



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

Selma Neide Rodrigues Lopes Silva

**GLICEROL COMO SUBSTRATO PARA A
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR
Pseudomonas aeruginosa UCP0992**

**Recife
2009**

Selma Neide Rodrigues Lopes Silva

**GLICEROL COMO SUBSTRATO PARA A
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR
Pseudomonas aeruginosa UCP0992**

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

RECIFE

2009

Silva, S.N.R.L.

Glicerol como substrato para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 . Recife, 2009. 135p.

Dissertação – Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. 1. Biossurfactante 2. *Pseudomonas aeruginosa* 3. Glicerol.

Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.
Centro de Ciências e Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE

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

Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro
Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE

DEDICATÓRIA

A minha querida avó Áurea (*in memoriam*) pelo seu amor materno, fundamental na minha criação. Aos meus queridos pais Sebastião e Eusileide pelo dom da vida. Ao meu tio Eudorico e sua esposa Tercila, que também me adotaram como filha. Aos meus tesouros e filhos Josué Mauro e Áurea Olivia, e ao maior responsável por transformar esse sonho em realidade, o meu amado esposo Josué.

AGRADECIMENTOS

À Deus, responsável maior por vitórias como essa.

À Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo não somente pelo seu papel de grande pesquisadora e orientadora, mas, sobretudo, pela pessoa humana e maravilhosa que jamais mediu esforços para me auxiliar nessa dissertação.

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki pelo incentivo inicial e por ter sido o elo de ligação até a professora Dra. Leonie Asfora Sarubbo, responsável direta pela superação de todos os meus desafios na vida acadêmica.

À Coordenadora do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro, pela qual tenho grande estima e admiração.

Ao companheiro e amigo Charles Bronzo Barbosa Farias por está presente durante a minha pesquisa. Em especial, pela compreensão e disponibilidade de me auxiliar nos momentos mais necessários. Estendo ainda meu sentimento de gratidão aos meus colegas do grupo de pesquisa em biossurfactantes, Raquel Diniz Rufino, Ranielly Monteiro Batista, Juliana Moura de Luna, Aline Ferreira da Silva, Danyelle Khadydja Félix dos Santos, Camila de Figueiredo Albuquerque e Humberto Bezerra de Souza Sobrinho, por ser uma família especial, como exemplo de amizade.

À equipe de pesquisa que faz parte do núcleo de Pesquisas em Ciências ambientais – NPCIAMB pela colaboração.

A toda minha turma do mestrado pelo período de convivência e aprendizado, em especial Adamares Marques pelo companheirismo e amizade.

Aos técnicos Severino Humberto de Almeida, Francisco José de Santana e Francisco das Chagas Souza dos Santos pelo apoio nos experimentos.

Às secretárias Sônia Maria de Souza, do NPCIAMB, e Maria Edna Cunha e Maria Dilma Silva de Santana do Centro de Ciências e Tecnologia, pela dedicação e presteza em seus serviços.

Aos professores do Mestrado Desenvolvimento de Processos Ambientais, pelo exemplo de profissionalismo e competência.

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

A todos os meus familiares que de uma forma direta ou indireta, apesar da distância contribuíram ao longo dessa caminhada.

SUMÁRIO

	página
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE	xii
TABELAS.....	
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO	18
1.....	
1.1 Introdução.....	18
1.2	21
Objetivos.....	
1.2.1 Objetivo Geral.....	21
1.2.2 Objetivos	21
Específicos.....	
1.3 Revisão de Literatura.....	22
1.3.1 Surfactantes.....	22
1.3.2 Biossurfactantes.....	24
1.3.2.1 Classificação.....	25
1.3.2.2 Microrganismos Produtores.....	26
1.3.2.2.1 Produção de Raminolípeios por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
1.3.2.3 Propriedades.....	33
1.3.2.4 Aplicações.....	35
1.3.2.4.1 Aplicações de Biossurfactantes na Biorremediação.....	35
1.3.2.4.2 Aplicações de Biossurfactantes na Limpeza de Reservatórios de Óleo.....	36
1.3.2.4.3 Aplicações de Biossurfactantes na Recuperação Avançada de Petróleo (MEOR).....	37
1.3.2.4.4 Aplicações de Biossurfactantes na Indústria de Alimentos.....	37
1.3.2.4.5 Aplicações de Biossurfactantes na Indústria Farmacêutica.....	38
1.3.2.4.6 Aplicações de Biossurfactantes na Mineração.....	39
1.3.2.4.7 Aplicações de Biossurfactantes na Agricultura.....	39
1.3.2.4.8 Aplicações de Biossurfactantes na Medicina.....	39
1.3.2.4.9 Outras Aplicações.....	40
1.3.2.5 Perspectivas de Utilização.....	41
1.3.2.5.1 Desenvolvimento de Bioprocessos para a Produção e Recuperação de Biossurfactantes.....	42
1.3.2.5.2 Glicerol como Alternativa Econômica Promissora para a Produção de Biossurfactante.....	45
1.4 Referências Bibliográficas.....	48
CAPÍTULO	59

2.....	
Utilização de glicerol como substrato para a produção de biossurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCP0092.....	59
2.1 Resumo.....	60
2.2 Abstract.....	61
2.3 Introdução.....	62
2.4 Material e métodos.....	64
2.4.1 Microrganismo.....	64
2.4.2 Meios de cultura.....	64
2.4.3 Preparação do inóculo.....	65
2.4.4 Produção do biossurfactante.....	65
2.4.5 Influência da concentração da fonte de carbono na produção do biossurfactante.....	65
2.4.6 Influência do tipo da fonte de nitrogênio na produção do biossurfactante.....	65
2.4.7 Influência da concentração da fonte de nitrogênio na produção do biossurfactante.....	66
2.4.8 Influência das condições de cultivo na produção do biossurfactante.....	66
2.4.9 Determinação das cinéticas de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante.....	66
2.4.10 Determinação da biomassa.....	67
2.4.11 Consumo de glicerol.....	67
2.4.12 Quantificação de raminose.....	67
2.4.13 Determinação da atividade de emulsificação.....	68
2.4.14 Determinação das tensões superficial e interfacial e da concentração micelar crítica (CMC).....	68
2.4.15 Avaliação da estabilidade do biossurfactante (efeitos do pH, da adição de NaCl, do tempo sob aquecimento e da temperatura).....	69
2.4.16 Isolamento do biossurfactante.....	69
2.4.17 Caracterização da mistura dos raminolipídeos por cromatografia em camada delgada.....	70
2.4.18 Determinação da composição em ácidos graxos do biossurfactante.....	70
2.4.19 Determinação da carga iônica do biossurfactante.....	71
2.4.20 Determinação da toxicidade do biossurfactante.....	71
2.4.21 Aplicação do biossurfactante na remoção de poluentes hidrofóbicos adsorvidos em areia através de ensaio cinético.....	73
2.4.22 Análises estatísticas.....	73
2.5 Resultados e Discussão.....	73

2.5.1 <i>Influência da concentração de glicerol na produção do biossurfactante</i>	74
2.5.2 <i>Influência da fonte de nitrogênio na produção do biossurfactante</i>	75
2.5.3 <i>Influência da concentração da fonte de nitrogênio na produção do biossurfactante</i>	77
2.5.4 <i>Influência das condições de cultivo na produção do biossurfactante</i>	78
2.5.5 <i>Cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante na condição selecionada</i>	80
2.5.6 <i>Atividade de emulsificação</i>	84
2.5.7 <i>Estabilidade do biossurfactante relacionada à manutenção da tensão superficial e à capacidade de emulsificação</i>	87
2.5.8 <i>Caracterização do biossurfactante</i>	91
2.5.9 <i>Tensão superficial, tensão interfacial e concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante</i>	93
2.5.10 <i>Toxicidade do biossurfactante</i>	96
2.5.11 <i>Aplicação do biossurfactante na remoção de poluentes hidrofóbicos adsorvidos em areia através de ensaio cinético</i>	97
2.6 Conclusões	100
2.7 Agradecimentos	101
2.8 Referências	101
CONCLUSÕES GERAIS	119
ANEXOS	121

LISTA DE FIGURAS

	página
CAPÍTULO 1	
Figura 1 – Monômero surfactante.....	22
Figura 2 - Surfactantes tendem a se associar em interfaces ou em micelas. (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica atacada a cadeia de hidrocarboneto; (b) micela circular; (c) micela cilíndrica; (d) camada micelar e (e) representação de uma vesícula.....	23
Figura 3 - Formação de micelas na Concentração Micelar Crítica (CMC).....	23
Figura 4 - Estruturas típicas de biossurfactantes glicolipídicos.....	26
Figura 5 - Diferentes tipos de raminolipídeos produzidos por <i>P. aeruginosa</i>	30
Figura 6 – Características e estrutura do glicerol.....	47
CAPÍTULO 2	
Figura 1 - Curvas de crescimento, pH, tensão superficial, rendimento em biossurfactante isolado e emulsificação do hexadecano de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3,0 % de glicerol e 0,6% de NaNO ₃ a 28°C durante 120 horas a 200 rpm.....	116
Figura 2 - Componentes raminolipídicos detectados por Cromatografia em Camada Delgada. Amostras aplicadas em volumes de 20 µL em placas de sílica gel desenvolvidas com o sistema clorofórmio:metanol:ácido acético (65:15:2, v/v) como eluente. As placas foram reveladas com vapores de iodo e com o Reagente de Molish, seguido de aquecimento a 110 °C por 10 minutos.....	117
Figura 3 - Concentração Micelar Crítica do biossurfactante isolado de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol durante 96 horas.....	118

LISTA DE TABELAS

	página
CAPÍTULO 1	
Tabela 1 – Exemplos de Concentração Micelar Crítica de biossurfactantes e surfactantes químicos.....	25
Tabela 2 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.....	28
Tabela 3 - Composição de misturas de raminolípídeos produzidas por diferentes amostras de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992.....	31
Tabela 4 – Aplicações industriais dos biossurfactantes.....	41
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos métodos de recuperação de biossurfactantes e suas vantagens relativas.....	44
CAPÍTULO 2	
Tabela 1 - Influência da concentração do glicerol na redução da tensão superficial e no rendimento em biossurfactante isolado de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCP0992 cultivada em meio mineral durante 120 horas.....	106
Tabela 2 - Influência da fonte de nitrogênio, na concentração de 0,2%, na redução da tensão superficial e no rendimento em biossurfactante isolado de <i>P. aeruginosa</i> cultivada em meio mineral durante 120 horas.....	107
Tabela 3 - Influência da concentração de NaNO ₃ na redução da tensão superficial e no rendimento em biossurfactante isolado de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992 cultivada em meio mineral durante 120 horas.....	108
Tabela 4 - Emulsificação de substratos hidrofóbicos pelo líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3 % de glicerol durante 96 horas.....	109
Tabela 5 - Influência da adição de NaCl na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3 % de glicerol durante 96 horas.....	110
Tabela 6 - Influência da temperatura na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol durante 96 horas.....	111

