições extremas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2, por exemplo, é estável a temperaturas em torno de 75 °C, por até 140 horas e variações de pH entre 5 e 12. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de sal, enquanto que 2 % de NaCl são suficientes para inativar surfactantes convencionais.
- Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados por bactérias e outros micro-organismos na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos.
- Baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disso, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, em cosméticos e em produtos farmacêuticos.
- Disponibilidade: biossurfactantes podem ser produzidos a partir de matérias-primas largamente disponíveis, além da possibilidade de serem produzidos a partir de resíduos industriais.
- Especificidade: biossurfactantes, sendo moléculas orgânicas complexas com grupos funcionais específicos também serão específicos em suas ações. Essa propriedade pode ser de grande interesse da detoxificação de poluentes específicos ou em determinadas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética ou alimentícia.

- Biocompatibilidade e digestibilidade, o que garante a aplicação dessas biomoléculas nos mais diversos setores industriais, destacando as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.

A despeito das vantagens, alguns pontos desfavoráveis devem ser citados, como (RAHMAN; GAKPE, 2008):

- A produção em grande escala de biossurfactantes pode ser dispendiosa. Esse problema, entretanto, pode ser resolvido pela combinação de substratos de baixo custo.
- A obtenção de produtos com elevado grau de pureza, que se torna difícil em virtude da necessidade de etapas consecutivas de purificação do líquido metabólico.
- A existência de espécies super produtoras é rara e as conhecidas não são capazes de produzir altos rendimentos de surfactantes, além de necessitarem de meios de cultivo complexos.
- A regulação da síntese de biossurfactantes não está totalmente compreendida, uma vez que essas biomoléculas podem ser produzidas como metabólitos secundários ou em associação ao crescimento microbiano.
- O aumento da produtividade é muitas vezes prejudicado pela formação de espuma, o que requer a utilização de meios diluídos.

3.6 Aplicações do biossurfactante

A produção mundial de surfactantes somou 17 milhões de toneladas em 2000, esperando-se um aumento de ordem de 3-4% ao ano. As aplicações industriais são classificadas de acordo com seus usos: 54% como detergentes, 13% nas indústrias têxteis, de couro e de papel, 10% em processos químicos, outros 10% nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, 3% na indústria de alimentos, 2% na agricultura e os 2% restantes em outras aplicações (MUTHUSAMY et al., 2008).

Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicações em vários processos industriais, além da possibilidade de novas aplicações para estas biomoléculas. Acredita-se que os biossurfactantes ficarão conhecidos como os “materiais multifuncionais” do novo século (MUTHUSAMY et al., 2008).

Atualmente, os biossurfactantes têm sido utilizados principalmente nas indústrias de óleos, incluindo a limpeza de derramamento de óleos, a remoção de óleos de tanques de estocagem, a recuperação avançada de petróleo e a biorremediação de solos (GAUTAM; TYAGI, 2006; SINGH et al., 2007).

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem as indústrias de papel, têxtil e cerâmica (DELEU; PAQUOT, 2004).

3.6.1 Biorremediação

Biorremediação é a habilidade de organismos vivos em transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos gerando substâncias menos nocivas, que possam ser integradas ao ciclo biogeoquímico natural. Contudo, a biodegradabilidade desses contaminantes é influenciada por fatores como tensão de oxigênio, pH, presença de macro e micro nutrientes, características físico-químicas do agente e das partículas de solo ou outros aos quais os organismos e contaminantes possam estar adsorvidos (MARGESIN; SCHINNER, 2002).

As substâncias contaminantes apresentam diferentes grupos funcionais tais como OH, Cl, NH₂, NO₂ e SO₃. Esses, por sua vez, comportam-se como doadores de elétrons sendo oxidados, ou em alguns casos mineralizados, por diferentes espécies microbianas. Alguns dos metabólitos intermediários produzidos nessas reações são assimilados como fonte de carbono para o crescimento microbiano (MARGESIN; SCHINNER, 2002).

A biorremediação utilizando micro-organismos ou processos microbianos em ambientes contaminados tem inúmeras aplicações incluindo a limpeza de águas subterrâneas, solos, lagos e processos de tratamento de esgotos. Essa é uma tecnologia bem aceita pela opinião pública na recuperação de ambientes poluídos não afetando o equilíbrio ecológico, já que as bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras são agentes transformadores eficazes, face as suas habilidades em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas (CALVO et al., 2009; DESAI; BANAT, 1997).

Como os biossurfactantes aumentam a interação água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por micro-organismos e promovem a biorremediação de águas e solos contaminados (MULLIGAN, 2005). A capacidade dos surfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta a degradação desses compostos no ambiente. Os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo e na remoção de piche após a introdução de *Pseudomonas*, *Arhtrobacter*, e *Bacillus subtilis*, demonstrando resultados promissores (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Pesquisas com consórcios microbianos e raminolipídeos demonstraram o potencial de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo (RAHMAN et al., 2006). A aplicação do raminolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 aumentou a biorremediação de gasolina adsorvida em solo (RAHMAN et al., 2002).

Alguns estudos demonstraram o aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAS), pelo uso de biossurfactantes (MULLIGAN, 2005; SINGH et al., 2007).

A utilização de biossurfactantes na biodegradação de pesticidas vem sendo objeto de investigação. A degradação de hexaclorociclohexano por surfactantes produzidos por

Pseudomonas foi primeiramente relatada, bem como a dos organoclorados como DDT e ciclodienos (KARANTH et al., 1999).

3.6.2 Limpeza de reservatórios de óleos

A aplicação de biossurfactantes no tratamento de resíduos oleosos torna-se um dos pré-requisitos importantes para que ocorram interações entre os resíduos e a célula microbiana, devido à redução da tensão superficial existente entre o óleo e a fase aquosa (HUE et al., 2003; CALVO et al., 2009).

A utilização de biossurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promoveu a limpeza e recuperação de 90 % dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (MULLIGAN; WANG, 2004). A remoção de resíduos e frações de óleos pesados requer lavagens com solventes ou mesmo manuais, ambas perigosas, demoradas, e caras já que os resíduos e as frações de óleos pesados que sedimentam no fundo dos tanques são altamente viscosos e podem não ser removidos através de bombeamento convencional. Um processo alternativo a esta limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru, após quebra da emulsão (SINGH et al., 2007; MULLIGAN; WANG, 2004).

3.6.3 Recuperação avançada de petróleo – MEOR

Segundo Desai e Banat (1997), a recuperação de óleos utilizando biossurfactantes constitui atualmente uma importante estratégia para a indústria do petróleo, uma vez que micro-organismos e produtos de seu metabolismo são utilizados para aumentar a recuperação do petróleo. Este processo conhecido como “MEOR” (Microbial Oil Recovery Enhancement), recuperação avançada de óleo, apresenta vantagens importantes em relação aos métodos convencionais. Os surfactantes alteram algumas características físico-químicas do petróleo, facilitando ou aumentando sua remoção nos poços (SINGH et al., 2007).

3.6.4 Dispersão de manchas de petróleo

O derramamento de óleos ocorridos durante o seu transporte ou na construção de oleodutos afeta drasticamente as regiões costeiras e praias, sendo hoje uma das maiores causas de catástrofes ecológicas e sociais no mundo (MUTHUSAMY et al., 2008).

Uma das técnicas de remediação de derramamentos de óleo é a aplicação de dispersantes de manchas de óleo. Os dispersantes utilizados para este fim são compostos de misturas

complexas de surfactantes, solventes e aditivos que aumentam a taxa de dispersão natural do óleo e sua retirada da superfície contaminada. A aplicação de dispersantes minimiza o impacto do derramamento de óleo sobre aves e mamíferos marinhos, pois remove o óleo da superfície da água. Além disso, o uso de dispersantes minimiza o impacto de derramamento de óleo sobre os recursos sensíveis na orla costeira, reduzindo a quantidade de óleo derramado. O aumento da área superficial do petróleo como resultado da sua dispersão em pequenas gotículas facilita também sua biodegradação através da atividade de micro-organismos de ocorrência natural (SAEKI et al., 2009).

Os biossurfactantes exercem influência sobre os processos de remediação através de sua eficácia como agentes dispersantes. A literatura descreve o uso de biossurfactantes no aumento da dispersão e biodegradação de hidrocarbonetos (SAEKI et al., 2009). No entanto, poucos estudos têm investigado na prática a aplicação de biossurfactantes como dispersantes de derramamento de óleo.

3.6.5 Indústria de alimentos

Na indústria alimentícia, a emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas (RAHMAN; GAKPE, 2008). De forma geral, a função dos emulsificantes em alimentos é promover a estabilidade da emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Uma emulsão é um sistema heterogêneo, consistindo de pelo menos um líquido imiscível (fase interna descontínua) disperso em outro (fase externa contínua) em forma de pequenas gotas (COOPER; GOLDENBERG, 1987). Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, a qual pode ser aumentada por aditivos surfactantes, que atuam reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia na superfície entre duas fases e prevenindo a coalescência das partículas através da formação de barreiras estéricas e eletrostáticas (VELIKONJA; KOSARIC, 1993). Exemplos de alimentos processados, que são emulsões, são creme de leite, manteiga, maionese, molhos para salada, recheios entre outros (VELIKONJA; KOSARIC, 1993). Outras aplicações para os emulsificantes são descritas, entre elas melhorar a textura e vida de prateleira de produtos contendo amido, pela formação de complexos com os componentes destes, modificar as propriedades reológicas da farinha de trigo, pela interação com o glúten, melhorar a consistência e textura de produtos à base de gorduras, pelo controle de polimorfismo e da estrutura cristalina das gorduras (BANAT et al., 2000; SARUBBO et al., 1997).

Os biossurfactantes ainda podem ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, no controle de aglomeração de glóbulos de gordura, na estabilização de sistemas aerados e para melhorar a consistência de produtos gordurosos. O uso de

raminolídeos para melhorar as propriedades emulsificantes da manteiga, de croissants e de produtos de confeitaria congelados também foi reportado (MUTHUSAMY et al., 2008). O bioemulsificante produzido por *Candida utilis* em sido utilizado em molhos prontos para saladas.

A manoproteína produzida por *Saccharomyces cerevisiae* pode estabilizar emulsões água/óleo para produção de maionese, biscoitos, sorvetes, entre outros. É produzida através de um processo biotecnológico simples, de larga escala e baixo custo. Além de ser estável em uma larga faixa de pH, seu subproduto pode ser utilizado como ração animal (TORABIZADEH et al., 1996; BANAT et al., 2000).

Apesar da aplicação potencial, a indústria de alimentos não utiliza ainda os biossurfactantes como aditivos em larga escala. Muitas propriedades dos biossurfactantes, assim como sua regulamentação para aprovação como novo ingrediente para alimentos necessitam de aprovação.

3.6.6 Indústria farmacêutica

Os biossurfactantes são amplamente utilizados em vários produtos, como em cosméticos e em indústrias de medicamentos. Estima-se que num futuro próximo a maioria dos cosméticos seja "biocosméticos". Vários produtos necessitam de surfactantes em seus ingredientes, incluindo repelentes de insetos, antiácidos, soluções para lentes de contato, desodorantes, produtos para unhas, pasta de dentes, etc. (MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000).

Devido a sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Com essa finalidade, glicolídeos obtidos de *Torulopsis bombicola* KSM 35 são usados no Japão, como agentes de limpeza facial (DELEU; PAQUOT, 2004). Soforolídeos sofrem esterificação, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (NITSCHKE; PASTORE, 2002). A literatura também descreve a ação de soforolídeos na estimulação da síntese de colágeno, podendo ser usados como medida preventiva do envelhecimento da pele e nas formulações para a pele (MUTHUSAMY et al., 2008).

3.6.7 Mineração

Compostos tensoativos produzidos por *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp. foram utilizados para flotação e separação de calcita. A recuperação foi de 95 % para CWO_4 e 30 % para CaCO_3 , ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais (NITSCHKE; PASTORE, 2002). O biodispersan, polissacarídeo aniônico produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* A2 foi utilizado na prevenção da floculação e dispersão de misturas de pedra calcária e água (RON; ROSENBERG, 2002).

3.6.8 Agricultura

Na agricultura, os biossurfactantes são utilizados na hidrofilição de solos argilosos para o obtenção de boa umidade e distribuição uniforme de fertilizantes (NITSCHKE; COSTA, 2007). A formulação de herbicidas e pesticidas contendo bioemulsificantes também tem sido reportada (ROSENBERG; RON, 1999). Os compostos ativos dessas formulações são, geralmente, hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosa. Stanguellini e Miller (1997) demonstraram a eficiência de raminolípídeos contra patógenos de plantas.

3.6.9 Medicina

Os biossurfactantes também têm sido utilizados em várias aplicações biológicas (terapêuticas) como atividade fungicida, bactericida, inseticida e antiviral, agentes anti-adesivos e inibidores de enzimas (MEYLHEUC et al., 2001; MUTHUSAMY et al., 2008; RODRIGUES et al., 2006).