Tabela 7 - Influência do pH na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol durante 96 horas.....	112
Tabela 8 - Influência do tempo de aquecimento a 90°C na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol durante 96 horas.....	113
Tabela 9 - Percentuais de remoção de petróleo e diesel adsorvidos em areia fina e grossa pelo líquido metabólico livre de células de <i>P. aeruginosa</i> UCP0992 (biossurfactante bruto), por soluções do biossurfactante isolado e por água destilada (controle).....	114

RESUMO

Os surfactantes são poderosos agentes anfipáticos com aplicação nas indústrias petrolífera, alimentícia e farmacêutica, entre outras. Vários surfactantes quimicamente sintetizados são hoje utilizados, embora o desenvolvimento de produtos biodegradáveis e menos tóxicos, os chamados biossurfactantes, agentes obtidos por via microbiológica, torna-se uma estratégia importante na obtenção de componentes compatíveis com o meio ambiente. Muitos biossurfactantes têm sido produzidos, embora poucos sejam comercializados em virtude do alto custo de produção envolvido na obtenção desses compostos, principalmente no que se refere à utilização de substratos caros e aos processos de purificação. Neste sentido, a utilização de glicerol, substrato gerado em grandes quantidades a custos cada vez mais reduzidos em função da crescente demanda mundial de biodiesel, aliada a habilidade da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 em produzir biossurfactantes, foi avaliada para a produção de um biossurfactante com vistas à aplicação na área ambiental. Inicialmente, a influência da concentração do glicerol (2-7%), do tipo (NaNO_3 , NH_4NO_3 , uréia, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, peptona, extrato de levedura e milhocina) e da concentração (0,05-0,6%) da fonte de nitrogênio e das condições de cultivo (temperatura – 28 e 37°C, aeração – 60, 80 e 90% e agitação – 150 e 200 rpm) foram avaliadas na produção do biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. A cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante foi descrita para o meio mineral suplementado com 3% de glicerol e 0,6% de NaNO_3 , a 28 °C durante 120 horas sob agitação de 200 rpm. Uma relação paralela entre o crescimento do microrganismo, o consumo de glicerol, a obtenção do biossurfactante e a emulsificação do hexadecano foi observada, indicando uma produção associada ao crescimento. O rendimento em biossurfactante isolado após 96 horas foi de 8,0 g/L, para uma biomassa de 4,0 g/L. A tensão superficial do meio foi reduzida de 56 mN/m para 27,4 mN/m e a emulsificação do hexadecano permaneceu inalterada a partir das 72 horas, com percentual de 75%. O biossurfactante apresentou CMC (Concentração Micelar Crítica) de 700 mg/L, tensão interfacial contra o hexadecano de 2 mN/m, estabilidade térmica (4-120°C) e estabilidade a diferentes pH (4-12) relacionadas à capacidade de redução da tensão superficial e à atividade de emulsificação de óleos vegetais e diesel, além de tolerância a concentrações salinas (2-10%). O biossurfactante demonstrou pequenas variações na tensão superficial e na capacidade de emulsificação quando submetido a 90°C durante duas horas. O biossurfactante foi caracterizado como um grupo de

raminolípidos de natureza aniônica. O biossurfactante bruto não apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e ao repolho (*Brassica oleracea*) nas condições testadas, enquanto que o biossurfactante isolado apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo na CMC. O potencial de aplicação do biossurfactante na remoção de diesel foi demonstrado pelos elevados percentuais de remoção (85%). Os resultados promissores obtidos nesse trabalho indicam a viabilidade de produção de biossurfactantes potentes a partir de glicerol como fonte de carbono.

Palavras-chave: Biossurfactantes; glicerol; *Pseudomonas aeruginosa*; Resíduos industriais; Tensão superficial; Emulsificação; Toxicidade.

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic agents with application in different industries, such as the petroleum, food and pharmaceutical. Many kinds of chemical surfactants are being used nowadays, although the development of alternative products, with biodegradable nature and lower toxicity, as the so called biosurfactants, metabolites from microorganisms, is a sound strategy for the development of compounds with ecological acceptability and for the knowledge of specific properties and application of these compounds. Different biosurfactants have been produced, but few are being commercialised due the high production costs regarded the utilisation of substrates and purification techniques. Thus, the purpose of this work is to combine the glycerol generated from biodiesel at low cost with the ability of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 to produce a biosurfactant with ability to remove a hydrophobic pollutant from the petroleum industry. First, the influence of glycerol concentration (2-7%), of type (NaNO₃, NH₄NO₃, urea, (NH₄)₂SO₄, peptone, yeast extract and corn steep liquor), and concentration (0,05-0,6%) of the nitrogen source and of the cultivation conditions (temperature – 28 and 37°C, aeration – 60, 80 and 90% and agitation – 150 and 200 rpm) was studied for biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. The kinetic of growth and production of the biosurfactant has been described for the medium supplemented with 3% glycerol and 0.6% NaNO₃, at 28 °C during 120 hours under 200 rpm. A parallel relation between biomass, consume of glycerol, biosurfactant production, surface tension reduction and hexadecane emulsification showed a growth-associated production. The isolated biosurfactant corresponded to a yield of 8.0 g/L after 96 hours with a biomass of 4.0 g/L. The medium surface tension was reduced from 56 mN/m for 27,4 mN/ and the hexadecane emulsification remained unchanged after 72 hours, with values around 75%. The biosurfactant showed a CMC (critical micelle concentration) of 700 mg/L an interfacial tension against hexadecane of 2 mN/m, thermal (4-120°C) and pH (4-12) stability regarding the surface tension reduction and the emulsification capacity of vegetable oils and diesel, and tolerance under salt concentrations (2-10%). Little changes in the surface tension and in the emulsification activity were observed when the cell-free broth containing the biosurfactant was submitted under 90°C during two hours. The biosurfactant has been characterized as a group of rhamnolipids with anionic nature. The crude biosurfactant did not show toxicity against the micro crustacean *Artemia salina* and the cabbage (*Brassica oleracea*) in the conditions tested, while the isolated biosurfactant showed toxicity against the micro crustacean at the CMC. The potential application of the biosurfactant in

petroleum and diesel recovery from sand was demonstrated by the percentiles of oils removal (85%). The promising results obtained in this work are noteworthy for possible biosurfactant production from glycerol.

Keywords: Biosurfactants; glycerol; *Pseudomonas aeruginosa* ; Industrial residues; Surface tension; Emulsification; Toxicity

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os surfactantes constituem uma classe de compostos químicos utilizados em diversos setores industriais. Esses compostos são formados por estruturas moleculares contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água) (MUTHUSAMI et al., 2008), promovendo a redução da tensão superficial e interfacial, conferindo a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (GAUTAM; TYAGI, 2006; DELEU; PAQUOT, 2004; NITSCHKE et al., 2007).

A importância comercial dos surfactantes torna-se evidente a partir da tendência do mercado em aumentar a produção desses compostos em decorrência da diversidade de utilizações industriais (CALVO et al., 2009). Os surfactantes podem ser aplicados na agricultura, na indústria alimentícia, nas indústrias farmacêuticas, de higiene, têxtil e de cosméticos (SINGH et al., 2007; BARROS et al., 2007), embora o maior mercado para essas biomoléculas seja a indústria petrolífera, onde podem ser amplamente utilizados, a recuperação avançada de petróleo (MEOR – microbial enhanced oil recovery), na remoção e mobilização de resíduos oleosos, na limpeza de tanques de estocagem e na biorremediação (MUKHERJEE et al., 2006).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, as novas legislações de controle ambiental têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (MAYER; SOBERON-CHAVES, 2000).

Surfactantes microbianos ou biossurfactantes são metabólitos produzidos principalmente por bactérias e leveduras, embora alguns fungos também os produzam (RON; ROSENBERG, 2002). Esses compostos, em função de suas biodegradabilidade e compatibilidade com o meio ambiente, ao contrário dos similares petroquímicos (sintéticos), têm sido cada vez mais estudados (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Os biossurfactantes apresentam, ainda, inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como baixa toxicidade, estabilidade frente à ampla faixa de pH e sob temperaturas elevadas, bem como resistência a elevadas concentrações salinas (SINGH et al., 2007). Os tipos de

estrutura e as quantidades de biossurfactantes produzidas são determinados a partir da escolha e concentração do(s) substrato(s) utilizado(s) que podem ser solúveis e insolúveis, bem como pela concentração de íons como P, N, Mg, O e Fe no meio de cultura, além das condições de cultivo (CORTIS; GHEZZEHEI, 2007).

Os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar, enquanto que os biossurfactantes são diferenciados por sua natureza bioquímica e pela espécie microbiana produtora. As principais classes incluem os glicolipídeos, os lipopeptídeos, as lipoproteínas, os biossurfactantes poliméricos, os fosfolipídeos e alguns ácidos graxos (VAN-HAMME et al., 2006).

A classe dos glicolipídeos compreende um grupo dos mais conhecidos e estudados, apresentando longas cadeias de ácidos graxos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos. Nessa classe destacam-se os raminolipídeos da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e os soforolipídeos de espécies de leveduras do gênero *Candida* (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008; TULEVA et al., 2002).

Os raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (GUERRA-SANTOS et al., 1984) têm sido extensivamente estudados e apresentam grande potencial de aplicação na indústria de petróleo (ROBERT et al., 1989). A composição e os rendimentos obtidos dependem do tipo da composição dos nutrientes e das condições de cultivo (MULLIGAN, 2005; MONTEIRO et al., 2007).

A despeito das vantagens dos biossurfactantes frente aos similares petroquímicos, esses ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros, embora esse custo possa ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis, bem como através da obtenção de altos rendimentos do produto (GALLERT; WINTER, 2002; TULEVA et al., 2002).

Nesse contexto, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes, uma vez que a escolha do substrato possa representar uma redução de até 30% do custo total do processo (MANEERAT, 2005). Resíduos de destilaria (BABU et al., 1996; DUBEY; JUWARKAR, 2001), soro de queijo (KOCH et al., 1988), melão (PATEL; DESAI, 1997) e efluente de óleo de oliva (MERCADÈ et al., 1994), entre outros, têm sido descritos como substratos para a produção de biossurfactantes.