Vários raminolípídeos podem exibir atividades antibacteriana e antifitoviral. Abalos et al. (2001), por exemplo, identificaram seis raminolípídeos em culturas de *P. aeruginosa* AT10 produzidos a partir de resíduo de refinaria de óleo de soja e avaliaram as propriedades antimicrobianas da mistura. Esses raminolípídeos exibiram excelente propriedades antifúngicas contra vários fungos em concentrações variando de 16µg/mL a 32 µg/mL (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004).

A chamada atividade anti-aderente, ou seja, a capacidade de inibir a adesão de micro-organismos patogênicos em superfícies sólidas ou em sítios infecciosos também tem sido reportada para biossurfactantes, levando à diminuição de infecções hospitalares sem a necessidade de fármacos ou agentes químicos sintéticos (RODRIGUES et al., 2006; MUTHUSAMY et al., 2008). Meylheuc et al. (2001) estudaram um biossurfactante obtido de *P. fluorescens* dotado de propriedades inibidoras da adesão de *Listeria monocytogenes* LO28 as superfícies do politetrafluoroetileno e do aço inoxidável.

A deficiência do surfactante pulmonar, um complexo proteína-fosfolípídeo é responsável pela falência de respiração em bebês prematuros. O isolamento dos genes para as moléculas protéicas desse surfactante e a clonagem em bactérias permitiu sua produção fermentativa para aplicações médicas (MUTHUSAMY et al., 2008).

Soforolípídeos de *Candida bombicola* têm sido estudados por sua atividade espermicida, citotóxica e anti-HIV para reduzir a proliferação do vírus da síndrome da imunodeficiência

adquirida (AIDS). Soforolípídeos também têm sido estudados como agentes antiinflamatórios para doenças imunológicas (RODRIGUES et al., 2006; MUTHUSAMY et al., 2008).

A iturina, lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (MUTHUSAMY et al., 2008). Experimentos *in vitro* mostraram que a surfactina inativou eficazmente o vírus causador de herpes, assim como o retrovírus e outros vírus de RNA e DNA compactados. A atividade antiviral da surfactina foi determinada para uma larga gama de vírus. Além disso, há os efeitos na surfactina da absorção de insulina em pulmão de ratos foram examinados (MUTHUSAMY et al., 2008).

3.7 Utilização de resíduos industriais na produção de biossurfactantes

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

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

Uma variedade de subprodutos, incluindo derivados de óleo vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas têm sido utilizados na produção de muitos metabólicos microbianos. A disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que 10% a 30% da matéria-prima representa o custo total de um produto biotecnológico (MUKHERJEE et al., 2006). Por outro lado, milhões de desperdícios em resíduos poluentes são jogados a cada ano por todo o mundo. O tratamento e a remoção destes resíduos também representam um alto custo para várias indústrias (PANDEY et al., 2000).

Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes; com isso, Gusmão et al. (2010) demonstraram a produção de biossurfactantes utilizando meios de baixo custo.

Muitos biossurfactantes têm sido produzidos de substratos agroindustriais, renováveis e de baixo custo. Óleos vegetais, resíduos de fritura de óleos vegetais, resíduos de destilaria de óleos,

resíduos da indústria de laticínios (soro de leite), melação de cana e glicerina têm sido citados na literatura (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Os resíduos industriais com elevado valor de carboidratos ou lipídeos encontrados são muito atrativos como substratos para produção de biossurfactantes (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999; MERCADE et al., 1994).

Recentemente, Barros et al. (2007) descreveram a importância da variedade de resíduos industriais como matéria-prima para diversos bioprocessos. Segundo os autores, a utilização de resíduos agroindustriais para produção de biossurfactantes é um dos passos para viabilização e implantação desses processos em escala industrial, sendo necessário um balanço de nutrientes para proporcionar condições adequadas no desenvolvimento e produção dessas biomoléculas. Os efluentes do processamento de batata foram evidenciados como substitutos atrativos dos substratos convencionais, uma vez que são fontes de carboidratos na forma de amido e açúcar, de nitrogênio e de carbono, considerando que a composição do meio interfere na redução da tensão superficial.

Nitschke & Pastore (2006) utilizaram com sucesso resíduos industriais de fritura de batata na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*.

Anteriormente, Nitschke et al. (2004) selecionaram micro-organismos para a produção de biopolímeros utilizando resíduos agroindustriais. Utilizaram melação, soro de leite e manipueira obtendo valores de tensão superficial em torno de 26 mN/m. Volbrecht et al. (1999) investigaram a produção de biossurfactantes usando óleo vegetal doméstico como substrato da bactéria *Tsukamurella spec* DSM 44370, conseguindo reduzir a tensão da água de 70 mN/m para 35 mN/m com CMC de 10 mg/L. Haba et al. (2000) compararam o uso de óleo de oliva e girassol para a produção de biopolímeros usando valores de tensão superficial até 40 mN/m como critério de seleção de micro-organismos potencialmente produtores. Recentemente, Rufino (2006) utilizou um resíduo de refinaria na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* obtendo resultados satisfatórios em termos de tensão superficial.

Mukherjee et al. (2006) descreveram o uso de substratos de baixo custo como alternativa econômica e promissora para a produção de biossurfactantes.

Derivados de óleo vegetal, substâncias a base de amido, soro de leite, óleo de babaçu e girassol, melação e efluente de arroz foram utilizados com eficiência na produção de raminolipídeos e soforolipídeos por vários micro-organismos (MUKHERJEE et al., 2006).

Diferentes elementos encontrados nos efluentes dos processos industriais também são fontes de nutrientes. Nitrogênio e ferro foram utilizados para aumentar o rendimento de biossurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* BS-2 e *Ustilago maydis* (DUBEY; JUWARKAR, 2004).

Amezcu-Veja et al. (2006) descreveram a importância da relação entre diferentes elementos como C e N, C e P, C e Fe ou C e Mg na produção de biopolímeros e na otimização de seus processos de obtenção.

Recentemente, a borra oleosa do fundo de tanques da Petrobrás, contendo querosene, óleo diesel e petróleo, foi utilizado como matéria-prima de baixo custo para a produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* isolada de solo contaminado (PIRÔLLO, 2006).

A Tabela 2 mostra um resumo de algumas matérias-primas de baixo custo e os respectivos micro-organismos utilizados na produção de biossurfactantes.

Tabela 2 - Matérias-primas de baixo custo e respectivos micro-organismos utilizados na produção de biossurfactantes

Matéria-prima de baixo custo ou resíduos	Tipo de biossurfactante	Espécie microbiana produtora	Rendimento máximo (g/L)
Óleo de babaçu	Glicolipídeo	<i>Candida lipolytica</i> IA	---
Óleo de milho	Glicolipídeo	1055 <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	4,00
Óleo de girassol e óleo de soja	Raminolipídeo Lipídeo manosileritritol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129 <i>Candida</i> sp. SY16	4,31 / 2,98 95
Óleo residual de fritura (óleos de oliva e girassol)	Raminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB 40044	2,7
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Raminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	11,72
Resíduo de refinaria de óleo de girassol	Raminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	16
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Glicolipídeo	<i>Candida antactica</i> e/ou <i>Candida apicola</i>	10,5 / 13,4
Solo e resíduo de refinaria de óleo vegetal	Raminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	0,92
Efluentes do processamento de batatas	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	---
Manipueira	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	2,2 – 3,0

ATCC 21332 e

Bacillus subtilis LB5a

Fonte: MUKHERJEE et al. (2006).

3.7.1 Substratos utilizados na produção de biossurfactantes

3.7.1.1 Efluente de óleo de oliva verde (OOME)

A extração do óleo de oliva envolve um consumo intenso de água produzindo grandes quantidades de efluente proveniente do moinho do óleo de oliva, causando efeitos nocivos ao ambiente. O Efluente do Óleo de Oliva Verde (OOME) é um licor preto com um elevado índice de matéria orgânica (20-60 kg COD/m³), dependendo do procedimento da extração do óleo oliva verde (MARQUES, 2001). O OOME contém substâncias tóxicas, tais como polifenol, mas também possui valiosas substâncias orgânicas como açúcares, combinação de nitrogênio com ácidos orgânicos e óleos residuais (MERCADÉ et al., 1993; HAMMAN et al., 1999; MARQUES, 2001).

3.7.1.2 Gordura animal

A gordura animal e o sebo podem ser obtidos em grandes quantidades nas indústrias de processamento de carne e têm sido usados como meio para cozinhar alimentos. Recentemente, entretanto, estas gorduras têm perdido a maior parte do mercado para os óleos vegetais devido ao menor dano provocado por estes últimos à saúde (MANEERAT, 2005).

Deshpande e Daniels (1995) usaram gordura animal para a produção de biossurfactantes compostos por soforolipídeos de *Candida bombicola*. A utilização de gordura como fonte de carbono, entretanto, promoveu pouco crescimento, embora a adição de glicose tenha permitido um nível mais elevado de crescimento da biomassa.

3.7.1.3 Óleos de fritura

Os resíduos de óleos e gorduras comestíveis são considerados ótimas fonte de carbono, tornando o seu descarte um desperdício de fonte energética contribuindo ainda para a poluição ambiental. É importante destacar que os micro-organismos são capazes de crescer nos óleos vegetais ou em gordura, produzindo novos produtos com potencial de aplicação industrial, tal como a lipase e o biodiesel (HABA et al., 2000a; ALCANTARA, et al., 2000; MANEERAT, 2005).

Haba et al. (2000b) cozinham o óleo de girassol e também o de oliva para utilizá-los como fonte de carbono na produção de biossurfactantes por 36 isolados bacterianos. Estirpes de

Pseudomonas testadas mostrou crescimento satisfatório quando cultivadas em óleos de oliva e de girassol já utilizados. Entretanto, o óleo de girassol não foi tão bom para o crescimento celular ou para a produção de biossurfactante quanto o óleo de oliva.

3.7.1.4 Borra de sabão

A borra de sabão é uma goma colorida resultante do produto gerado pelo processamento da semente. É produzido quando o hexano e outros produtos químicos são usados para extrair e refinar o óleo comestível das sementes (MANEERAT, 2005).

Shabtai (1990) relatou a produção de dois heteropolisacarídeos extracelulares, emulsan e biodispersan, por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 e *A. calcoaceticus* A2, respectivamente, usando borra de sabão como uma fonte do carbono.

Pseudomonas aeruginosa LBI, isolada de solo contaminado por petróleo, foi cultivada em meio composto por sais minerais e borra de sabão como fonte de carbono, produzindo grandes quantidades de biossurfactantes (BENINCASA et al., 2002).

3.7.1.5 Melaço

O melaço é um co-produto gerado na produção de açúcar, originado de fontes como a cana-de-açúcar e a beterraba. O melaço é constituído geralmente por 48-56% de açúcar total, principalmente sacarose; 9-12% de matéria orgânica; 2,4% de proteína (Nx 6,25); 15% a 5% de potássio; 0,4% a 0,8% de cálcio; 0,06% de magnésio; 0,6% a 2,0% fósforo; 1,0-3,0 mg/kg de biotina; 15% a 55% mg/kg de ácido pantotênico; 2500-6000 mg/kg de inositol e 1,8 mg/kg de tiamina (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

O melaço foi usado como o principal material bruto para a produção da goma pullulana (LAZARIDOU et al., 2002), de goma xantana (KALOGIANNIS et al., 2003), fermento de padaria (SHOUNTZOU et al., 2003), ácido cítrico (IKRAN-UL et al., 2004) e como fonte de fruto-oligosacarídeos (SHIN et al., 2004).

Ghurye & Vipulanandan (1994) usaram o lodo ativado, do tratamento de efluente como fonte dos micro-organismos para a produção biossurfactante. Foi utilizado como fonte de carbono uma concentração de melaço igual a 20 g/L. A produção de biossurfactantes mostrou estar associada com o crescimento, o que foi observado através da determinação da diluição micelar crítica (CMD), da capacidade do aumento da emulsificação e do crescimento da biomassa.

3.7.1.6 Efluente de amido

O processamento de materiais brutos agroindustriais, tais como a mandioca ou a batata, produz uma grande quantidade de resíduo, cujo acúmulo conduz à poluição ambiental. Devido às elevadas quantidades de amido ou de açúcares, é importante reduzir o desperdício desse material, uma vez que eles foram reconhecidos como fontes apropriadas de energia para fermentações industriais, tais como a produção de gomas (BARNETT et al., 1999; CHRISTEN et al., 2000).