Dentre as fontes renováveis de baixo custo, o glicerol originado como co-produto da produção de biodiesel surge como uma alternativa atrativa, uma vez que a quantidade anual dessa substância gerada em todo mundo vem aumentando em função da demanda crescente de biodiesel (EASTERLING et al., 2009; DINIZ, 2006).

Nesse sentido, a possibilidade de substituir fontes de carbono tradicionais pelo glicerol, aliada ao potencial produtor da *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992, representa uma alternativa atrativa na geração de um produto biotecnológico de um baixo custo para aplicação na área ambiental.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Utilizar o glicerol como substrato de baixo custo para a produção de agentes surfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992.

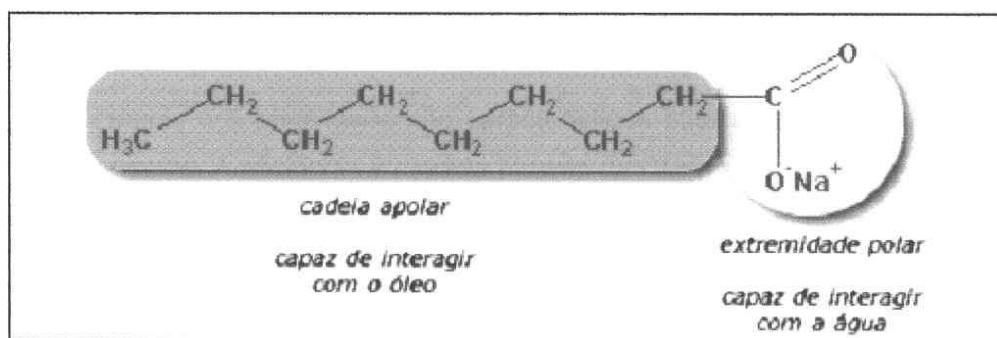
1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da concentração de glicerol na produção dos biossurfactantes.
- Avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção dos biossurfactantes.
- Avaliar a influência da relação C/N na produção dos biossurfactantes.
- Estabelecer o melhor meio de produção dos biossurfactantes a partir dos parâmetros estudados.
- Avaliar a influência do tempo de cultivo, da temperatura, da aeração e da velocidade de rotação na produção dos biossurfactantes.
- Descrever a cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante a partir do meio e das condições de cultivo previamente estabelecidos.
- Isolar o biossurfactante e determinar o rendimento de produção.
- Determinar a Concentração Micelar Crítica do biossurfactante.
- Determinar a tensão superficial e a tensão interfacial do biossurfactante.
- Caracterizar os ácidos graxos do biossurfactante por Cromatografia Gasosa.
- Determinar a carga iônica do biossurfactante.
- Identificar a composição química do biossurfactante por Cromatografia em Camada Delgada.
- Determinar a capacidade de emulsificação de diferentes hidrocarbonetos e óleos vegetais pelo biossurfactante.
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante, em relação à tensão superficial e ao poder de emulsificação, frente a condições específicas de temperatura, pH e na presença de sal.
- Determinar a toxicidade do biossurfactante.
- Avaliar o potencial de aplicação do biossurfactante na remoção de poluentes hidrofóbicos adsorvidos em areia através de ensaio cinético.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 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), como ilustrado na Figura 1. Essas características permitem aos surfactantes reduzir a tensão superficial e interfacial e 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).

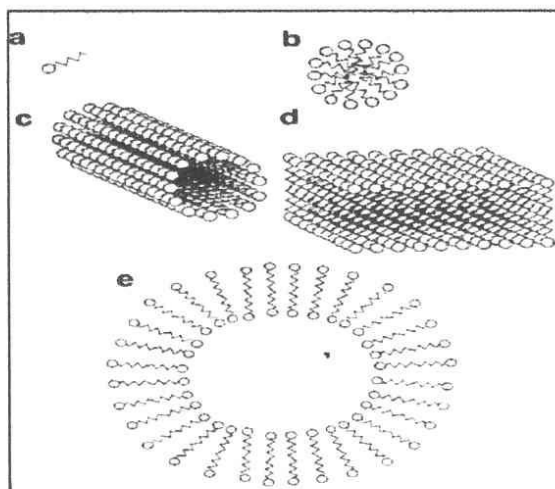


Fonte: <http://www.virtuallaboratory.net>

Figura 1 – Estrutura química representativa de um monômero surfactante

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

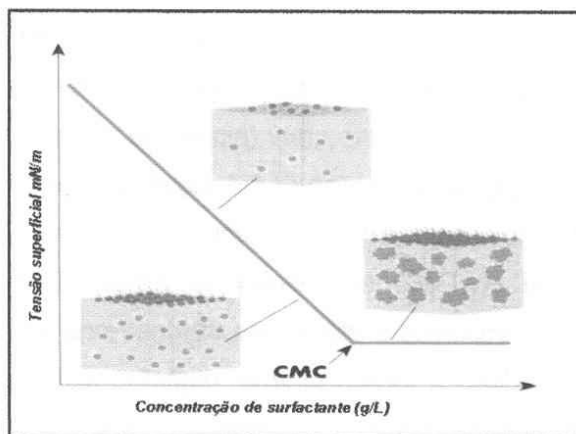
necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Figura 3). Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (CORTIS; GHEZZEHEI, 2007; VAN-HAMME et al., 2006).



Fonte: SAINT-BLANQUAT, 1994

Figura 2 - Surfactantes tendem a se associar em interfaces ou em micelas. (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica atacada a cadeia de hidrocarboneto; (b) micela circular; (c) micela cilíndrica; (d) camada micelar e (e) representação de uma vesícula

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).



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

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

1.3.2 Biossurfactantes

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).

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

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).

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 de diferentes espécies microbianas, além da possibilidade de variação de inúmeros parâmetros culturais 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). A CMC dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial ficam em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente.

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
Raminolípídeo	20
Surfactina	11
Alquil benzeno sulfonato	590
Lauril sulfato de sódio	2 000 – 2 900

Fonte: BOGNOLO, 1999

1.3.2.1 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).

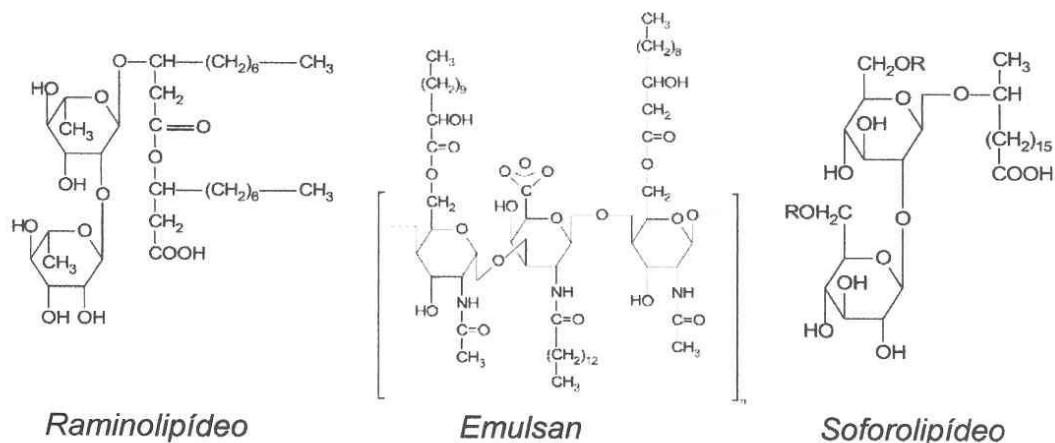
A maioria dos biossurfactantes é aniônica ou neutra. Apenas alguns são catiônicos, como os que contêm grupamentos amina. A parte hidrofóbica é caracterizada por ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, fosfato, um ácido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

- Glicolípídeos, cujo grau de polaridade depende dos hidrocarbonetos utilizados como substratos. São exemplos os raminolípídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, e os sofrólípídeos 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.

- Fosfolípidos, estruturas comuns a muitos microrganismos, como o biossurfactante de *Corynebacterium lepus*.
- Ácidos graxos e lípidos neutros (alguns classificados como glicolípidos) e proteínas hidrofóbicas.

A Figura 4 ilustra algumas estruturas de biossurfactantes, cujos exemplos apresentam o lipossacarídeo emulsan e os glicolípidos raminolípido e soforolípido



Fonte: MUKHERJEE et al., 2006

Figura 4 - Estruturas típicas de biossurfactantes glicolípídicos

1.3.2.2 Microrganismos Produtores

Uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos é capaz 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.

Os raminolípidos 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 (MULLIGAN, 2005).

Os *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 o 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. Em 1979, Pareilleux observou a presença de um polímero extracelular por *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 por 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) e Coimbra et al., (2009) aplicaram com sucesso um resíduo industrial de óleo de soja na produção de um biossurfactante por *Candida lipolytica*.

A Tabela 2 resume as principais classes de biossurfactantes e os respectivos microrganismos produtores descritos na literatura.

Tabela 2 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

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

Fonte: MUTHUSAMY et al., 2008

1.3.2.2.1 Produção de Raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são reconhecidas por sua

habilidade em degradar compostos de difícil assimilação por outros organismos, incluindo desde moléculas simples a compostos orgânicos complexos (HUSANUZZAMAN et al., 2004). Espécies deste gênero apresentam diversas aplicações biotecnológicas, em especial na área ambiental, pois são capazes de sintetizar uma variedade de enzimas sob as mais diversas condições de cultivo (WARD et al., 2003).