Os substratos da batata foram avaliados como possuidores de energia, ou seja, servem como fonte do carbono para a produção do surfactantes por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. As tensões superficiais foram reduzidas de 71,3 mN/m a 28,3 mN/m e de 27,5 mN/m quando os meios de batata e o meio mineral constituído de sal, foram utilizados, respectivamente. Após extração com solvente orgânico obteve-se uma concentração micelar crítica de 0,10 g/L (FOX; BALA, 2000). Além disso, efluentes do processamento da batata com elevado teor de sólidos dissolvidos (HS) e com baixo teor de sólidos dissolvidos (LS) foram usados como substratos para a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 (THOMPSON et al., 2000).

3.7.1.7 Milhocina

A agroindustrialização de produtos à base de milho através de processamento úmido resulta em subprodutos sólidos e líquidos, que dispostos de forma inadequada tornam-se fontes de contaminação e agressão ao meio ambiente. A milhocina é um rejeito da água de lavagem e embebição dos grãos de milho quando do fracionamento em amido e germe (óleo), contendo 40% de sólidos. Possui entre 21% a 45% de proteínas, 20% a 26% de ácido láctico, cerca de 8% de cinzas (contendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , etc.), cerca de 3% de carboidratos e baixo teor de gordura (0,9% - 1,2 %), de acordo com a literatura (CARDINAL; HEDRICK, 1947; AKHTAR et al., 1997).

3.8 Perspectivas de utilização

Muitos dos potenciais de aplicações dos biossurfactantes, bem como uma expansão dos poucos já firmados no mercado, dependem da possibilidade de um processo de produção econômico. Muito trabalho ainda será necessário para a otimização de processos ao nível biológico e de engenharia. Os custos típicos dos biossurfactantes variam de cerca de 10 \$/mg para surfactina pura (98% de pureza), utilizada em pesquisas médicas, a U.S. 24 \$/kg para fórmulas de emulsão propostas no início da década de 1980 para limpeza de tanques e/ou

recuperação avançada de petróleo. Segundo Mulligan (2009) as aplicações mais promissoras são no derramamento de óleo, na limpeza de tanques de estocagem, na remoção de óleo bruto, na recuperação de óleo e na biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos ou outros poluentes como os metais pesados. Pattanath et al. (2008) estimaram que os biossurfactantes capturariam em torno de 10% do mercado dos surfactantes comerciais, o que representava um investimento de U\$ 200 milhões.

Embora se admita que o aperfeiçoamento da tecnologia de produção dos biossurfactantes já tenha possibilitado um aumento de 10-20 vezes da sua produtividade, é provável que novos e significativos progressos (ainda que de uma ordem de magnitude inferior) sejam necessários para tornar essa tecnologia comercialmente viável (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Os parâmetros que podem ser variados na tentativa de otimizar a produção de biossurfactantes incluem:

- a) Seleção de matérias-primas de baixo custo, possibilitando o equilíbrio adequado de C, N, P e outros oligoelementos para maximização do rendimento e o desenvolvimento de cepas de micro-organismos capazes de metabolizar qualquer subproduto residual.
- b) Bioprocessamento, que pode ser otimizado por meio das condições operacionais do reator e da reciclagem do meio utilizado.
- c) Isolamento/recuperação do produto: a maioria das tecnologias inicialmente propostas envolvia formas mais elaboradas de purificação e isolamento. A possibilidade de desenvolvimento *in-situ* ou a utilização de líquidos metabólicos, ou seja, do biossurfactante bruto, pode, sem dúvida, conduzir a uma redução substancial de custos (BOGNOLO, 1999).

3.8.1 Desenvolvimento de bioprocessos para a produção e recuperação de biossurfactantes

Um processo eficiente e econômico constitui a base de qualquer indústria biotecnológica com fins lucrativos. Assim, o desenvolvimento de bioprocessos é o primeiro passo para a comercialização de todos os produtos biotecnológicos, inclusive os biossurfactantes. Qualquer tentativa de aumentar o rendimento de um biossurfactante exige a adição ótima de componentes do meio e a seleção das condições ótimas que conduzam à produtividade máxima ou ótima (MUKHERJEE et al., 2006).

De maneira semelhante, técnicas e métodos de processamento eficazes são necessários para a máxima recuperação do produto.

Vários elementos, componentes do meio e precursores são mencionados como capazes de afetar o processo de produção dos biossurfactantes e a quantidade e a qualidade finais. Segundo a literatura, elementos como o nitrogênio, o ferro e o manganês afetam o rendimento dos biossurfactantes. Da mesma maneira, as proporções entre diferentes elementos como C:N, C:P, C:Fe ou C:Mg afetam a produção de biossurfactantes e a sua otimização intensifica a produção (AMEZCUA-VEJA et al., 2007). A maximização da produtividade ou a minimização dos custos de produção exigem o uso de estratégias de otimização do processo, envolvendo múltiplos fatores.

Mesmo que se obtenha uma produção ótima utilizando-se meios e condições de cultivo adequados, o processo de produção ainda requer métodos eficazes e econômicos de recuperação dos produtos. Assim, um fator importante na determinação da viabilidade de um processo de produção em escala comercial é a disponibilidade de procedimentos de recuperação e “downstream” econômicos. No caso de muitos produtos biotecnológicos, os custos do processamento correspondem a 60% dos custos totais de produção. Vários métodos convencionais para a recuperação de biossurfactantes como precipitação com ácidos, extração com solventes, cristalização, precipitação com sulfato de amônio e centrifugação têm sido amplamente mencionados na literatura (MUTHUSAMY et al., 2008).

Alguns métodos de recuperação não-convencionais foram utilizados nos últimos anos. Esses procedimentos tiram vantagem de algumas propriedades dos biossurfactantes – como a atividade superficial ou a capacidade de formar micelas – e são particularmente adequados à recuperação contínua em larga escala de biossurfactantes extracelulares do líquido metabólico. Alguns exemplos dessas estratégias de recuperação de biossurfactantes incluem fracionamento de espuma (DAVIS et al., 2001; NOAH, 2005), ultrafiltração (SEN; SWAMINATHAN, 2005), adsorção-dessorção em resinas de poliestireno e cromatografia de troca iônica (REILING et al., 1986). Uma das principais vantagens desses métodos é a capacidade de operar de modo contínuo na recuperação de biossurfactantes com um alto nível de pureza. Biossurfactantes com alto teor de pureza são exigidos em indústrias como a farmacêutica, alimentícia e cosmética, as quais irão exigir a aplicação dessas técnicas de recuperação.

Novas pesquisas são necessárias para aperfeiçoar as fases de processamento já existentes, tornando-as mais competitivas em termos de custos. Muitas vezes, uma só técnica de processamento não é suficiente para a recuperação e purificação do produto. A Tabela 3 descreve os procedimentos de recuperação dos biossurfactantes e suas vantagens.

Tabela 3 - Métodos de recuperação de biossurfactante com base nas propriedades físico-químicas

Processo de recuperação	Propriedade responsável		
	pela seleção do método de separação	Instrumentação necessária	Vantagens
Precipitação ácida	Biossurfactantes se tornam	Não requer	Baixo custo; eficiente na

	insolúveis a baixos pH	equipamentos	recuperação do surfactante bruto
Extração com solventes orgânicos	Biossurfactantes são solúveis em solventes orgânicos devido à presença da cadeia hidrofóbica	Não requer equipamentos	Eficiente na recuperação do surfactante bruto e na purificação parcial; natureza reutilizável
Precipitação por sulfato de amônio	Exclusão da fase saturada em sal pelo biossurfactante polimérico rico em proteínas	Não requer equipamentos	Efetiva no isolamento de determinados tipos de biossurfactantes poliméricos
Centrifugação	Biossurfactantes insolúveis precipitam em função da força centrífuga	Necessidade de Centrífuga	Reutilizável; efetiva na recuperação do surfactante bruto
Fracionamento de espuma	Biossurfactantes, devido à atividade surfactante, formam e se particionam na espuma	Construção de biorreatores especiais que facilitem a recuperação da espuma durante a fermentação	Utilizado em processos contínuos de recuperação; alta pureza do produto
Ultrafiltração em membrana	Biossurfactantes formam micelas acima da CMC, as quais são retidas em membranas poliméricas	Unidades de ultrafiltração com membrana polimérica porosa	Rápido; recuperação em apenas uma etapa; alto grau de pureza
Adsorção em resinas de poliestireno	Biossurfactantes são adsorvidos em resinas poliméricas e podem ser desorvidos usando solvente orgânico	Resina de poliestireno empacotada em colunas de vidro	Rápido; recuperação em apenas uma etapa; alto grau de pureza; reutilizável
Adsorção em carbono ativo	Biossurfactantes são adsorvidos em carvão ativo e podem ser desorvidos usando solvente orgânico	Não requer equipamentos; pode ser adicionado ao meio de cultivo; também pode ser empregado em colunas de vidro	Pureza elevada do biossurfactantes; baixo custo; reutilizável; recuperação em cultura contínua

Cromatografia de troca iônica	Biossurfactantes carregados se ligam a resinas trocadoras de íons e podem ser eluídos com um tampão específico	Resinas trocadoras de íons empregadas em colunas	Alta pureza, reutilização, rápida recuperação do produto
Extração por solvente (com MTBE)	Biossurfactantes são solúveis em solventes orgânicos devido à presença de cadeia hidrofóbica	Não requer equipamentos	Menos tóxico do que os solventes convencionais; baixo custo

Fonte: MUKHERJEE et al. (2006).

Nesses casos, uma estratégia de recuperação de múltiplas fases, utilizando uma seqüência de fases de concentração e purificação, é muito mais eficaz (REILING et al., 1986). Num processo de recuperação de múltiplas etapas dos biossurfactantes, será possível obter o produto a qualquer grau de pureza desejado. Biossurfactantes brutos ou impuros obtidos nas fases iniciais do processo de recuperação podem ser utilizados em aplicações ambientais e também na recuperação de petróleo e nas indústrias de tintas e têxtil e obtidas a custos mais baixos. Em alternativa, os biossurfactantes de elevado grau de pureza exigido pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética podem ser obtidos por meio de novos estágios de purificação. Este tipo de recuperação de fases múltiplas deverá ser útil nas indústrias que produzem biossurfactantes para uma vasta gama de aplicações (MUKHERJEE et al., 2006).

3.8.1.1 Otimização das condições operacionais

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

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

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

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

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

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

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

Aeração e agitação são dois fatores importantes que influenciam a produção de biossurfactante, pois facilitam a transferência de oxigênio. Cunha et al.(2004) observaram que a agitação exerceu um efeito negativo sobre a redução da tensão superficial pelo biossurfactante de *Serratia* SP. SVGG16, cultivada em hidrocarbonetos, sendo os melhores resultados obtidos para a menor velocidade testada, ou seja, 100 rpm, quando comparada com velocidades de 200 rpm e 300 rpm. Desai & Banat (1997) também verificaram que o aumento da velocidade de agitação resultou na menor produção de biossurfactante por *Nocardia erythropolis*.

3.9 Economia na produção de biossurfactantes

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

O custo de produção de biossurfactantes pode ser absorvido, caso os mesmos sejam utilizados em baixa concentração, para a produção de cosméticos, de medicamentos e de alimentos. Para aplicações mais abrangentes, por outro lado, como a recuperação de óleos, a qual requer grandes volumes de surfactantes, o custo de produção pode dificultar a utilização destes biocompostos (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

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

A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (DESAI; BANAT, 1997).

A produção de biossurfactantes a um baixo custo é dificultada quando se faz necessário uma refinação extensiva. Para o desenvolvimento de processos deve-se usar biossurfactantes capazes de serem recuperados por técnicas simples e baratas. O processo mais comum de recuperação dos biossurfactantes é a extração com solventes (clorofórmio-metanol, diclorometano-metanol, butanol, acetato de etila, pentano, hexano e ácido acético, entre outros). Todavia, têm sido reportadas técnicas de precipitação dos produtos como a precipitação por sulfato de amônio, centrifugação por cristalização, adsorção e fermentação fracionária. Vários processos de recuperação de biossurfactantes estão demonstrados na Tabela 4 (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Tabela 4 - Processos de recuperação de biossurfactantes

Processo	Recuperação de biossurfactante
Precipitação do sulfato de amônio	Emulsan
	Biodispersan
	Bioemulsifier
Precipitação de acetona	Bioemulsificantes
	Glicolipídios
Precipitação de ácido	Surfactin
	Trealoselipídios
Extração de solvente	Soforolipídios
	Liposan
	Celobiolipídios
	Glicolipídios
Cristalização	Glicolipídios
Centrifugação	Glicolipídios
	Ram nolipídios
Adsorção	Lipopeptídeos
	Glicolipídios
Fermentação fracionada	Surfactina
Filtração de fluxo tangencial	Biossurfactante misto
Precipitação	Glicolipídios
Ultrafiltração	Glicolipídios

Fonte: MAKKAR; CAMEOTRA (2002).

4. Referências Bibliográficas

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M.R. CASALS, M.; GARCÍA, F.; MANRESA, A.; Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v. 17, p. 1367-1371, 2001.

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids : diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323-1336, 2010.

AKHTAR, M., LENTZ, M.J., BLANCHETTE, R.A., KIRK, T.K. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. **TAPPI J.** 80, 161-164, 1997.

ALCÂNTARA, R.; AMORES, J.; CANOIRA, L.; FIDALGO, E.; FRANCO, M. J.; NAVARRO, A. Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used fruing oil and tallow. **Biomass and Bioenergy**, v. 18, p. 515-527, 2000.

AL-ARAJI, L.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. Microbial surfactants. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology** , v. 15, p. 99-105, 2007.

AMARAL, P.F.F.; DA SILVA, J.M.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A.M.V.; 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.

AMEZCUA-VEJA, C. A. et al. Effect of culture conditions on fatty composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 237-240, 2007.

AMEZCUA-VEJA, C.; POGGI-VARALDO H. M.; ESPARZA-GARCIA, F.; RÍOS RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 237-240, 2006.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR8492: tijolo maciço de solo-cimento: determinação da resistência à compressão e da absorção de água, método de ensaio. Rio de Janeiro (1982).

BANAT, I. M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

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

BARNETT, C.; SMITH, A.; SCANLON, B.; ISRAILIDES, C. J. Pullulans production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 203-209, 1999.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. ; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, M. G. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 01-14, 2007.

BEDNARSKI, W., ADAMCZAK, M., TOMASIK, J., PLASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Biores. Technol.** 95, 15-18, 2004.

- BENINCASA, M. CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MOREAES, I. O. Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soap-stock as the sole carbon source. **Journal Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**. v. 152, p. 41-52, 1999.
- CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LOPÉZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3634-3640, 2009.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.
- 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.
- CANET, R.; BIRNSTINGL, J. G.; MALCOLM, D. G.; LOPEZ-REAL, J. M.; BECK, A. J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresource Technology**, v.76, p. 113-117, 2002.
- CARDINAL, E.V.; HEDRICK, L. R. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. **Journal of Biological Chemistry**, p. 609-612, 1947.
- CASAS, J.; OSCHOAS, F. G. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 488-494, 1999.
- CERQUEIRA, V.S., HOLLENBACH, E.B., MABONI, F., VAINSTEIN, M.H., CAMARGO, F.A.O., PERALBA, M.D.C.R., BENTO, F.M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresour. Technol**, v. 102, p. 11003–11010, 2011.
- CHRISTEN, P.; BRAMORSKI, A.; REVAH, S.; SOCCOL, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strain grown on agroindustrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 211-215, 2000.
- CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 50, p. 846-850, 1985.
- COIMBRA, C.D.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species. **Current Microbiology**, v. 58 , p. 245-251, 2009.
- COOPER, D. G. Biosurfactants. **Microbial Science**, v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 224-229, 1987.
- CORTIS, A.; GHEZZEHEI, T.A. On the transport of emulsions in porous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, p. 1-4, 2007.
- CUNHA, C. D.; ROSÁRIO, M.; ROSADO, A. S.; LEITE, S. G. F. **Process Biochemistry**, v. 39, 2004.

DAS, K., MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochem.** v. 42, p. 1191–1199, 2007.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 Cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 346-354, 2001.

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, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviewers** v. 61, p. 47-64, 1997.

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

DUBEY, K. V.; CHARDE, P. N.; MESHRAM, S. U.; SHENDRE, L. P.; DUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanensis* strain-j at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**, v. 126 p. 368-374, 2012.

DUBEY, K., JUWARKAR, A. Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 3, p. 74-81, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**. Easton, v. 28, p. 350-356, 1956.

FELSE, P. A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K. J.; GROSS, R. A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

FONTES, G. C.; BALA, G. A. Produção de biossurfactantes por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FOX, S. I.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

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

GHURYE, G. L.; VIPULANANDAN, C.; WILSON, R. C. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p.661 - 666, 1994.

GONZINI, O.; PLAZA, A.; PALMA; D. I. L.; LOBO, M. C. Electrokinetic remediation of gasoil contaminated soil enhanced by rhamnolipids. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, p. 1239-1248, 2010.

GUERRA-SANTOS, L.H.; KÄPPELI, O.; FIECHLER, A. A dependence of *pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **App Microbial Biotechnol**, v. 24, p. 443-448, 1986.

GUERRA-SANTOS, L.H.; KÄPPELI, O.; FIECHLER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon sources. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 48, p. 301-305, 1984.

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

HABA, E.; BRESCO, O.; FERRER, C.; MARQUES, A.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Isolation of lipase screening bacteria by developing used frying oil as selective substrate. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 26, p. 40-44, 2000a.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, p. 379-387, 2000.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M. MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000b.

HAMMAN, O. B.; de la RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Decolorization of olive oil Mill wastewater by *Phanerochaete flavido-alba*. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 18, p. 2410-2415, 1999.

HUE N.; SEMNI, L.; LAPREVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 15, p. 203-209, 2001.

HUE Z., CHEN J., LUN S., WANG X. Influence of biosurfactants produced by *Candida Antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, v. 34, p. 4143-4150, 2003.

IKRAN-UL, H.; ALI, S.; QADEER, M. A.; IQBAL, J. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 125-123, 2004.

ILORI, M. O.; AMUND, O. O. Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. **Z. Naturforsch**, v. 56C, p. 547-552, 2001.

KAKINUMA, A.; OACHIDA, A.; SHIMA, T.; SUGINO, H.; ISANO, M.; TUMURA, O.; ARIMA, K. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 33, p. 669-1672, 1969.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 249-256, 2003.

KARANTH, N.G.R.; DEO, P.G.; VEENADING, N.K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science On Line**, v. 77, p. 116-126, 1999.

KIM, H. S. et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 40, p. 391-396, 2006.

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

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

LAZARIDOU, A.; ROUKAS, T.; BILIADERIS, C. G.; VAIKOUSI, H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 31, p. 122-132, 2002.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de biossurfactante utilizando resíduos industriais como substratos de baixo custo. VI Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental, 2008.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 785-793, 2009.

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

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 74, p. 887-889, 1997.

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

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

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakar Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675-683, 2005.

MANOCHA, M. S., SAN-BLAS, G., CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasilienses*: possible correlation with virulence of different strains. **Journal of General Microbiology**, v. 117, p. 147-154, 1980.

MARÇAL, M. do C.R. **Produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* em meios suplementados por óleos vegetais (babaçu, côco e dendê)**. Recife, 1991. Dissertação (Mestrado em Nutrição): Universidade Federal de Pernambuco, 1991. 147f.

MARGESIN R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbon in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 650-663, 2002.

MARIANO, "Avaliação do Potencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminados com Óleo Diesel", Tese de Doutorado, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Univ. Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2006.

MARQUES, L. P. Anaerobic digestion treatment of olive Mill wastewater for effluent re-use in irrigation. **Desalination**, v. 137, p. 237-239, 2001.

MAYER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A., Robert, M., Espuny, C., Guinea, J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Biores. Technol.** 431, 1-6, 1993.

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

MEYER, B.N.N.R.; FERRIGNI, J.E.; PUTNAM, L.B.; JACOBSEN, D.E.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M. N. Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the biohesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, p. 822-832, 2001.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C.N.; WANG, S.; Remediation of a heavy metal contaminated soil by a rhamnolipid foam. In: **Geoenvironmental engineering. Integrated management of groundwater and contaminated land**. London: Thomas Telford; p. 544-51, 2004.

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

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

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736-747, 2008

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

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p. 1-2, 2004.

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

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.

NOAH, K.S.; Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 465-473, 2005.

PACWA-PŁOCINICZAK, M., PŁAZA, G.A., PIOTROWSKA-SEGET, Z., CAMEOTRA, S.S. **Environmental applications of biosurfactants**: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* v. 12, p. 633-654, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL C. R.; MITCHEL D. A. New developments in solid-state fermentation: I – bioprocesses and products. **Process Biochem.** v. 35, p. 1153-1169, 2000.

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.

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

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 633-654, 2011.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biosurfactante utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2006.

PORSUNTHORNTAWEE, O.; ARTTAWEEPORN, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis*/ PT2 and *Pseudomonas aeruginosa*/ SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochemical Engineering Journal*, v. 42, p. 172-179, 2008.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida* - a gujarat oil field isolate. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6, p. 65-68, 2003.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. ; Ramnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials, **Biotechnology Progress**. v. 18, p. 1277-1281, 2002.

RAHMAN, K.S.M.; STREET, G.; LORD, R.; KANE, G.; RHAMAN, T.J.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Bioremediation of petroleum sludge using bacterial consortium with biosurfactant. In: **Environmental Bioremediation Technologies**. Eds. SINGH, S.N.; TRIPATHI, R.D., Springer Publication, pp. 391-408, 2006.

RAHMAN, P.K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants – review. **Biotechnology**, v. 7, p. 360-370, 2008.

REILING, H.E.E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L.H.; HIRT, R.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. A pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 985-989, 1986.

REIS, R.S., PEREIRA, A.G., NEVES, B.C., FREIRE, D.M.G. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – a review. **Bioresour.Technol**, v. 102, p. 6377–6384, 2011.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPINY, M. J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**. v. 11, p. 871-874, 1989.

RODRIGUES L.; MOLDES A.; TEIXEIRA J.; OLIVEIRA R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135-142, 2006.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation, **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 249-252, 2002.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Z. Naturforsch**, [S.I.], v. 3, p. 229-236, 2001.

ROSENBERG; E.; RON, E.Z. High- and low molecular mass antimicrobial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.

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

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.

RUFINO, R.D., SARUBBO, L.A., BENICIO, B.N.; 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.

SAEKI, H.; SASAKI, KM.; KOMATSU, O.; MIURA, A.; MATSUDA, H. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 572-577, 2009.

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

SARUBBO, L.A., MARÇAL, M. C. R., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Comparative study of bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* strains. **Brazilian Arch. Biol. Technol.** 40, 707-720, 1997.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C.; NEVES, M. L. C.; PORTO, A.L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 45, p. 1-4, 1999.

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.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 9, p. 400-406, 2006.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. do C.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. da 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**, v.95, p.59-67, 2001.

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

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.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine*, v.3, p.123-133, 2008.

SHABTAI, Y. Production of exopolysaccharides by *Acinetobacter* strains in a controlled fed-batch fermentation process using soap stock oil (SSO) as carbon source. **International Journal of Biology Macromolecule**, v. 12, p. 145-152, 1990.

SHAH, V.; JURJERIC, M.; BADIA, D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 512-515, 2007.

SHIN, H. T.; BAIG, S. Y.; LEE, S. W.; et al. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 59-62, 2004.

SHOUNTZOU, P.; SOUPIONI, M.; BEKATOROU, A.; et al. Lead (II) uptake during baker's yeast production by aerobic fermentation of molasses. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1479-1482, 2003.

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

SILVA, S. N. R. L., SANTOS, D. K. F., SILVA, A. F., FARIAS, C. B. B., LUNA, J. M., CAMPOS-TAKAKI, G. M., SARUBBO, L. A. Glicerina como substrato alternativo para produção de biossurfactantes In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009, Rio Claro, SP. *Holos Environment*, 2009.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v.25, p.99-121, 2007.

SOUZA-SOBRINHO, H.B., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SALGUEIRO, A.A., CAMPOS-TAKAKI, G.M., LEITE, L.F.C. AND SARUBBO, L.A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 912-917, 2008.

STANGUELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants – their identify and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, v. 81, p. 4-12, 1997.

THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. Biosurfactants from potato process effluents. **Applied Biochemistry Biotechnology**, ed. 84, v. 84, p. 917-930, 2000.

TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.Y.; HODGKISS, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environ. Pollut.** v.93, p.249–256. 1996.

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; TEHRANI, H.A. Preparation and characterization of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae*. **Lebensm.-Wiss. u-Technology**, v. 29, p. 734-737, 1996.

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

VELIKONJA, J.; KOSARIC, N. Biosurfactant in food application. In: **Biosurfactants: production properties, applications**. Ed. KOSARIC, N., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 419-446, 1993.

VOLBRECHT, E.; RAU, U.; LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils surfaceactive di-, tri- and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *T. sukamurella* spec. **Fett/LIPID**. v. 101, p. 389-394, 1999.

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

<<http://pensandoprafrente.blogspot.com/2010/08/surfactante-desenvolvido-em-projeto.html>>, acessado no dia 05/03/2011 às 20hs.

<<http://www.quimicadostensoativos.blogspot.com>>, acessado no dia 14/03/2011 às 19:30hs.

<<http://www.virtuallaboratory.ne>>, acessado no dia 14/03/2010 às 20hs.

<http://www.galileog.com/ciencia/biologia/celulas/celulas_procariotas.htm>, acessado no dia 15/03/2011 às 19hs.