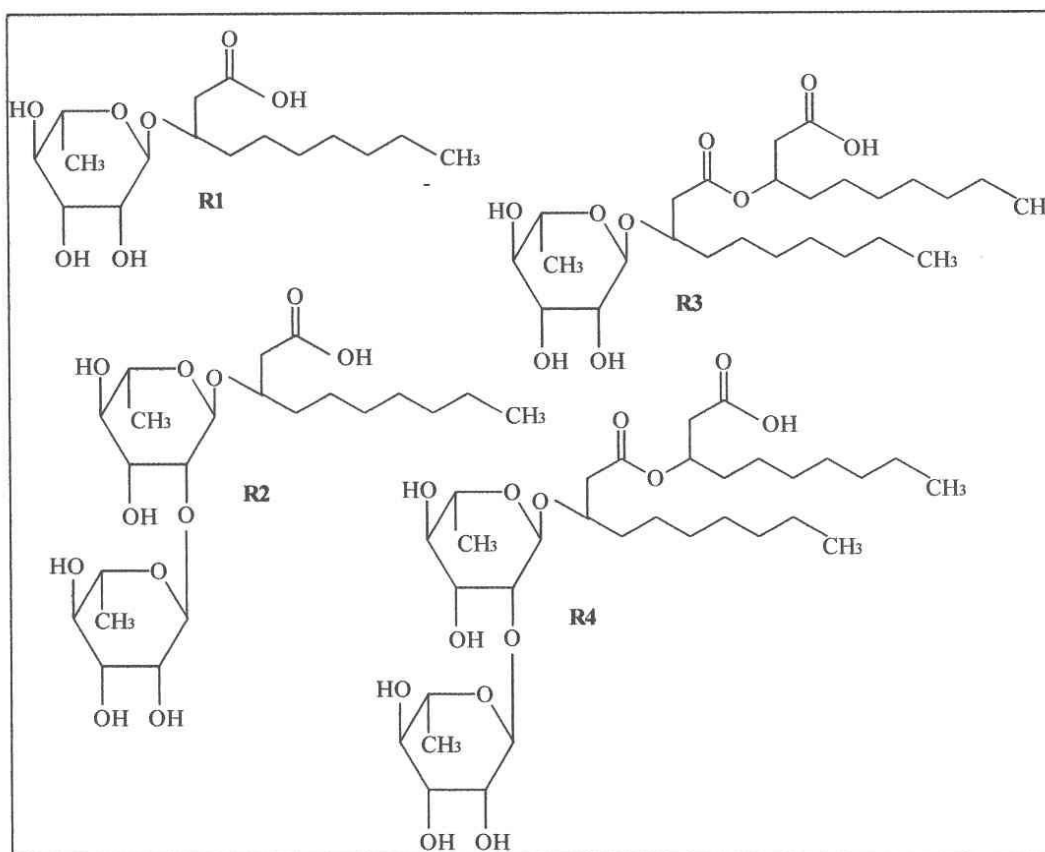
A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa ambientalmente versátil a qual pode provocar doenças em indivíduos susceptíveis (oportunistas) e é resistente a antibióticos. A *P. aeruginosa* é capaz de metabolizar vários compostos orgânicos como substrato, o que a permite uma excepcional habilidade para colonizar nichos ecológicos onde há escassez de nutrientes (WARD et al., 2003).

A *P. aeruginosa* secreta um grupo de biossurfactantes aniônicos de natureza glicolipídica, os raminolipídeos. Os raminolipídeos estão entre os surfactantes mais eficientes conhecidos. Eles possuem tensões superficiais reduzidas (32-27 mN/m), baixa Concentração Micelar Crítica, atingindo 5 mg/L, alta capacidade emulsificante, alta afinidade por moléculas orgânicas hidrofóbicas, além de reduzir a tensão interfacial óleo/água de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m (LANG, WULLBRANDT, 1999). Tais propriedades conferem aos raminolipídeos características atrativas para aplicação na despoluição de sistemas de solos. Outra vantagem frente aos biossurfactantes consiste na facilidade de isolamento desses do líquido metabólico, uma vez que são extracelulares, além de poderem ser produzidos a partir de substratos hidrofóbicos e hidrofílicos de baixo custo, incluindo hidrocarbonetos, óleo vegetais, carboidratos ou resíduos das indústrias de alimentos (MAIER, SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; MULLIGAN, 2005; MONTEIRO et al., 2007).

Em 1949, Jarvis e Johnson reportaram que o raminolipídeo produzido por *P. aeruginosa* cultivada em glicerol como fonte de carbono possuía duas moléculas de raminose ligadas a uma cadeia β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato. Desde então, a compreensão acerca das complexas misturas desses compostos tem aumentado (MONTEIRO et al., 2007). Em 1963, uma rota metabólica para a síntese dos raminolipídeos por transferência seqüencial de glicosila foi proposta (BURGUER et al., 1966). Em 1994, Ochsner et al., isolaram e analisaram o gene envolvido na regulação da síntese dos raminolipídeos.

Os raminolipídeos produzidos pela *P. aeruginosa* têm sido tradicionalmente reportados como misturas dos homólogos R1 [3-(α -L-raminopiranosil)- β -hidroxidecanoato] ou L-raminopiranosil- β -hidroxidecanoato (Rha-C₁₀), R2 [3-(2'-O- α -L-raminopiranosil- α -L-raminopiranosiloxi)- β -hidroxidecanoato] ou 2-O-L-raminopiranosil- β -L-raminopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha₂-C₁₀), R3 3-[3'-(α -L-raminopiranosil-

hidroxidecanoil)- β -hidroxidecanoato] ou L-raminopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha-C₁₀-C₁₀) e R4 3-[3'-(2"-O- α -L-raminopiranosil- α -L-raminopiranosil-hidroxidecanoil)- β -hidroxidecanoato] ou (2-O-L-raminopiranosil- β -L-raminopiranosil- β -hidroxidecanoato (Rha₂-C₁₀-C₁₀), como classificados por Syldatk e Wagner (1987). Vários autores reportam que o raminolípido é produzido por *P. aeruginosa* como misturas de diferentes homólogos onde o raminolípido Rha-C₁₀-C₁₀ predomina. Outros autores reportaram a presença de outros raminolípdeos com diferentes cadeias de ácidos graxos (C₁₈, C₂₂ e C₂₄) em menor quantidade (ABDEL-MAWGOUD et al., 2008). De fato, mais de 28 diferentes homólogos têm sido reportados, com cadeias saturadas e insaturadas variando de C8 a C14 e com porções de carboidratos acopladas (NITSCHKE et al., 2005; MULLIGAN, 2005). A Figura 5 ilustra a estrutura química dos raminolípdeos produzidos por *P. aeruginosa*.



Fonte: KOCH et al., 1991

Figura 5 - Diferentes tipos de raminolípdeos produzidos por *P. aeruginosa*

Enquanto um anel extra de raminose confere mais hidrofiliçidade aos raminolipídeos (monoraminoipídeos versus diraminolipídeos), carbonos adicionais na cadeia de ácidos graxos podem aumentar a hidrofobicidade aos mesmos. Estas propriedades podem afetar a estabilidade dos raminolipídeos na fase aquosa (na forma monomérica ou como aglomerados micelares), suas capacidades em solubilizar compostos orgânicos hidrofóbicos e suas biodisponibilidades. Raminolipídeos mais hidrofílicos como Rha-C₁₀ e Rha₂-C₁₀ apresentam valores de CMC na faixa de 200 mg/L, enquanto que valores menores, entre 5 e 60 mg/L têm sido reportados para misturas contendo principalmente o monoraminoipídeo Rha-C₁₀-C₁₀. O diraminolipídeo Rha₂-C₁₀-C₁₀ apresenta valores intermediários de CMC, entre 40-65 mg/L. A literatura descreve que a composição da mistura de raminolipídeos irá influenciar de forma marcante sua performance como carreador de contaminantes (ABDEL-MAWGOUD et al., 2008).

A Tabela 3 mostra a composição das misturas de raminolipídeos produzidas por diferentes amostras de *P. aeruginosa*

Tabela 3 - Composição de misturas de raminolipídeos produzidas por diferentes amostras de *P. aeruginosa*

Monoraminoipídeo (2 ácidos graxos)	Diraminolipídeo (2 ácidos graxos)	Mono/Diraminolipídeo (1 ácido graxo)	Referência
Glicerol (12 homólogos detectados)			
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Não detectado	MONTEIRO et al., 2007
Rha-C ₈ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₈ -C ₁₀		
Rha-C ₁₀ -C ₈	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₈		
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₂ -C ₁₀		
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂		
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	Rha ₂ -C ₁₀ -C _{12:1}		
Glicerol (10 homólogos detectados)			
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀	PERFUMO et al., 2006
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₈ -C ₁₀	Rha-C ₁₀	
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₈		
	Rha ₂ -C ₁₂ -C ₁₀		
Óleo de fritura (de soja) (02 homólogos detectados)			
Não detectado	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀ Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂	Não detectado	THANMSUB et al., 2006
Resíduo de refinaria (06 homólogos detectados)			
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Não detectado	BENINCASA et al., 2004
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂		
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	Rha ₂ -C ₁₀ -C _{12:1}		
Ácidos graxos livres residuais de óleo de soja (08 homólogos detectados)			
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Rha-C _{8:1}	HABA et al., 2003
Rha-C ₁₂ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂	Rha-C _{12:2}	

Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	Rha ₂ -C ₁₀ -C _{12:1}		
Óleos de fritura (14 homólogos detectados)			
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Rha-C _{12:1}	HABA et al., 2003
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	Rha ₂ -C ₁₀ -C _{12:1}		
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₂ -C ₁₀		
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂		
Rha-C ₈ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₈ -C ₁₀		
Rha-C ₁₀ -C ₈	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₈		
Não detectado	Rha ₂ -C ₁₀ -C _{14:1}		
Óleo de girassol/oliva (03 homólogos detectados)			HABA et al., 2003
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₂	
Óleos de fritura (14 homólogos detectados)			
Rha-C ₈ -C ₁₀	Rha-C ₈ -C ₁₀		
Rha-C ₁₀ -C ₈	Rha-C ₁₀ -C ₈		
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	Rha-C ₁₀ -C _{12:1}		
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	Rha-C ₁₀ -C ₁₂		HABA et al., 2003
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	Rha-C ₁₂ -C ₁₀		
	Rha ₂ -C ₈ -C _{12:1}		
	Rha ₂ -C ₁₀ -C _{14:1}		
	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀		
	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂		
Resíduo de refinaria de óleo de soja (05 homólogos detectados)			ABALOS et al., 2001
Rha-C ₁₀ -C ₁₀		Rha-C _{12:2}	
Rha-C ₁₀ -C ₁₂		Rha-C _{8:2}	
Rha-C _{12:1} -C ₁₀			
Óleo de milho (04 homólogos detectados)			
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Não detectado	MATA- SANDOVAL et al., 1999
	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂		
	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂ -H		
Manitol e naftaleno (28 homólogos detectados)			
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Rha-C ₁₀	
Rha-C ₈ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₈ -C ₁₀	Rha-C ₁₂	
Rha-C ₁₀ -C ₈	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₈	Rha-C ₈	
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₂ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₈	DÉZIEL et al., 1999
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₀	
Rha-C ₁₂ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₂ -C ₁₂	Rha ₂ -C _{12:1}	
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	Rha ₂ -C ₁₀ -C _{12:1}	Rha ₂ -C ₁₂	
Rha-C _{12:1} -C ₁₀	Rha ₂ -C _{12:1} -C ₁₀		
Rha-C ₈ -C ₈	Rha ₂ -C ₈ -C ₈		
	Rha ₂ -C _{12:1} -C ₁₂		
	Rha ₂ -C ₁₀ -C _{14:1}		
	Rha ₂ -C ₈ -C _{12:1}		
Substrato não especificado (05 homólogos detectados)			
	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Não detectado	
	Rha ₂ -C ₈ -C ₁₀		MANSO PAJARRON et al., 1993
	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₈		
	Rha ₂ -C ₁₂ -C ₁₀		

Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂		
Glicose (14 homólogos detectados)		
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Não detectado
Rha-C ₈ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₈ -C ₁₀	
Rha-C ₁₀ -C ₈	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₈	RENDELL et al., 1990
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	Rha ₂ -C ₁₂ -C ₁₀	
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂	
Rha-C ₁₂ -C ₁₂	Rha ₂ -C ₁₂ -C ₁₂	
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	Rha ₂ -C ₁₀ -C _{12:1}	

Fonte: MONTEIRO et al., 2007

1.3.2.3 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 microrganismos 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 pHs 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 microrganismos microscópicos 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 e
- biocompatibilidade e digestibilidade, o que garante a aplicação dessas biomoléculas nas 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 superprodutoras é rara e as conhecidas não são capazes de produzir altos rendimentos em surfactantes, além de necessitarem 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 e
- o aumento da produtividade é muitas vezes prejudicado pela formação de espuma, o que requer a utilização de meios diluídos.

1.3.2.4 Aplicações

A produção mundial de surfactantes somou 17 milhões de toneladas em 2000, esperando-se um aumento da 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 aplicação 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).

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).

Até o presente momento, os biossurfactantes têm sido usados 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).

1.3.2.4.1 Aplicação de Biossurfactantes na 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 oxigênio, pH, presença de macro e micro nutrientes, características físico-químicas do histórico da poluição do contaminante ambiental e das partículas de solo ou outras às 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 microrganismos 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 (RAHAMN et al., 2002).

Alguns estudos demonstraram o aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis como os hidrocarbonetos aromáticos policiclos (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 organosclorados como DDT e ciclodienos (KARANTH et al., 1999).

1.3.2.4.2 Aplicação de Biossurfactantes na 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 mediada entre o óleo e a fase aquosa (HUA 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, 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 2004).

1.3.2.4.3 Aplicação de Biossurfactantes na 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).

1.3.2.4.4 Aplicação de Biossurfactantes na 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).

Por definição, uma emulsão é um sistema heterogêneo, consistindo de ao menos um líquido imiscível (fase interna descontínua) disperso em outro (fase externa contínua) em forma de pequenas gotas. (SARUBBO, 1997). Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, a qual pode ser aumentada por aditivos surfactantes, sólida finamente dividida que atuam reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia na superfície entre as 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, margarina, maionese, molhos para salada, salsicha, 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, 2000; SARUBBO, 1997).

Os biossurfactantes ainda podem ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, no controle da aglomeração de glóbulos de gordura, na estabilização de sistemas aerados e para melhorar a consistência de produtos gordurosos. O uso de raminolipídeos para melhorar as propriedades da manteiga, de croissants e de produtos de confeitaria congelados também foi reportado (MUTHUSAMY et al., 2008). O bioemulsificante produzido por *Candida utilis* tem 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, 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.

1.3.2.4.5 Aplicação de Biossurfactantes na 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, glicolipídeos obtidos de *Torulopsis bombicola* KSM 35 são usados no Japão, como agentes de limpeza facial (DELEU; PAQUOT, 2004). Soforolipídeos 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 soforolipídeos 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).

1.3.2.4.6 Aplicação de Biossurfactantes na Mineração

Compostos tensoativos produzidos por *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp. foram utilizados para flotação e separação de calcita e eschelita. A recuperação foi de 95% para CaWO_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 calcárea e água (RON; ROSENBERG, 2002).

1.3.2.4.7 Aplicação de Biossurfactantes na Agricultura

Na agricultura, os biossurfactantes são utilizados na hidrofilição de solos argilosos para a obtenção de boa umidade e distribuição uniforme de fertilizantes (NITSCHKE et al., 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 raminolipídeos contra patógenos de plantas.

1.3.2.4.8 Aplicação de Biossurfactantes na 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 raminolipídeos podem exibir atividades antibacteriana e antifitoviral. Abalos et al., (2001), por exemplo, identificaram seis raminolipídeos 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 raminolipídeos exibiram excelentes propriedades antifúngicas contra vários fungos em concentrações variando de 16 $\mu\text{g/mL}$ - 32 $\mu\text{g/mL}$ (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004).

A chamada atividade anti-aderente, ou seja, a capacidade de inibir a adesão de microrganismos patogênicos em superfícies sólidas ou em sítios infecciosos também tem sido reportada em biossurfactantes, levando à diminuição de infecções hospitalares sem a

necessidade de fármacos ou agentes químicos sintéticos (RODRIGUES et al., 2006; MUTHUSAMY et al., 2008). Meylheus 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-fosfolípideo é responsável pela falência da 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).

Soforolípideos 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) e a incidência de gravidez indesejada. Soforolípideos também têm sido estudados como agentes antiinflamatórios para doenças imunológicas (RODRIGUES et al., 2006; MUTHUSAMY et al., 2008).

A iturina, lipopeptídio 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. Os efeitos da surfactina na absorção de insulina em pulmão de ratos foram examinados (MUTHUSAMY et al., 2008).

1.3.2.4.9 Outras Aplicações

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem as indústrias de papel, têxtil e cerâmica (DELEU; PAQUOT, 2004). A Tabela 4 descreve as aplicações industriais dos biossurfactantes.

Tabela 4 – Aplicações industriais dos biossurfactantes

Indústria	Aplicação	Papel dos biossurfactantes
Petróleo	Recuperação avançada de óleos	Aumento da drenagem de óleo em poços perfurados; estimulação da liberação de óleo entranhado por forças capilares; redução da viscosidade; molhabilidade de superfícies sólidas; redução da viscosidade de óleos; redução da tensão interfacial; solubilização de óleos
	Desemulsificação	Desemulsificação de emulsões oleosas, seqüestro de metais pesados; redução da tensão interfacial; agente de molhabilidade
Ambiental	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos; redução da tensão interfacial; seqüestro de metais
	Remediação de solos	Emulsificação através da aderência a hidrocarbonetos; dispersantes; agentes espumantes; detergentes
Alimentos	Emulsificação e desemulsificação	Emulsificantes; estabilizantes; desemulsificantes; suspensão; solubilizantes; espumantes; inibidores de espumas; amaciantes; lubrificantes
	Ingrediente funcional	Interação com lipídeos, proteínas e carboidratos
Biológica	Microbiológica	Função fisiológica como mobilidade celular, acesso a nutrientes, competição célula-célula, patogênese em plantas e animais
	Farmacêutica e terapêutica	Antibacterianos; antifúngicos; agentes antivírus; vacinas; mecanismos de adesão;
Agricultura	Biocontrole	Facilitadores de mecanismos de biocontrole de micróbios como parasitismo e competição
Bioprocessamento	“Downstream”	Biotatalise em sistemas bifásicos aquosos e em emulsões; biotransformações; recuperação de compostos intracelulares; aumento da produção de metabólitos fermentativos e enzimas extracelulares
Cosmética	Produtos de beleza e saúde	Emulsificantes; solubilizantes; espumantes; agentes microbianos, mediadores de ação enzimática

Fonte: MUTHUSAMY et al., 2008

1.3.2.5 Perspectivas de Utilização

Muitas das potenciais 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 a 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. Estimativas realizadas na década passada situaram os custos dos biossurfactantes em U.S. 3-20 \$/kg, enquanto o custo de produção de surfactantes sintéticos como etoxilatos e alquil-poliglicosídeos pelas indústrias químicas estão na faixa de U.S. \$ 1-3/Kg (BOGNOLO, 1999).

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).

1.3.2.5.1 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-VEGA 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 et al., 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 5 descreve os procedimentos de recuperação dos biossurfactantes e suas vantagens.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos métodos de recuperação de biossurfactantes e suas vantagens relativas

Processo de recuperação	Propriedade responsável pela seleção do método de separação	Instrumentação necessária	Vantagens
Precipitação ácida	Biossurfactantes se tornam insolúveis a baixos pH	Não requer equipamentos	Baixo custo; eficiente na 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 biossurfact. poliméricos
Centrifugação	Biossurfactantes insolúveis precipitam em função da força centrífuga	Necessidade de Centrifuga	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	Biossurf. 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	Biossurf. 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	Biossurf. 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 biossurfact.; baixo custo; reutilizável; recuperação em cultura contínua
Cromatografia de troca iônica	Biossurf. carregados se ligam a resinas trocadoras de íons e	Resinas trocadoras de íons	Alta pureza, reutilização, rápida recuperação do produto

Extração por solvente (com MTBE)	podem ser eluídos com um tampão específico Biossurf. são solúveis em solventes orgânicos devido à presença de cadeia hidrofóbica	empregadas em colunas 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).

1.3.2.5.2 Glicerol como Alternativa Econômica Promissora para a Produção de Biossurfactantes

A redução dos custos de produção é o maior problema na viabilização do uso de biossurfactantes, como também acontece com a maioria dos processos biotecnológicos. Muitas vezes, a quantidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção; estima-se que as matérias primas representam entre 10 e 30% dos custos totais de produção na maioria dos processos biotecnológicos. Assim, para reduzir esses custos é desejável utilizar matérias-primas de baixo custo. Uma possibilidade explorada extensivamente é a utilização de matérias-primas baseadas em produtos agrícolas baratas como substratos na produção de biossurfactantes. Uma variedade de matérias-primas baratas, inclusive óleos vegetais, resíduos de óleo, amidos, soro lácteo e resíduos de destilaria já foram mencionados como substâncias utilizadas na produção de biossurfactantes (SILVA et al., 2009).

Dentre as fontes de baixo custo, o glicerol, co-produto originado do processo de transesterificação dos óleos vegetais e animais na produção de biodiesel (MORRISON, 1994; DINIZ, 2006), surge como uma alternativa de grande interesse, uma vez que a

quantidade anual gerada em todo mundo vem aumentando em função da demanda crescente de biodiesel e de outros derivados (EASTERLING et al., 2009).