CAPÍTULO 2

**Artigo submetido para publicação na Journal of
Petroleum Science & Engineering**

**Synthesis and evaluation of biosurfactant
produced by *Candida lipolytica* using animal
fat and corn steep liquor**

**Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica*
using animal fat and corn steep liquor**

Danyelle K.F. Santos, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna, Alexandra A. Salgueiro, Leonie A.

Sarubbo

*Centre of Science and Technology, Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista,
Cep: 50050-900, Recife-Pernambuco, Brazil*

*Corresponding author. Tel.: +55 81 21194048; fax: +55 81 21194043.

E-mail address: leonie@unicap.br (L. Sarubbo)

Abstract

In the present study, low-cost media based on animal fat and corn steep liquor combined with glucose, yeast extract, urea and other inorganic nitrogen sources were evaluated for the production of biosurfactants by the yeast *Candida lipolytica* UCP0988 in batch shake flasks. At the end of the six-day fermentation period, the medium containing only animal fat (5%) and corn steep liquor (2.5%) yielded the maximal reduction in surface tension (from 50 to 28 mN/m). The properties of the biosurfactant separated by different organic solvent extractions were investigated and the critical micelle concentration was determined. Preliminary chemical characterisation revealed the anionic nature of the biosurfactant. Compositional analysis of the biosurfactant was carried out using thin layer chromatography. The biosurfactant produced by the isolate was characterised as a glycolipid. Emulsification activity and surface tension stability of the biosurfactant produced using different hydrocarbons and vegetable oils and the effect of pH, temperature and the addition of salt were also studied. The cell-free broth (crude biosurfactant) was effective at recovering up to 70% of the residual oil from oil-saturated sand samples and also effective at oil displacement (54%). The crude biosurfactant from *C. lipolytica* and aqueous solutions of the isolated biosurfactant at 0.04, 0.08 and 0.16% were effective in recovering up to 100% of the motor oil from the walls of the beakers. These properties indicate the potential of a cheaply produced glycolipid for application in the oil industry.

Keywords: biosurfactant; *Candida*; animal fat; stability; oil; surface tension

1. Introduction

Surfactants are amphipathic molecules that reduce the surface tension between water and hydrocarbons (Kitamoto et al., 2002). These substances have a wide variety of applications in medicine, household products, agriculture and the petroleum industry, including oil extraction and processing, the cleaning of residual oil vessels, the acceleration of well drilling and the enhancement of oil recovery; surfactants can also be used for ecosystem bioremediation. Currently, nearly all the industrially produced surfactants are chemically derived from petroleum and require both synthesis and several purification steps, thereby rendering the process costly and prone to contamination, the hazards of which are unknown (Banat et al., 2010).

As a result of increasing environmental awareness and the emphasis placed on a sustainable society in harmony with the global environment, natural surfactants of microbial origin (biosurfactants) have recently been recommended to replace chemically synthesised surface active agents (Das and Mukherjee, 2007; Gusmão et al., 2010). Such natural surfactants offer a number of advantages over chemical surfactants, such as low toxicity, adequate inherent biodegradability and ecological acceptability. These substances may also be used at extremes of temperature, acidity and salt concentration and can be produced from inexpensive, renewable substrates (Banat et al., 2010).

The key factor governing the success of biosurfactant production is the development of an economical process that uses low-cost materials and yields high productivity (Rufino et al., 2007; 2008). To enhance the efficiency of biosurfactant production by microorganisms, inexpensive medium components should be explored, such as food industry by-products or waste, as medium components represent approximately 50% of the total production cost (Haba et al., 2000). The food industry generates large amounts of polluting organic wastes and residues that can be used for the production of biosurfactants (Makkar and Cameotra,

2002). Animal fat and tallow are available in large quantities from the meat processing industry and are used as raw materials for production of fatty acids, soaps and lubricants (Desphande and Daniels, 1995). A major application of edible fats is as a cooking medium for foods, but fats have recently lost most of this market to vegetable oils. Hence, it is important to seek new applications for animal fat. Edible fat is about 40% cheaper than vegetable oils (Buchanan and Gaylinn, 1992). Inedible fat is even cheaper and is the preferred candidate for microbial fermentation processes.

Many yeasts can grow on fat (Kajs and Vanderzant, 1980), vegetable oil (Sarubbo et al., 2006, 2007; Batista et al., 2009), alkane (Cooper et al., 1975), deproteinised cheese whey (Daniel et al., 1998) and soy molasses (Solaiman et al., 2007). Some yeasts produce surface active agents during growth on such substrates (Gusmão et al., 2010; Luna et al., 2009) thereby suggesting the possibility of using fat to produce single-cell proteins and/or biosurfactants from yeast. Moreover, corn steep liquor is a by-product of corn wet milling and is an excellent source of organic nitrogen that has been used as an important constituent in some growth media, including biosurfactant-producing media (Coimbra et al., 2009; Luna et al., 2009, 2011; Sobrinho et al., 2008).

In the present study, the production of a biosurfactant from the yeast *Candida lipolytica* UCP0988 was carried out using low-cost fermentative substrates (animal fat and corn steep liquor). The properties of the biosurfactant produced with different oils and the effect of environmental factors on emulsification activity and stability are reported.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All chemicals were of reagent grade. Growth media were purchased from Difco Laboratories, USA. The animal fat used was white choice grease from a bovine processing plant located in the city of Recife (Brazil) and was used without any further processing. The fatty acid composition is listed in Table 1.

Corn steep liquor was obtained from Corn Products do Brasil in the city of Cabo de Santo Agostinho (Brazil). According to Akhtar et al. (1997) and Cardinal and Hedrick (1948), corn steep liquor is 21 to 45% protein, 20 to 26% lactic acid, 8% ash (containing Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+}), 3% sugar and has low fat content (0.9 to 1.2%).

2.2. Microorganism

Candida lipolytica UCP0988 was obtained from the culture collection of the Universidade Católica de Pernambuco (Brazil). The microorganism was maintained at 5 °C on yeast mould agar slants containing (w/v) yeast extract (0.3%), malt extract (0.3%), tryptone (0.5%), D-glucose (1.0%) and agar (5.0%). Transfers were made to fresh agar slants each month to maintain viability.

2.3. Growth conditions

The inoculum of *Candida lipolytica* was prepared by transferring cells grown on a slant to 50 ml of yeast mould broth. The seed culture was incubated for 24 h at 28 °C and agitated at 150 rpm. The yeast was cultivated in a submerged culture with agitation in a New Brunswick C-24 shaker. Different combinations of the production medium were tested for biosurfactant production (Table 2). The media were sterilised by autoclaving at 121 °C for 20 min (all components were sterilised together). The final pH of the media was 5.3. The inoculum (1% v/v) was introduced in the amount of 10^4 cells/ml to a cool medium yeast.

Cultivation was carried out in Erlenmeyer flasks at 27°C with shaking at 200 rpm for 144 h. At regular intervals, samples were withdrawn for analyses. All assays were carried out in triplicate and did not vary more than 5%.

2.4. Biomass estimation

Biomass was monitored by estimating the cell dry weight after removal of the hydrophobic substrates at 10000 g for 15 min. Briefly, a 10-ml aliquot of the fermentation broth was centrifuged to obtain a cell pellet. The supernatant was discarded and the cell pellet was washed twice with distilled water to remove the medium components. The pellet was then washed with 10 ml of ethyl acetate to remove hydrophobic substances. The washed cells were centrifuged to obtain a pellet, which was dried in vacuum to a constant weight (indicated by a variation of less than ± 0.2 g). Suitable calculations were made to express cell mass in terms of g/l (Felse et al., 2007).

2.5. Emulsifying activity with different hydrophobic compounds

The emulsification index (EI) was determined using the method described by Cooper and Goldenberg (1987). Two ml of a liquid hydrophobic compound (petroleum, diesel, benzene, lubricating motor oil, n-hexane and five different vegetables oils) were added to 2 ml of the cell-free culture broth in a graduated screwcap test tube and vortexed at high speed for 2 min. Emulsion stability was determined after 24 h and the EI was calculated by dividing the height of the emulsion layer by the total height of the mixture and multiplying by 100, as described by the following equation:

$$EI (\%) = H_{EL}/H_T \times 100 \quad (1)$$

Where H_{EL} is the height of the emulsion layer and H_T is the height of the total mixture.

2.6. Surface tension and determination of critical micelle concentration

The surface tension of the culture supernatants obtained by centrifuging the cultures at 5000 g for 20 minutes was measured using a Sigma 700 digital surface tensiometer (KSV Instruments LTD - Finland) working on the principle of the Du Nuoy ring method. Ten millilitres of each sample were transferred to a clean 20-ml beaker and placed on the tensiometer platform. A platinum wire ring was submerged in the solution and then slowly pulled through the liquid-air interface to measure surface tension (mN/m). Between each measurement, the platinum wire ring was rinsed with chromic acid, deionised water and acetone and was then flamed and allowed to dry. Calibration was performed using Mill-Q-4 ultrapure distilled water (surface tension = 71.5 mN/m \pm 0.5) before taking measurements of the samples.

The critical micelle concentration (CMC) was determined by measuring the surface tension of the dilutions of the isolated biosurfactant in distilled water up to a constant surface tension value. Stabilisation was allowed to occur until the standard deviation of 10 successive measurements was less than 0.4 mN/m. Each result was the mean of 10 determinations after stabilisation. The CMC was obtained by plotting surface tension against surfactant concentration and expressed as g/l of biosurfactant.

2.7. Effect of environmental factors on biosurfactant activity

The effect of the addition of different concentrations of NaCl on the activity of the biosurfactant was investigated in the cell-free broth. A specific concentration of NaCl (2 to 12%, w/v) was added and surface tension and emulsification activity were determined, as stated previously. The cell-free broth was also maintained at a constant temperature (4, 27, 70 and 120 °C) for 60 min and used for the measurement of surface tension and emulsification.

The effect of pH on surface tension and emulsification was evaluated after adjustment of the broth pH to 2, 4, 6, 8, 10 and 12 with 6.0 M NaOH or HCl.

2.8. Biosurfactant isolation

The biosurfactant was extracted using different solvent system methods. The first method is that described by Pareilleux (1979). The cell-free broth was acidified with 6 M HCl to pH 2.0 and precipitated with two volumes of methanol. After 24 h at 4 °C, samples were centrifuged at 5000 *g* for 30 min, washed twice with cold methanol and dried at 37 °C for 24 to 48 h. The yield in isolated biosurfactant was expressed in g/l.

In the second method, the biosurfactant was recovered from the cell-free broth by cold acetone precipitation, as described by Ilori et al. (2005). Three volumes of chilled acetone were added and allowed to stand for 10 h at 4 °C. The precipitate was collected by centrifugation and evaporated to dryness to remove residual acetone. The precipitate was then re-dissolved in sterile water. The third method was that described by Amézcuca-Vega et al. (2006). A sample of the cell broth was placed in a separatory funnel and an equal volume of ethyl acetate was added. The broth and ethyl acetate mixture formed two phases. The upper phase was transferred to a round-bottom flask. The lower phase was extracted with an equal volume of ethyl acetate three times for complete recovery of the biosurfactant. The round-bottom flask was placed on a rotoevaporator and the ethyl acetate was evaporated under vacuum at 80 °C. The residue was washed twice with hexane and dried in the oven to a constant weight.

2.9. Biosurfactant composition

Protein concentration in the isolated biosurfactant was estimated using a total protein test kit (Labtest Diagnostica S.A., Brazil). Total carbohydrate content was estimated using the

phenol-sulphuric acid method (Dubois et al., 1956). Lipid content was determined based on the method described by Manocha et al. (1980): 0.5 g of the isolated material was extracted with different proportions of chloroform: methanol (1:1 and 1:2, v/v). The organic extracts were then evaporated under vacuum and the lipid content was determined by gravimetric estimation.

2.10. Biosurfactant characterisation by thin-layer chromatography

After isolating the biosurfactant, a 0.1-g sample was dissolved in methanol and analysed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel plates (G60; Merck, Germany). Chromatograms were developed with chloroform:methanol:acetic acid (65:15:2, v/v) and detection was performed as follows: (1) exposure to iodine vapour for lipid stains; (2) exposure to the Molish reagent for sugar detection; and (3) exposure to 1% ninhydrin solution for free amino groups. The reagents were sprayed and the plates were heated at 110 °C for 30 to 40 min until the appearance of the respective colours (Desphande and Daniels, 1995; Santos et al., 2002).

2.11. Determination of biosurfactant ionic character

The ionic charge of the biosurfactant was determined using the agar double diffusion method (Meylheuc et al., 2001). Two regularly spaced rows of wells were made in agar with a low degree of hardness (1% agar). The wells in one row were filled with the biosurfactant solution and the wells in the other row were filled a pure compound of known ionic charge. The anionic substance chosen was sodium dodecyl sulphate (SDS) 20 Mm and the cationic substance was barium chloride 50 mM. The appearance of precipitation lines between the wells, indicative of the ionic character of the biosurfactant, was monitored over a 48-h period at room temperature.

2.12. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant removal from sand

Biosurfactant suitability for enhanced oil recovery was determined using artificially contaminated sand containing 5% motor oil. Fifty-g samples of 40/50 mesh (0.3 to 0.42mm) and 20/30 mesh (0.6 to 0.85mm) fractions of contaminated Brazilian NBR 7214 standard sand (ABNT, 1982) were transferred to 250-ml Erlenmeyer flasks and submitted to the following treatments: addition of 50 ml of distilled water (control), 50 ml of the cell-free broth or 50 ml of a solution of the isolated biosurfactant at 0.08 (CMC), 0.8 and 2%. The samples were incubated on a rotary shaker (150 rpm) for 24 h at 27 °C and then centrifuged at 5000 g for 20 minutes for separation of the laundering solution and sand. The pH of the samples was determined before and after treatment. The amount of oil remaining in the sand after the impact of the biosurfactant was gravimetrically determined by the amount of material extracted from the sand by hexane (Luna et al., 2009).

2.13. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant spreading

The oil displacement test was carried out slowly by dripping 15 µl of motor oil onto the surface of 40 ml of distilled water layer contained in a Petri dish (15 cm in diameter), which spread over the entire water surface area. This was followed by the addition of 10 µl of the cell-free broth or aqueous solutions containing the isolated surfactant at 0.04 and 0.08 (CMC) and 0.16% onto the surface of the oil layer. The mean value of the diameter of the clear zones in triplicate experiments was determined and then calculated as the percentage of the Petri dish diameter (Ohno et al., 1993).

2.14. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant cleaning test

To determine the cleaning ability of the biosurfactant, the inner walls of a set of beakers were coated with motor oil. To remove the adhered oil, 50.0 ml of the cell-

free broth or wash solutions containing 0.04 and 0.08 (CMC) and 0.16% aqueous solution of the isolated biosurfactant were added to each beaker, vortexed for 1.0 min and allowed to stand for 6 h (Pruthi and Cameotra, 2000).

2.15. Statistical analysis

The determination of all surface tensions, biosurfactant concentrations and emulsification activities was performed at least three times. Mean and standard error values were calculated using the Microsoft Office Excel 2003 (Version 7).

3. Results and discussion

3.1. Biosurfactant production

Biosurfactants must compete with surfactants of petrochemical origin in cost and production capacity to meet high-volume commodity applications, such as oil recovery and industrial cleaning (Banat et al., 2010). High production costs can be tolerated for biosurfactants used in low-volume specialty markets (e.g. cosmetics, healthcare, etc.). In process economics, the cost of raw materials is an important factor governing the price of the product. Well-defined, pure compounds can be used as the lipid source without compromising the economic viability of the process for the production of biosurfactants designated toward specialty applications. For low-cost applications, however, inexpensive feed-stocks are required for the process to be economically competitive. Indeed, the efficient conversion via economically sustainable fermentation processes of nutrient-rich industrial wastes and low-value agricultural by-products into useful, value-added products, such as biosurfactants, is an important strategy for solving a wide range of solid waste disposal problems. Moreover, the successful use of industrial residues for the production of biosurfactants can provide a cost-effective, revenue-generating manner of disposing of these wastes.

With this in mind, a preliminary experiment was conducted to select an appropriate medium for biosurfactant production by *C. lipolytica*. For such, medium compositions with different combinations of animal fat, corn steep liquor, glucose, urea, yeast extract, NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and NaCl were tested. Table 2 displays the surface tension and biomass results obtained after 144 h.

The medium formulated with 5.0% animal fat and 2.5% corn steep liquor yielded the highest reduction in surface tension (from 50 to 28 mN/m) and thus was chosen for further experiments. The data demonstrate that corn steep liquor favoured growth, as growth was poor when fat alone was provided as the carbon source. Daverey and Pakshirajan (2009) found a reduced amount of biomass when using only sugarcane molasses and oil in the medium for biosurfactant production by *C. bombicola*. The authors concluded that this result could mainly be attributed to the fact that the medium was not supplemented with external nitrogen sources (yeast extract and urea). In the present study, corn steep liquor was sufficient to provide the necessary nitrogen source. This study proves that simplified media containing only animal fat and corn steep liquor can very well replace the costly conventional synthetic and other types of media for biosurfactant production by the yeast *C. lipolytica*.

3.2. Biosurfactant emulsification capacity

Biosurfactant production is sometimes detected by measuring emulsification (Makkar and Cameotra, 1998). Although a direct correlation has been found between surface activity and emulsification activity and the emulsion index has been used as a screening method, the ability of a molecule to form a stable emulsion is not always associated with lowered surface tension activity (Cooper and Golgenberg, 1987; Youssef et al., 2004). Table 3 presents the hydrophobic substrates tested for emulsification by the cell-free broth containing the biosurfactant from *C. lipolytica* UCP0988. Petroleum and motor oil were the best substrates, whereas corn and soybean vegetable oil were the poorest. The water-oil emulsions were

compact and remained stable for more than six months at room temperature, suggesting that the addition of the biosurfactant to a remediation process may enhance the availability of the recalcitrant hydrocarbon.

Different oil-degrading microorganisms produce surface active substances and some make a stable oil-in-water emulsion. These microorganisms can be divided into two categories – those that produce a low-molecular-weight surfactant but do not generally make stable emulsions and others that produce polymers that primarily act as emulsion stabilisers but do not generally affect surface tension. A few bacteria and yeasts have both types of properties (Bredhold et al., 1998). The present data suggest that *C. lipolytica* UCP0988 could be included in the latter category of microorganisms, as this strain was able to produce a biosurfactant that can reduce the surface tension and make stable emulsions with motor oil, as will be shown later.

Based on the data obtained, petroleum and motor oil were selected to study the influence of pH, NaCl concentration and temperature on the stability of the emulsions formed, as will be discussed below.

3.3. Biosurfactant stability related to surface tension and emulsification

Table 4 displays the results of the stability of the cell-free broth containing the crude biosurfactant from *C. lipolytica* regarding temperature, pH, salinity and heating time. The stability of a biosurfactant at different pH values is an important issue that can affect its application spectrum. In the present study, surface tension remained unchanged at acid pH, whereas a slight increase in surface tension was observed in the alkaline region. Emulsification activity for the biosurfactant with petroleum was found to be nearly same in the entire pH range tested, whereas maximal emulsification of 90% was observed with motor oil at pH 2.0. In contrast, alkaline pH exerted a negative influence over this substrate. For a

biosurfactant from *C. bombicola* cultivated in sugarcane molasses and soybean oil, Daverey and Pakshirajan (2009) also found that emulsification activity with the soybean oil remained unchanged in the pH range 4 to 8. According to Sarubbo et al. (2007), extremes of pH may transform less surface-active species into more active surfactants/emulsifiers by either the denaturation of proteinaceous components or increased ionisation.

Various amounts of NaCl were mixed completely into the cell-free broth and surface tension was then measured. The biosurfactant maintained the capacity to reduce the surface tension with up to 12% NaCl. The addition of NaCl also favoured the reduction of the cell-free broth surface tension. Sobrinho et al. (2008) found that a biosurfactant produced by *C. sphearica* grown in a medium formulated with distilled water supplemented with ground nut refinery residue and corn steep liquor maintained the surface tension reduction capacity with up to 10% NaCl. The analysis of the influence of different concentrations of NaCl on emulsification activity revealed that emulsions with motor oil remained stable with up to 10% NaCl, with values around 100%, while emulsions with petroleum remained stable up to a 6% concentration of NaCl. According to Desai and Banat (1997), NaCl concentrations above 2% are sufficient to inactivate a synthetic surfactant. The effect of salinity was evaluated to investigate the applicability of the biosurfactant in the bioremediation of contaminated marine environments. As that the normal sea salinity in the world is 3.5%, and some seawater can reached 5.7%, the biosurfactant from *C. lipolytica* UCP0988 could be applied in such environments.

The stability of the biosurfactant was also tested over a wide temperature range. The surface tension of the biosurfactant proved stable during incubation for 1 h at temperatures ranging from 4 to 120 °C, suggesting indicating the usefulness of the biosurfactant in industries in which heating is of paramount importance to achieve sterility. The thermal stability analysis of the cell-free broth was carried out between 4 and 120 °C, revealing that

the emulsions with petroleum remained stable at high temperatures, with a small 10% decrease at 4 °C. The emulsions formed with motor oil, on the other hand, showed a reduction of 20% at 120 °C. Studies conducted by Rufino et al. (2008) showed the loss of emulsifying ability in the biosurfactant from *C. lipolytica* at 100 °C. According to Cirigliano and Carman (1984), the biosurfactant from *C. lipolytica* exhibited a significant 60% reduction in emulsification when the cell-free broth was heated at 100 °C. For the biosurfactant from *C. bombicola*, Daverey and Pakshirajan (2009) found that emulsification activity was more reduced at 20 °C than at higher temperatures (30 to 100 °C).

These findings suggest that the robust characteristics of the crude biosurfactant are very beneficial for applications under extreme conditions of salinity, temperature and pH. Considering the economics of the oil industry and the fact that purification accounts for up to 60% of the total biosurfactant production cost, most biosurfactants would require either whole-cell culture broths or crude preparations. Therefore, the use of the biosurfactant from *C. lipolytica* UCP0988 in its crude form can be considered another advantage of this new biomolecule in the petroleum market.

3.4. Biosurfactant isolation

Different solvent systems were tested to isolate the biosurfactant from *C. lipolytica* UCP0988 after 144 h of cultivation. Acetone extracted 2.2 g/l of crude surfactant, whereas a yield of 0.7 g/l was obtained by the system composed of methanol. Ethyl acetate extracted 1.0 g/l, with a maximal SD of 0.06. The results for extraction of the crude biosurfactant by acetone are similar to those reported for a biosurfactant isolated from *C. lipolytica* cultivated in vegetable oil plus glucose (Sarubbo et al., 2007). In contrast, *C. lipolytica* grown on industrial refinery residue has been found to produce 4.50 g/l of biosurfactant after 144 h (Rufino et al., 2007).

3.5. Biosurfactant characterisation

The crude extract from *C. lipolytica* UCP0988 appeared as a viscous, sticky, oily residue of a brown colour. The biosurfactant was soluble in an aqueous solution and organic solvents, such as chloroform, methanol, hexane, ethylether and ethylacetate.

Agar double diffusion tests revealed the appearance of precipitation lines between the biosurfactant produced by *C. lipolytica* UCP0988 and the selected cationic compound (barium chloride), whereas no lines formed between the biosurfactant and the anionic compound (SDS). Under the experimental conditions of the present study, this very simple test confirmed the anionic character of the biosurfactant produced. Other yeast biosurfactants have been described as anionic using the same method, as described by Sobrinho et al. (2008).

The biosurfactant extracted from the cell-free broth was analysed by thin-layer chromatography (TLC) and visualised with specific reagents. A spot was produced with a retention factor (R_f) of 0.8, which showed positive reactions for sugars with Molish reagents and for lipids with iodine vapours, but negative reactions for amino groups with ninhydrin (Fig. 1). The presence of both glycosyl units and lipid moieties on the same spot suggested that the sample was a glycolipid.

The determination of the biochemical composition of the biosurfactant revealed the presence of 70% lipids and 30% carbohydrates, suggesting its glycolipid nature. Many surfactants produced by yeasts are glycolipids in nature (Pekin and Vardar-Sukan, 2006; Sarubbo et al., 2007; Sobrinho et al., 2008).

3.6. Surface tension and critical micelle concentration of biosurfactant

The surface-active properties of a biosurfactant mainly depend on its ability to lower surface tension, the CMC value and the formation of a stable emulsion. The isolated

biosurfactant effectively reduced the surface tension of water from 70 to 33 mN/m (Fig. 2). Surface tension reduction depends on the specific concentration of surface-active compounds, i.e., the CMC, which is defined as the minimal concentration of a biosurfactant required to yield maximal surface tension reduction of water and initiate micelle formation. Efficient surfactants have very low CMC values, i.e., less surfactant is required to decrease surface tension (Cooper and Zajic, 1980). The CMC of the biosurfactant was computed as 0.08%, which is within the range of CMC values reported for different types of effective yeast biosurfactants (Adameczac and Bednarski, 2000; Gusmão et al., 2010; Luna et al., 2009; Rufino et al., 2007; Sarubbo et al., 2007).