Com o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel pelo Governo Federal, espera-se um aumento da oferta do glicerol. Os excedentes de glicerol poderão ocasionar grandes reduções no preço e eliminar parte da produção de glicerol de outras fontes, que hoje é de 0,8 a 1,0 t/ ano. Na Europa, o aumento de biodiesel para atingir apenas alguns pontos percentuais do diesel, cobriria grande parte da demanda atual por glicerol. Buscam-se novas aplicações de grandes volumes para glicerol no mundo, e isto provavelmente se dará nos intermediários para plásticos, como o propanodiol – PDO.

O Glicerol pode ser produzido por técnica química ou fermentativa e tem muitas utilidades, principalmente na indústria química. Os processos de produção são de baixa complexidade tecnológica (SILVA et al., 2009; BRISSON et al., 2001). A síntese microbiana predominou até que a síntese química, de subproduto do propileno, cresceu a partir de 1950 (NEVOIGT; STAHL, 1997). Agora, com o declínio na produção de polipropileno, as fermentações recuperaram seu espaço no mercado (REHM, 1988; SHARMA et al, 2008; SILVA et al., 2009). O comércio de volumes e preços oscilou muito na última década. Entre 1995-2003, os preços oscilaram entre US\$ 1.08/ lb e US\$ 0.60/ lb, com tendência, nos últimos anos, para US\$ 1.00/ lb. De acordo com a literatura, o glicerol tem sido usado com sucesso como fonte de carbono solúvel na produção de muitos metabólitos microbianos (SHARMA et al, 2008; SILVA et al., 2009).

As principais aplicações do glicerol hoje são em cosméticos (40%), em alimentos (24%), na síntese de resinas e ésteres (18%) e em aplicações farmacêuticas (7%). A demanda continua crescendo mais em mercados de uso pessoal, higiene dental e alimentos, correspondendo a 64% do total. As grandes fontes existentes na Europa e nos Estados Unidos estão apostando no glicerol proveniente do biodiesel (DINIZ, 2006).

O glicerol é atualmente um dos ingredientes mais utilizados na indústria farmacêutica, na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e anti-sépticos (TOSETTO; ANDRIETTA, 2003). Por ser não-tóxico, não-irritante, sem cheiro e sabor, o glicerol tem sido aplicado como emoliente e umectante em cremes dentais, hidratantes, loções pós-barba, desodorantes, batons e maquiagens. O glicerol tem sido empregado no processamento de tabaco com objetivo de tornar as fibras do fumo mais resistentes e evitar quebras. É empregado na composição dos filtros de cigarros e como condutor de aromas. É usado para amaciar e aumentar a flexibilidade das fibras têxteis. Pode ainda ser empregado como lubrificante de máquinas processadoras de alimentos, para fabricação de tintas e resinas, montagem de dinamites

etc. O glicerol pode ser usado como umectante e para conservar bebidas e alimentos tais como refrigerantes, balas, bolos, pastas de queijo e carne, ração animal seca.

Por ser um componente estrutural de lipídeos é utilizado em preparações de molho para salada, coberturas de doces e sobremesas geladas. Outro mercado muito importante, e exclusivo, que provavelmente vai se desenvolver com a maior oferta de glicerol é a aplicação deste componente na síntese de moléculas de alto valor agregado (BOEHMAN, 2005). Entre estas está o PDO (propanodiol), que se dá a partir de fermentação do glicerol, para uso em plásticos. Se o glicerol obtiver um bom crescimento de oferta e grande parte do mercado de sorbitol for substituído por glicerol nas aplicações de drogas, cosméticos e outros, ocorrerá uma nova demanda estimada em 300 mil toneladas por ano (McCOY, 2006).

A Figura 6 ilustra as características e a estrutura do glicerol.

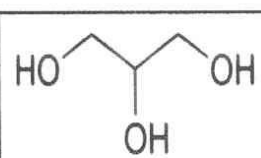
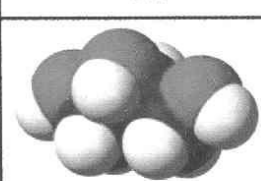
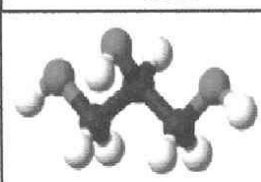
Características/Estrutura do Glicerol		
Nome IUPAC (sistemática)	Propano-1,2,3-triol	
Outros nomes	Glicerol (mais usado), Glicerina (comercial)	
Fórmula química	$C_3H_5(OH)_3$	
Massa molar	$92,094 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	
Cor e aparência	líquido incolor	

Figura 6 – Características e estrutura do glicerol

1.4 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.; ABOULWAFI, M.M.; HASSOUNA, N. A-H. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, DOI 10.1007/s12010-008-8285-1, 2008.

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.

AMÉZCUA-VEJA, C.; POGGI-VARALDO, H.M.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RÍOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of cultura media. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 237-240, 2007.

BABU, P.S.; VAIDYA, A.N.; BAL, A.S.; KAPUR, R.; JUWARKAR, A.; KHANNA, P. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 263-268, 1996.

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

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.

BENINCASA, M.; ABALOS, A .; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A . Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1-8, 2004.

BOEHMAN, A. L. Biodiesel production and processing, **Fuel Processing Technology**, 86, p 1057-1068, 2005.

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

BRISSON, D; VOHL, MC; ST-PIERRE, J; HUDSON, TJ; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic process? In: *BioEssays* v.23, pp. 534-542, 2001.

BURGUER, M.M.; GLASER, L.; BURTON, R.M. Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Enzymology*, v. 8, p. 441-445, 1966.

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

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.

CANET, R. *et al.* 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.

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 and relation with the production of biosurfactants for environmental applications. *Current Microbiology*, 58, 245-249, 2009.

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.

COSTA, S.G.V.A.O, NITSCHKE, M, HAADDAD, R., ERBELIN, M.N., CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, v. 21, p. 1593-1600, 2005.

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 Reviews**, v. 61, 47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; DENNIE, F.; BOISMENU, D.; MAMER, O.A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphtalene. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1440, p. 244-252, 1999.

DINIZ, G. De coadjuvante a protagonista: Glicerina bruta obtida na produção de biodiesel pode ter muitas aplicações. **Ciência Hoje Online**, 19/10/05. disponível em <<http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3973>>, Acesso em 24 mar. 2006

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

EASTERLING, E. R.; FRENCH, W.T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 356-361, 2009.

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

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

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.

HABA, E.; ABALOS, A.; JÁUREGUI, O.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, A. Use of Liquid Chromatography–Mass Spectroscopy for Studying the Composition and Properties of Rhamnolipids Produced by Different Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6, p. 155-161, 2003.

HASANUZZAMAN, M.; UMADAY-BRIONES, K.M.; ZSIROS, S.; MORITA, N.; NODASAKA, Y.; YUMOTO, I.; OKUYAMA, H. Isolation, identification, and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. **Current Microbiology**, v. 49, p. 108-114, 2004.

HUA 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.

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.

JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A glyxcolipid produced by *Pseudomonas aweruginosa*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

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.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 94, p. 187-201, 2002.

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.

KOCH, A.K.; KEPELLI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 4212-4219, 1991.

KOCH AK, REISER J, KAPPELI O, FIECHTER A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production. **Biotechnology**, v. 51, p. 1335-1339, 1988.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 51p. 22-32, 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. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675-683, 2005.

MANSO PAJARRON, A.; DE KOSTER, C.G.; HEERMA, W.; SCHIMIDT, M.; HAVERKAMP, J. Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast-atom-bombardment tandem mass-spectrometry. **Glycoconjugate Journal**, v. 10, p. 219-226, 1993.

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.; SHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbon in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 650-663, 2001.

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

McCOY, M. Glycerin Surplus - Plants are closing, and new uses for the chemical are being found. **Chemical & Engineering News**. v. 84, n.6, p. 7-13, fev, 2006.

MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A. The use agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, p. 61-64, 1994.

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

MONTEIRO, S.A.; SASSAKI, G.L.; SOUZA, L.M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.

MORRISON, LR. *Glycerol*. In: **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Wiley, pp. 921-932, 1994.

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.

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

NEVOIGT, E; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p. 231-241, 1997.

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.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, -. 1593-1600, 2005.

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

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.

OCHSNER, U.A.; KOCH, A.K. FIECHTER, A. REISER, J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 2044-2054, 1994.

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

PATEL R.M., DESAI A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 91-94, 1997.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; CANGANELLA, F.; MARCHANT, R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* APO2-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 132-138, 2006.

RAHMAM, K. S.; RAHMAN, T. J. ; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R. ; BANAT, I. M. ; Rhamnolipid 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.

REHM, H. Microbial production of glycerol and other polyols. In: **Biotechnology** vol. 6B. Special microbial process. Weinheim: VCH, pp. 52-64, 1988.

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.

RENDELL, N.B.; TAYLOR, G.W.; SOMERVILLE, M.; TODD, H.; WILSON, R.; COLE, P.J. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1045, p. 189-193, 1990.

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.

ROBRA S.; de ANDRADE, L. F. C.; da CRUZ, R. S.; ALMEIDA NETO, J. A. Compostagem de glicerina residual com resíduos orgânicos e lodo de esgoto, **Anais do IX Seminário de Iniciação Científica**, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2003.

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

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

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.; 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.; 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.

SAINT-BLANQUAT, G. de. Effects nutritionnels des agents emulsifiants utilisés en alimentation humaine. **Medicine et Nutrition**, Toulouse, v. 20, n. 6, p. 379-395, 1984.

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.

SEM, 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.

SHARMA, Y.C.; SINGH, B.; UPADHYAY. S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. **Fuel**, v. 87, p. 2355–2373, 2008.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source

for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 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.

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

SYLDATK, C.; WAGNER, F. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (Eds.) **Biosurfactants and Biotechnology**, New York: Marcel Dekker, pp. 89-120, 1987.

THANOMSUMB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 149–1153, 2007.

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.

TOSETTO, M. G; ANDRIETTA S. R. *Cinética de produção de glicerol em processo de fermentação alcoólica utilizando diferentes matérias primas industriais*. In: Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis. **Anais do 14º SINAFERM**, Florianópolis, 2003. CDROM.

TULEVA, B.; CHRISTOVA, N.; COHEN, R.; ANTONOVA D.; TODOROV, T.; STOINEVA, I. Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 135-141, 2009.

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.

WARD, O.; SINGER, A.; HAMME, J.V. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 260-270, 2003.