3.7. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant removal

Poorly soluble in water, hydrocarbons remain partitioned in a separate non-aqueous-phase liquid, which may be present as droplets or films on soil particles and, thus, relatively unavailable to microorganisms. Various processes have been developed to remove oil from contaminated areas, among which the mechanical recovery of oil by sorbents is one of the most promising. This process includes the transfer of oil from the contaminated area to a transportable form for temporary storage with the aid of oil sorbents (Choi et al., 1993). However, most of the sorbents used in this process end up in landfills or incinerated, which either produces another source of pollution or increases the oil recovery cost. Thus, there has been increased interest in promoting environmental responsibility through the use of cleaning products other than those that have traditionally been discarded after a single use. Biosurfactants allow the desorption and solubilisation of petroleum hydrocarbons, thus facilitating their assimilation by microbial cells (Banat et al., 2010).

To investigate the application of the biosurfactant produced by *C. lipolytica* UCP0988 in contaminant removal, a preliminary experiment using the cell-free broth (crude

biosurfactant) and solutions of the isolated surfactant at and above the CMC were performed to determine the removal of a hydrocarbon from sand samples (Table 5). High percentages of motor oil removal were observed for all solutions. Sand particle size exerted an influence over the percentage of contaminant removal, with higher percentages were observed with 40/50 mesh sand. This finding is likely due to the high degree of biosurfactant adsorption to the oil, as there is a greater surface area available in fine sand, thus allowing greater contact with the contaminant and facilitating oil removal by the biosurfactant.

The cell-free broth containing the crude biosurfactant was more effective in removing motor oil than the isolated biosurfactant, thereby indicating the possible use of the biosurfactant without purification steps and a consequent reduction in production cost.

Biosurfactants have been investigated for their efficacy in removing hydrocarbons from sand and soil. It has been reported that some biosurfactants have greater removal efficiency than synthetic surfactants (Kuyukina et al., 2005; Shin and Kim, 2004).

Promising results have been obtained by biosurfactants produced from *Candida* species. The biosurfactant from *C. antarctica* removed about 50% of the oil adsorbed to sand (Adamczak and Bednarski, 2000), while the biosurfactant isolated from *C. glabrata* removed 84% of motor oil (Luna et al., 2009). The biosurfactant produced by *C. sphaerica* cultivated in low-cost medium removed 65% of the motor oil adsorbed to beach sand (Sobrinho et al., 2008). With a cell-free broth containing a biosurfactant produced by *C. tropicalis*, Batista et al. (2009) found an 80% recovery rate of residual crude oil adsorbed to sand. Coimbra et al. (2009) demonstrated the considerable ability of biosurfactants produced by *C. guilliermondii* and *C. lipolytica* in removing motor oil and petroleum adsorbed to sand.

The removal efficiency of crude oil from contaminated sea sand has been investigated using a remediation agent containing a biosurfactant, which was prepared by spraying a sterilised culture broth of the JE-1058 strain of *Gordonia* sp.; the removal rate reached 80% at

40 mg/l of the JE1058BS-seawater suspension, whereas oil removal efficiency was only 15% when seawater alone was used (Saeki et al., 2009). Abu-Ruwaida et al. (1991) and Kuyukina et al. (2005) report a removal rate of 86% of crude oil adsorbed to sand using biosurfactants from *Rhodococcus*. Biosurfactants produced by *Bacillus* species cultivated in residues of molasses and cheese whey removed about 30% of the oil contained in a packed column (Joshi et al., 2008).

3.8. Application of biosurfactant in hydrophobic contaminant spreading

The cell-free broth containing the biosurfactant produced by *C. lipolytica* UCP0988 achieved high oil spreading efficiency (54% oil displacement). This was more effective than the aqueous solutions of the isolated biosurfactant at 0.04, which displaced 47% of the oil. The biosurfactant solution at the CMC (0.08%) displaced 60% of the oil and the solution at 0.16% (2 x CMC) displaced 74% of the oil. According to Sitohy et al. (2010) the biosurfactant produced by *B. subtilis* NRRL B-94C (0.1%) achieved an oil spreading efficiency of 57%, while the well-known industrial surfactant Triton X-100 displaced 80% of the oil at the same concentration.

3.9. Cleaning test

The cell-free broth from *C. lipolytica* UCP0988 and the aqueous solutions of the isolated biosurfactant at 0.04, 0.08 and 0.16% were effective at recovering up to 100% motor oil from the walls of the beakers. These results suggest the suitability of this biosurfactant in the removal of sticky crude oil from the walls of containers.

In the present study, a low-cost fermentative medium based on animal fat and corn steep liquor was successfully evaluated with regard to biosurfactant production by the yeast *C. lipolytica*. Costly glucose and nitrogen sources (yeast extract and urea) were replaced to

reduce the cost of the production medium. The biosurfactant showed tensoactive and emulsification properties. The stability and activity of the emulsion formed with various oils were tested. The biosurfactant also retained its activity and stability at extreme conditions of pH and temperature as well as under high NaCl concentrations. Overall, the results demonstrated that this biosurfactant has significant potential for a future application in the oil industry.

Acknowledgments

This study was funded by the Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE), the Research and Development Program from National Agency of Electrical Energy (ANEEL) and Thermoelectric Company of Pernambuco (TERMOPE), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES). The authors are grateful to the laboratories of the Centre for Sciences and Technology of the *Universidade Católica de Pernambuco*, Brazil.

References

- Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S., Salem, A., Kadri, M., 1991. Isolation of biosurfactant-producing bacteria—product characterization and evaluation. *Acta Biotechnol.* 2, 315–324.
- Adamczak, M., Bednarski, W., 2000. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnol. Lett.* 22, 313–316.
- Akhtar, M., Lentz, M.J., Banchette, R.A., Kirk, T.K., 1997. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. *TAPPI J.* 80, 161-164.

- Amaral, P.F.F., da Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Coelho, M.A.Z., Marrucho, I.M., Coutinho, J.A.P., 2006. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* 41, 1894–1898.
- Amézcuá-Veja, C., Poggi-Varaldo, H.M., Esparza-García, F., Ríos-Leal, E., Rodríguez-Vázquez, R., 2007. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of cultura media. *Biores. Technol.*, 98, 237–240.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 1982. NBR8492: tijolo maciço de solo-cimento: determinação da resistência à compressão e da absorção de água, método de ensaio, Rio de Janeiro.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 427–444.
- Batista, R.M., Rufino, R.D., Luna, J.M., de Souza, J.E.G, Sarubbo, L.A., 2009. Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. *Water Environ. Res.* 82, 418 - 425, 2009.
- Bredholdt, H., Josefén, K., Vatland, A., Bruheln, P., Eimhjellen, K., 1998. Emulsification of crude oil by an alkane-oxidizing *Rhodococcus* species isolated from seawater. *Can. J. Microbiol.* 44, 330-340.
- Buchanan, S., Gaylinn, S., 1992. CRB Commodity Year Book. Knight-Ridder Financial Publishing, New York.
- Cardinal, E.V., Hedrick, L.R., 1948. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *J. Biol. Chem.* 172, 609-612.

- Choi, H.Y., Kwon, H.J., Moreau, J.P., 1993. Cotton nonwovens as oil spill clean-up sorbents. *Textile Res. J.* 63, 211–218.
- Cirigliano, M.C., Carman, G.M., 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 747–750.
- Coimbra, C.D., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., 2009. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation with the production of biosurfactants for environmental applications. *Curr. Microbiol.* 58, 245–251.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 224-229.
- Cooper, D.G., Silver, R.S., Boyle, J.P., 1975. Semicommercial studies of a petroprotein process based on n-paraffins, in: Tannenbaum, S.R., Wang, D.I.C. (Eds.), *Single Cell Protein II*, MIT Press, Cambridge, MA, pp. 454-66.
- Cooper, D.G., Zajic, J.E., 1980. Surface-active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 26, 229-253.
- Daniel, H-J., Otto, R.T., Reuss, M., Syldatk, C., 1998. Sophorolipid production with high yields on whey concentrate and rapeseed oil without consumption of lactose. *Biotechnol Lett.* 20, 805–807.
- Das, K., Mukherjee, A.K., 2007. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochem.* 42, 1191–1199.
- Daverey, A., Pakshirajan, K., 2009. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. *Food Res. Int.* 42, 499-504.
- Deshpande, M., Daniels, L., 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Biores. Technol.* 54, 143-150.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Felse, P.A., Shah, V., Chan, J., Rao, K.J., Gross, R.A., 2007. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 316-323.
- Gusmão, C.A.B., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., 2010. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 1683–1692.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M., Manresa, A., 2000.. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 379–387.
- Ilori, M.O., Amobi, C.J., Odocha, A.C., 2005. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. Isolated from a tropical environment. *Chemosphere* 61, 985-992.
- Joshi, S., Bharuch, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A.J., 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Biores. Technol.* 99, 195–199.
- Kajs, T.M., Vanderzant, C.V., 1980. Batch-scale utilization studies of tallow by food yeasts. *Dev. Ind. Microbiol.* 21, 481-8.
- Kitamoto, D., Isoda, H., Nakahara, T., 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 187-201.

- Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Makarov, S.O., Litvinenko, L.V., Cunningham, C.J., Philp, J.C., 2005. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environ. Int.* 31, 155–161.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Albuquerque, C.D.C., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2011. Economic optimized medium for tenso-active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2463-2476.
- Luna, J.M., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2009. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52, 785-793.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 1998. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 48-52.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 428-434.
- Manocha, M.S., San-Blas, G., Centeno, S., 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasilienses*: possible correlation with virulence of different strains. *J. Gen. Microbiol.* 117, 147–54.
- Meylheuc, T., Van Oss, C.J., Bellon-Fontaine, M.N., 2001. Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *J. Appl. Microbiol.* 91, 822-832.
- Ohno, A., Ano, T., Shoda, N., 1993. Production of antifungal peptide antibiotics iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 23-27.

- Pareilleux, A., 1979. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant: effects on respiratory activity and growth. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8, 91-101.
- Pekin, G., Vardar-Sukan, F., 2006. Production of sophorolipids using the yeast *Candida bombicola* ATTC22214 for the applications in the food industry. J. Eng. Nat. Sci. 2, 109–116.
- Pruthi, V., Cameotra, S.S., 2000. Novel sucrose lipid produced by *Serratia marcescens* and its application in enhanced oil recovery. J. Surf. Det. 3, 533-537.
- Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Benicio, B.N., Campos-Takaki, G.M., 2008. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 907-914.
- Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2007. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using Industrial residue as substrate. World J. Microbiol. Biotechnol. 23, 729–734.
- Saeki, H., Sasaki, K.M., Komatsu, O., Miura, A., Matsuda, H., 2009. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. Biores. Technol. 100, 572-577.
- Santos, A.S., Sampaio, A.P.W., Vasquez, G.S., Anna, L.M.S., Pereira Jr., N., Freire, D.M.G., 2002. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Biochem. Biotechnol. 98-100, 1025-1035.
- Sarubbo, L.A., Farias, C.B.B., Campos-Takaki, G.M., 2007. Co- utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. Curr. Microbiol. 54, 68–73.

- Sarubbo, L.A., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M., 2006. Production and stability studies of the bioemulsifer obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP1002. *Electron. J Biotechnol.* 9, 400–406.
- Shin, K.H., Kim, K.W., 2004. A biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of phenanthrene and diesel in sand. *Environ. Geochem. Health* 26, 5–11.
- Sitohy, M.Z., Rashad, M.M., Sharobeem, S.F., Mahmoud, A.E., Nooman, A.S., Al Kashef, M.U., 2010. Bioconversion of soy processing waste for production of surfactants. *African J. Microbiol. Res.* 4, 2811-2821.
- Sobrinho, H.B.S., Rufino, R.D., Luna, J.M., Salgueiro, A.A., Campos-Takaki, G.M., Leite, L.F.C., Sarubbo, L.A., 2008. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochem.* 43, 912-917.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Zerkowski, J.A., Foglia, T.A., 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol. Lett.* 29, 1341–1347.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Hnapp, R.M., Mcinerney, M.J., 2004. Comparison of methods to detect biosurfactants production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 56, 339-347.