WARD, O.; SINGER, A.; HAMME, J.V. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 260-270, 2003.

CAPÍTULO 2

Utilização de glicerol como substrato para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992

Selma N.R.L. Silva^{a,b}, Charles B.B. Farias^{b,c}

Raquel D. Rufino^{b,d}, Juliana M. Luna^{b,e}, Leonie A. Sarubbo^{b,f,*}

^a*Programa de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;* ^b*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, n.42, Bl J, Térreo, Boa Vista Cep: 50050-590, Recife-PE, Brasil;* ^c*Programa de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil;* ^d*Programa de Doutorado em Micologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;* ^e*Programa de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;* ^f*Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil*

*Autor para correspondência: Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco. Rua Nunes Machado. n.42. Bl J. Térreo. Boa Vista Cep: 50050-590. Recife-PE. Brasil

Tel.: +55-81-21194017; fax: +55-81-21194043.

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

Capítulo redigido segundo normas do Colloids and Surfaces B: Biointerfaces – Elsevier

ISSN 0927-7765

2.1 Resumo

Nesse trabalho, a influência da concentração da fonte de carbono, do tipo e da concentração da fonte de nitrogênio e das condições de cultivo (temperatura, aeração e agitação) em meio mineral formulado com glicerol foi inicialmente avaliada para a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. A cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante, descrita para o meio suplementado com 3% de glicerol e 0,6% de NaNO₃, a 28 °C durante 120 horas sob agitação de 200 rpm, indicou uma produção associada ao crescimento. O rendimento em biossurfactante isolado após 96 horas foi de 8,0 g/l. A tensão superficial foi reduzida de 56 mN/m para 27,4 mN/ e a emulsificação do hexadecano atingiu percentuais de 75% a partir das 72 horas, permanecendo estável até o fim do cultivo. O biossurfactante apresentou CMC de 700 mg/l, tensão interfacial contra o hexadecano de 2 mN/m, estabilidade térmica (4-120°C), estabilidade a 90°C por duas horas e em diferentes pH (4-12) frente à redução da tensão superficial e à atividade de emulsificação de óleos vegetais e hidrocarbonetos, além de tolerância a concentrações salinas (2-10%). O biossurfactante foi caracterizado como um grupo de raminolipídeos de natureza aniônica. O biossurfactante bruto não apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e ao repolho (*Brassica oleracea*) nas condições testadas, enquanto que o biossurfactante isolado apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo na CMC. O potencial de aplicação do biossurfactante na remoção de diesel adsorvido em areia foi demonstrado pelos percentuais de remoção superiores a 85%. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam a viabilidade de produção de biossurfactantes a partir de glicerol com potencial de aplicação na área ambiental.

Palavras-chave: Biossurfactantes; glicerol; *Pseudomonas aeruginosa*; Resíduos industriais; Tensão superficial; Emulsificação; Toxicidade

2.2 Abstract

In this work the influence of the carbon source concentration, of the type and concentration of the nitrogen source and of the cultivation conditions (temperature, aeration and) in mineral medium formulated with glycerol was studied for biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. The kinetic of growth and production of the biosurfactant has been described for the medium supplemented with 3% glycerol and 0.6% NaNO₃, at 28 °C during 120 hours under 200 rpm, showing a growth-associated production. The isolated biosurfactant corresponded to a yield of 8.0 g/l after 96 hours. The medium surface tension was reduced from 56 mN/m for 27,4 mN/m and the hexadecane emulsification remained unchanged after 72 hours, with values around 75%. A CMC of 700 mg/l and an interfacial tension against hexadecane of 4 mN/m were obtained. The biosurfactant showed stability when submitted at 90°C during two hours, and thermal (4-120°C) and pH (4-12) stability regarding the surface tension reduction and the emulsification capacity of vegetable oils and hydrocarbons, and tolerance under high salt concentrations (2-10%). The biosurfactant has been characterized as a group of rhamnolipids with anionic nature. The crude biosurfactant did not show toxicity against the microcrustacean *Artemia salina* and the cabbage (*Brassica oleracea*) in the conditions tested, while the isolated biosurfactant showed toxicity against the microcrustacean at the CMC. The potential application of the biosurfactant in diesel recovery from sand was demonstrated by the percentiles of oil removal above 85%. The results obtained in this work are noteworthy for possible biosurfactant production from glycerol with potential of application in the environment.

Keywords: Biosurfactants; glycerol; *Pseudomonas aeruginosa* ; Industrial residues; Surface tension; Emulsification; Toxicity

2.3 Introdução

O derramamento de hidrocarbonetos provoca a contaminação ambiental, gerando conseqüências desastrosas para os organismos vivos. Estima-se que 0,08%-0,4% da produção mundial de petróleo alcancem, eventualmente, os oceanos [1]. No Brasil, acidentes envolvendo hidrocarbonetos derivados de petróleo tais como gasolina e óleo combustível, têm causado sérios problemas ambientais. Em 1998, 1200m³ de óleo combustível foram derramados devido à corrosão de um oleoduto na cidade de Cubatão, no Estado de São Paulo. A corrosão de oleodutos também foi responsável pelo derramamento de 1300 m³ de óleo combustível na Baía de Guanabara, que já havia sido contaminada anteriormente por outros derramamentos de petróleo [2].

Acidentes como os citados acima têm intensificado o desenvolvimento de procedimentos e técnicas de combate à poluição ambiental por derivados de petróleo. Os solos contaminados por petróleo e derivados normalmente são tratados através de metodologias físicas, químicas ou biológicas. Entretanto, as novas diretrizes de recuperação de solos e águas têm restringido o uso de produtos químicos. Dentre as técnicas de remediação disponíveis, a biorremediação tem se destacado, embora a solubilidade reduzida dos hidrocarbonetos dificulte o acesso dos microrganismos e a conseqüente biodegradação do poluente [2,3].

Uma das possíveis soluções para a baixa disponibilidade dos poluentes hidrofóbicos consiste no uso de surfactantes, que, em função de sua natureza anfipática, são capazes de aumentar a solubilidade dos hidrocarbonetos, embora também representem outro risco de poluição ambiental. O uso de surfactantes microbianos pode evitar esses problemas uma vez que os biossurfactantes são biodegradáveis e menos tóxicos do que os convencionais sintéticos, sendo mais aceitáveis do ponto de vista social e ambiental [2].

Muitos biossurfactantes têm sido produzidos e aplicados na biodegradação de hidrocarbonetos, destacando-se os raminolípideos da bactéria gram-negativa *Pseudomonas*

aeruginosa [4]. Os raminolipídeos são surfactantes do tipo glicolipídeos, compostos por uma cabeça hidrofílica, constituída por uma ou duas moléculas de raminose chamadas, respectivamente, de monoraminolipídeo e diraminolipídeos e por uma cadeia hidrofóbica constituída por um ou dois ácidos graxos [5]. Os tipos de raminolipídeos produzidos dependem da bactéria, da fonte de carbono utilizada e das condições de cultivo [4]. Os raminolipídeos representam uma das classes mais importantes de biossurfactantes, uma vez que apresentam inúmeras vantagens como altos rendimentos e podem ser produzidos a partir de resíduos industriais solúveis e insolúveis [6]. Os raminolipídeos são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores abaixo de 30 mN/m [7]. A CMC de raminolipídeos puros ou de suas misturas depende, grandemente, da composição das diferentes espécies, mas varia de 50 a 200 mg/l [1].

A despeito das vantagens dos biossurfactantes, poucos têm sido comercializados em função dos altos custos de produção envolvidos no processo. De fato, o fator econômico tem sido o entrave no desenvolvimento dos produtos biotecnológicos. O sucesso da produção de biossurfactantes depende do desenvolvimento de um processo mais econômico, incluindo o uso de substratos menos dispendiosos, o que representa uma redução de 10-30% do custo total do processo.

Nesse cenário, a conversão de matérias-primas renováveis em compostos de alto valor agregado tem recebido grande atenção do ponto de vista ambiental. Entre os recursos disponíveis estão os óleos, os açúcares, o amido e a celulose das plantas e uma grande variedades de resíduos orgânicos oriundos da agricultura e das indústrias [8]. Dentre essas fontes renováveis, o glicerol obtido no processo de transesterificação de óleos e gorduras tem se destacado em função da crescente produção de biodiesel, o que também tem contribuído para a redução de seu preço [9]. Por outro lado, o glicerol tem sido usado com sucesso como fonte de carbono solúvel na produção de muitos metabólitos microbianos, como reportado na literatura [10,11].

Nesse sentido, a produção e a caracterização de um biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 foram avaliadas em meio mineral suplementado com glicerol como fonte de carbono com vistas à aplicação dos raminolipídeos como coadjuvantes nos processos de descontaminação ambiental de petróleo e derivados.

2.4 Material e métodos

2.4.1 Microrganismo

A *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco sob o código UCP0992 foi utilizada como microrganismo produtor dos biossurfactantes.

2.4.2 Meios de cultura

A bactéria foi mantida em Ágar Nutriente (AN), contendo 0,5% de extrato de carne, 1% de peptona 0,5% de NaCl e 0,5% de Ágar. Para crescimento do inóculo foi utilizado o meio Caldo Nutritivo (CN), com a seguinte composição: 0,5% de extrato de carne 1,5% de peptona 0,5% de NaCl e 0,5% de K_2HPO_4 .

A produção dos biossurfactantes foi realizada em meio mineral formulado com 0,1% de KH_2PO_4 , 0,1% de K_2HPO_4 , 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,002% de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,005% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,2% de $NaNO_3$ e glicerol [12].

O pH dos meios foi ajustado para 7,0, sendo os constituintes solubilizados e esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

2.4.3 Preparação do inóculo

Culturas jovens da bactéria obtidas após 24 horas de cultivo em meio AN foram transferidas para Erlenmeyer contendo 50 ml de Caldo Nutritivo (CN), o qual foi mantido sob agitação orbital de 150 rpm durante um período de 10-14 horas a 28°C para obtenção de uma D.O. (Densidade Óptica) de 0,7 (correspondente a um inóculo de 10^7 U.F.C./ml) a 600 nm. Esta leitura foi utilizada como inóculo na concentração de 2% (v/v).

2.4.4 Produção do biossurfactante

As fermentações para produção dos biossurfactantes foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 ml de capacidade, contendo 100 ml do meio de produção e incubados com 2% do pré-inóculo. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 120 horas, à temperatura de 28°C. Ao fim do cultivo, amostras foram retiradas para determinação da tensão superficial e do rendimento em biossurfactante isolado.