Legends to figures

Fig. 1. Biosurfactant components detected by thin layer chromatography; the samples were applied in 20 μ L volumes in TLC plates and developed with a CHCl_3 :MeOH:H₃COOH (65:15:2, v/v) solvent system

Fig. 2. Surface tension versus concentration of biosurfactant isolated from *C. lipolytica* cultivated in distilled water supplemented with 5.0% animal fat and 2.5% corn steep liquor for 144 h at 200 rpm and 28 °C

Tables**Table 1**

Composition of fatty acids in animal fat

Fatty acid	%
Miristic	6.03%
Palmitic	26.40%
Stearic	43.41%
Oleic	24.16%

Table 2

Surface tension and biomass values obtained after *C. lipolytica* cultivation for 144 h at 200 rpm and 28 °C

Production media	Surface tension (mN/m)	Biomass (g/l)
5.0% animal fat, 2.5% glucose, 2.5% corn steep liquor	41.14	0.90
2.5% animal fat, 2.5% glucose, 2.5% corn steep liquor	39.06	0.70
5.0% animal fat, 2.5% corn steep liquor	27.75	1.18
5.0% animal fat, 0.15% urea, 0.1% K ₂ HPO ₄ , 0.01% NaCl	36.33	0.01
5.0% animal fat, 0.15% urea, 0.10% K ₂ HPO ₄ , 0.01% NaCl, 0.1% yeast extract	56.36	0.14
5.0% animal fat, 2.5% corn steep liquor, 0.15% urea, 0.1% K ₂ HPO ₄ , 0.01% NaCl	40.76	0.87
2.5% animal fat, 2.5% glucose, 2.5% corn steep liquor, 0.15% urea, 0.1% K ₂ HPO ₄ , 0.01% NaCl	43.17	1.18
2.5% animal fat, 2.5% glucose, 0.15% urea, 0.10% K ₂ HPO ₄ , 0.40% corn steep liquor, 0.01% NaCl	47.68	0.45
5.0% animal fat, 2.5% glucose, 0.15% urea, 0.10% K ₂ HPO ₄ , 0.40% corn steep liquor, 0.01% NaCl	51.38	0.80
2.5% animal fat, 5.0% glucose, 0.40% corn steep liquor, 0.15% urea, 0.10% K ₂ HPO ₄ , 0.01% NaCl	47.76	0.40
5.0% animal fat, 0.30% NaNO ₃ , 0.03% MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.03% KH ₂ PO ₄ , 0.10% yeast extract	60.24	0.60
5.0% animal fat, 2.5% glucose, 0.3% NaNO ₃ , 0.03%	35.66	0.18

MgSO₄.7H₂O, 0.03% KH₂PO₄, 0.1% yeast extract

5.0% animal fat, 5% glucose, 0.10% yeast extract, 0.15%

0.16

urea

Table 3

Emulsification index (EI) of hydrophobic substrates by cell-free broth containing biosurfactant from *C. lipolytica* cultivated in distilled water supplemented with 5.0% animal fat and 2.5% corn steep liquor for 144 h at 200 rpm and 28 °C

Substrate	EI (%)
Petroleum	100.0±1.30
Diesel	54.41±2.80
Benzene	56.25±2.40
Hexane	58.82±2.02
Motor oil	94.11±1.45
Soybean oil	47.05±1.25
Corn oil	47.05±1.89
Rice oil	50.00±2.34
Cotton seed oil	48.50±1.15
Sunflower oil	47.05±2.77

Table 4

Influences of salt concentration, temperature and pH on surface-tension-reducing activity and emulsifying activity of cell-free broth containing biosurfactant from *C. lipolytica* cultivated in distilled water supplemented with 5.0% animal fat and 2.5% corn steep liquor for 144 h at 200 rpm and 28 °C

NaCl (%)	Surface tension (mN/m)	EI (%)^a	EI (%)^b
0.0	27.75±0.31	94.11±1.45	100.00±1.30
2.0	26.90±0.14	93.33±4.02	100.00±1.10
4.0	26.50±0.20	92.85±2.87	100.00±1.09
6.0	26.80±0.17	92.85±2.96	58.82±2.07
8.0	26.00±0.10	92.30±2.58	73.33±1.93
10.0	25.70±0.20	92.85±3.88	68.75±4.01
12.0	25.70±0.24	7.14±2.53	73.33±2.17
Temperature (°C)	Surface tension (mN/m)	EI (%)^a	EI (%)^b
4	28.97±0.25	93.33±4.00	90.00±1.07
27	27.75±0.31	85.71±3.21	100.0±1.03
70	29.31±0.26	78.57±3.98	100.1±1.70
120	30.07±0.41	73.33±2.26	100.1±1.10
pH	Surface tension (mN/m)	EI (%)^a	EI (%)^b
2	33.8±0.15	86.66±2.01	100.0±1.12
4	33.7±0.10	76.92±3.00	100.0±1.00
6	28.3±0.17	80.00±1.09	100.0±1.30
8	27.7±0.22	80.00±1.03	100.0±1.01
10	31.2±0.31	80.00±1.51	100.0±1.11

12	35.2±0.12	14.30±1.25	100.0±1.03
----	-----------	------------	------------

^a Emulsification index of motor oil

^b Emulsification index of petroleum

Table 5

Removal of motor oil adsorbed in standard sand samples by biosurfactant produced by *C. lipolytica* UCP0988 cultivated in distilled water supplemented with 5.0% animal fat and 2.5% corn steep liquor for 144 h at 200 rpm and 28 °C and by distilled water (control)

Removal agent	Motor oil removal from sand (%)	
	40/50 mesh (0.3- 0.42mm)	20/30 mesh (0.6- 0.85mm)
Crude biosurfactant (cell-free broth)	92.30±0.3	70.50±0.3
Isolated biosurfactant solution at 0.08%	70.70±0.4	63.00±0.2
Isolated biosurfactant solution at 2.0%	69.32±0.5	64.01±0.4
Control (distilled water)	49.00±0.2	45.20±0.3

Figures



Fig. 1

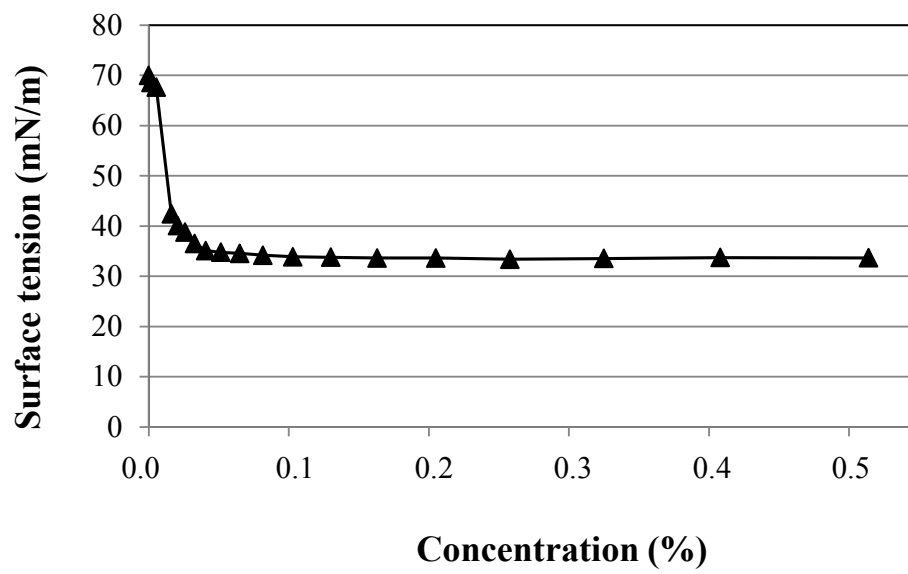


Fig. 2

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados com a linhagem de *Candida lipolytica* UCP 0988 permitem as seguintes conclusões:

- a utilização de um meio de formulado com resíduos agroindustriais mostra-se promissora para a produção de biossurfactante com aplicação industrial;
- a *C. lipolytica* apresenta grande potencial como micro-organismo produtor de compostos com atividade de emulsificação e atividade surfactante;
- o biossurfactante bruto não apresenta alterações significativas quando submetido a diferentes temperaturas, pH's e concentrações de NaCl;
- o biossurfactante foi caracterizado como um glicolípido de natureza aniônica;
- o biossurfactante bruto foi eficaz na recuperação de óleo de motor a partir de amostras de areia;
- o biossurfactante bruto foi eficaz no deslocamento de óleo de motor disperso em água do mar;
- o biossurfactante isolado foi eficaz na recuperação de óleo de motor aderido a superfície sólida;
- o biossurfactante apresentou potencial de aplicação na indústria do petróleo, especialmente em relação à recuperação avançada de petróleo, limpeza de tanques e biorremediação de derrames no mar e no solo.

ANEXOS

Recife 28-08-2012

Journal of Petroleum Science and Engineering**Editor-in-Chief**
Birol Dindoruk

Dear Editor,

We would like to submit for appreciation the manuscript **“Evaluation of biosurfactant production by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor”**.

This is a new contribution and the subject of the article is also within the scope of the journal. This work describes the use of industrial wastes for the production of a biosurfactant by the yeast *Candida lipolytica*. The properties of the biosurfactant produced and the effect of environmental factors on emulsification activity and stability are reported. The use of the product obtained as a potential biosurfactant for application as an environmental remediation agent is also described. The topic is current, as biosurfactants become increasingly more attractive cost-wise as the price of crude oil increases.

I inform that all authors agree to submit the work and that the present manuscript is not being submitted to another journal.

Suggestions of possible reviewers are listed below.

I will hope that the present version of the manuscript is suitable for publication in the Journal of Petroleum Science and Engineering.

Yours sincerely,

Prof. Dr. Leonie A. Sarubbo

My address:

Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
Centro de Ciências e Tecnologia
Rua do Príncipe , n. 526, - Boa Vista.
CEP: 50050-900 - Recife/PE – Brazil
Phone: 55-81-2119 4084 - Fax: 55-81 2119 4004 E-mail: leonie@unicap.br

SUGGESTIONS OF POSSIBLE REVIEWERS

Dr. Attilio Converti - specialist in Microbiology

Department of Chemical and Process Engineering
University of Genova, Italy
e-mail: converti@unige.it

Dr. Adalberto Pessoa Jr – specialist in chemical processes
Biochemical Department
São Paulo University (USP)
São Paulo – Brazil
e-mail: peessoajr@pq.cnpq.br

Dr. Elias Basile Tambourgi – specialist in Biotechnology
Chemical Engineering Department
State University of Campinas (UNICAMP)
Campinas- Sao Paulo -Brazil
e-mail: eliastam@feq.unicamp.br

Dr. Ana Lúcia Figueiredo Porto – specialist in Biotechnology
Animal Physiology Department
Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE)
Recife, PE - Brasil
e-mail: analuporto@yahoo.com.br

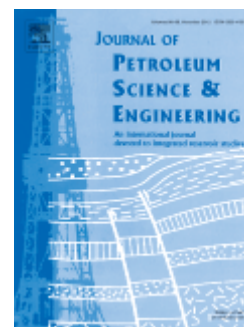
Journal of Petroleum Science and Engineering

The objective of the *Journal of Petroleum Science and Engineering* is to bridge the gap between the **engineering**, the **geology** and the science of **petroleum** and **natural gas** by publishing explicitly written...

[View full aims and scope](#)

Editor-in-Chief: [Biol Dindoruk](#)

[View full editorial board](#)



The objective of the *Journal of Petroleum Science and Engineering* is to bridge the gap between the engineering, the geology and the science of petroleum and natural gas by publishing explicitly written articles intelligible to scientists and engineers working in any field of petroleum engineering, natural gas engineering and petroleum (natural gas) geology. An attempt is made in all issues to balance the subject matter and to appeal to a broad readership. The *Journal of Petroleum Science and Engineering* covers the fields of petroleum (and natural gas) exploration, production and flow in its broadest possible sense. Topics include: origin and accumulation of petroleum (natural gas); petroleum (natural gas) geochemistry; reservoir engineering; rock mechanics/petrophysics; well logging, testing and evaluation; mathematical modelling; enhanced oil and gas recovery; petroleum (natural gas) geology; compaction/diagenesis; petroleum (natural gas) economics; drilling and drilling fluids; thermodynamics and phase behavior, fluid mechanics in porous media and multi-phase flow; reservoir simulation; production engineering; formation evaluation; exploration methods. Papers will be published with the minimum of publication delay. Research articles, case histories, field process reports, short communications, book reviews, symposia proceedings and review articles are accepted. Generally, review articles on some topic of special current interest will be published.

Types of paper

The author should specify a category designation for the manuscript (full length article, review article, short communication, etc.). Once the submission files are uploaded, the system automatically generates an electronic (PDF) manuscript, which is then used for reviewing. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail. In the case of Special Issues, manuscripts should be submitted to the Guest Editor(s). Authors should ensure that they submit manuscripts and meet any additional requirements in line with deadlines set by the Guest Editor(s) to ensure that the entire Special Issue can be published in a timely fashion.

Contact details for submission

Journal of Petroleum Science and Engineering uses an online, electronic submission system. By accessing the website <http://ees.elsevier.com/petrol> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript to Elsevier Editorial System, authors need to provide an electronic version of their manuscript. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of*

the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside

the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of \$3000 applies (for further information on open access see <http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options>). Please note that you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/petrol>.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not count more than 500 words

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Provide 4 - 6 keywords taken from the AGI GeoiRef Thesaurus and place them beneath the abstract

Classification codes

Please identify your manuscript's areas of interest and specialization by selecting one or more classifications from the list supplied on-line during the submission.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only.

For further information on the preparation of electronic artwork, please see

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

The reference list should be in alphabetical order

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa).

Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/0016-7037(95)00105-9. Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for

downloading from your online article on ScienceDirect. For more information see <http://www.elsevier.com/googlemaps>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:

<http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.