2.4.5 Influência da concentração da fonte de carbono na produção do biossurfactante

A influência do glicerol foi avaliada nas concentrações de 2, 3, 5 e 7%. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 120 horas, à temperatura de 28°C. Ao fim do cultivo, amostras foram retiradas para determinação da tensão superficial e do rendimento em biossurfactante isolado.

2.4.6 Influência do tipo da fonte de nitrogênio na produção do biossurfactante

Após seleção da melhor concentração de glicerol, a fonte de nitrogênio (NaNO_3) foi substituída por uma das seguintes fontes, na mesma concentração (0,2%): NH_4NO_3 ,

uréia, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, peptona, extrato de levedura e milhocina, resíduo da produção de milho e derivados, gentilmente cedida pela Corn Products LTDA., Cabo de Santo Agostinho-PE. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 120 horas, à temperatura de 28°C. Ao fim do cultivo, amostras foram retiradas para determinação da tensão superficial e do rendimento em biossurfactante isolado.

2.4.7 Influência da concentração da fonte de nitrogênio na produção do biossurfactante

Após estabelecimento da melhor fonte de nitrogênio para a produção do biossurfactante, a concentração desse nutriente foi testada para concentrações de 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,6%, resultando em diferentes razões C/N. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 120 horas, à temperatura de 28°C. Ao fim do cultivo, amostras foram retiradas para determinação da tensão superficial e do rendimento em biossurfactante isolado.

2.4.8 Influência das condições de cultivo na produção do biossurfactante

A produção do biossurfactante foi realizada, a partir do meio previamente estabelecido, em diferentes temperaturas (28 e 37°C), aerações através da razão do volume da cultura e capacidade do Erlenmeyer (60, 80 e 90%) e velocidades de rotação de 150 e 200 rpm.

2.4.9 Determinação das cinéticas de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante

Após o estabelecimento do meio e das melhores condições de produção, as cinéticas de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante foram

determinadas. Amostras foram retiradas ao longo do cultivo e submetidas às seguintes determinações: biomassa, tensão superficial, emulsificação do hexadecano, pH, rendimento em surfactante isolado e consumo de glicerol. As análises foram realizadas em triplicata e não variaram mais do que 5 %.

2.4.10 Determinação da biomassa

O crescimento do microrganismo foi acompanhado através do peso seco, obtido após centrifugação do líquido metabólico a 5000 rpm por 30 minutos e posterior secagem da biomassa em estufa a 105°C até peso constante.

2.4.11 Consumo de glicerol

O consumo de glicerol foi avaliado através do Kit enzimático para quantificação de triglicerídeos (Bioclin-Quibasa, Brasil).

2.4.12 Quantificação de Raminose

A concentração de raminolipídeos no líquido metabólico livre de células foi estimada pela determinação do conteúdo em raminose pelo método colorimétrico para determinação de açúcares totais, descrito por Dubois et al. [13].

O princípio deste método baseia-se na ação do ácido sulfúrico sobre a estrutura piranosídica do açúcar, a qual é aberta e conseqüentemente complexada pelo fenol, dando lugar a formação de uma coloração amarelo-alaranjada.

Alíquotas de 1 ml do líquido metabólico livre de células foram distribuídas em tubos de ensaio e a estes foram adicionados 0,5 ml da solução de fenol a 80% de concentração e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, em banho de gelo. Os tubos foram deixados em

repouso por 10 min e após agitados a 25-30°C procedeu-se às leituras a 490 nm. Como padrão foi utilizada uma curva de calibração de uma solução de raminose (100 µg/ml). Os brancos foram preparados substituindo a solução de açúcar por água destilada. Os valores de raminolipídeos foram determinados [1].

2.4.13 Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, amostras do líquido metabólico livre de células foram analisadas segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg [14]: 1,0 ml de um substrato oleoso (n-hexadecano, benzeno, diesel, óleo lubrificante de motor, petróleo, óleos vegetais de algodão, milho, arroz e soja) foi adicionado a 1,0 ml do líquido metabólico em tubo graduado e a mistura agitada em vortex por 2 minutos. Após 24 horas as emulsões água em óleo foram expressas em centímetros, devido à altura do halo formado.

2.4.14 Determinação das tensões superficial e interfacial e da concentração micelar crítica (CMC)

A tensão superficial foi medida no líquido metabólico livre de células em tensiômetro KSV Sigma 70 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY. O anel de platina foi imerso no líquido metabólico, registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido. A tensão interfacial contra n-hexadecano foi medida da mesma forma, para a solução do surfactante na CMC.

A CMC do biossurfactante isolado após o cultivo foi determinada automaticamente por medidas das tensões superficiais de uma amostra de água gradativamente adicionada do surfactante até se atingir um valor constante de tensão. O valor da CMC foi determinado

como g/l do biossurfactante isolado. Como controle, a tensão superficial inicial do meio de cultivo, antes da inoculação, também foi medida.

A estabilização do equipamento foi atingida até que o desvio padrão de medidas sucessivas fosse menor do que 0,4 mN/m. Cada resultado foi a média de dez determinações após a estabilização da leitura.

Entre os experimentos, a cubeta de vidro, bem como o anel de platina foram lavados sucessivamente com água e acetona, por 3 vezes. O anel também flambado em bico de Bunsen até atingir coloração avermelhada e resfriado antes do uso.

2.4.15 Avaliação da estabilidade do biossurfactante (efeitos do pH, da adição de NaCl, do tempo sob aquecimento e da temperatura)

Os efeitos de diferentes temperaturas (4, 28, 70, 100 e 120 °C), de diferentes concentrações de NaCl (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 %), de diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14) e de diferentes tempos de aquecimento a 90°C (10, 20, 40, 60 e 120 minutos) na atividade do biossurfactante foram avaliados no líquido metabólico livre de células para a tensão superficial e a atividade de emulsificação. O pH das amostras foi variado com auxílio de soluções de HCl ou NaOH 6M, enquanto que para o efeito de diferentes temperaturas as amostras foram mantidas nas temperaturas acima indicadas durante uma hora.

2.4.16 Isolamento do biossurfactante

O pH do líquido metabólico livre de células foi inicialmente ajustado para 2 com uma solução 6M de HCl. Em seguida, o mesmo volume de clorofórmio/metanol (2:1) foi adicionado ao líquido metabólico, sendo a mistura vigorosamente agitada por 15 minutos e deixada em repouso para separação das fases. A fase orgânica foi removida e a operação repetida por mais duas vezes. O produto obtido foi concentrado a partir das fases orgânicas

coletadas usando rota-evaporador, dissolvido em metanol e novamente concentrado por evaporação do solvente a 45°C, sendo posteriormente pesado [15].

2.4.17 Caracterização da mistura dos raminolipídeos por cromatografia em camada delgada

A técnica de Cromatografia em Camada Delgada foi utilizada para confirmar a produção de glicolipídeos. 0,1 g do biossurfactante isolado foi dissolvido em metanol e aplicado em Placas de sílica gel (G60, MERCK, Alemanha), desenvolvidas com o sistema clorofórmio:metanol: ácido acético (65:15:2, v/v) como eluente. A presença de gordura foi confirmada por vapores de iodo. A vaporização das placas com o reagente de Molish foi utilizada para detectar a presença de carboidratos, que foram aquecidas a 110°C por 10 minutos enquanto que a solução de ninhidrina a 1% em etanol foi utilizada para detectar a presença de aminoácidos no biossurfactante [16,17].

2.4.18 Determinação da composição em ácidos graxos do biossurfactante

A composição dos ácidos graxos do biossurfactante isolado foi analisada por cromatografia gasosa dos ácidos graxos metilados [18]. Os metil ésteres de ácidos graxos foram resuspenso em 0,5 ml de n-hexano e analisados como descrito abaixo.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gas Varian modelo CP-3380 (Californai – USA) equipado com amostrador automático CP-8200 e coluna capilar CP SIL (30 m x 0,25 mm), utilizando gás hélio com gás carregador. A temperatura do injetor e detecor (FID) foi de 250°C e a temperatura “oven” inicialmente em 130°C, ajustada para 170°C em 1°C/min e para 180°C em 3°C/min, mantida isotermicamente por 10 minutos. Os ácidos graxos foram identificados comparando os tempos de retenção das amostras com uma mistura de padrões de ácidos graxos obtidos da Sigma Chemical Company USA.

Quantidades relativas de metil ésteres foram calculados pela integração das áreas dos picos.

2.4.19 Determinação da carga iônica do biossurfactante

A carga iônica do biossurfactante foi determinada pela técnica de difusão dupla em Agar modificada [19]. Duas fileiras regularmente espaçadas de poços foram feitas em ágar de baixa viscosidade (solução a 1 %). Os poços das fileiras inferiores foram preenchidos com a solução do surfactante isolado. Cada poço da fileira superior foi preenchido com um composto puro de carga iônica conhecida. A substância aniônica selecionada foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), na concentração de 0,02 M, enquanto que a substância catiônica foi o cloreto de bário, na concentração de 0,05 M. O surgimento de linhas de precipitação entre os poços, indicativas do caráter iônico do biossurfactante, foi monitorado durante 48 horas a temperatura ambiente.

2.4.20 Determinação da toxicidade do biossurfactante

Teste de fitotoxicidade

A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada em ensaio estático através da germinação da semente e do crescimento da raiz de repolho (*Brassica oleracea*), de acordo com Tiquia et al. [20]. Soluções teste do biossurfactante isolado foram preparadas em água destilada nas concentrações de 175, 350, 520 e 700 mg/l. A toxicidade foi determinada em placas de Petri estéreis (10 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman N°1. As sementes foram previamente tratadas com NaClO, sendo 10 sementes simetricamente adicionadas por placa, que foram inoculadas com 5 ml da solução teste a 28°C. Água destilada foi utilizada como controle. Após cinco dias de incubação no escuro, a germinação

das sementes, o crescimento da raiz (≥ 5 mm) e o índice de germinação (IG) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

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

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

IG = $[(\% \text{ germinação da semente}) \times (\% \text{ crescimento da raiz})] / 100\%$

Teste da *Artemia salina*

A toxicidade do biossurfactante isolado foi avaliada utilizando-se larvas de camarão (do microcrustáceo *Artemia salina*) como indicador. As larvas foram usadas após 24 horas de incubação.

Soluções do biossurfactante em sal marinho sintético (33 mg/l) nas concentrações de 175, 350, 525 e 700 mg/l foram usadas. O líquido metabólico livre de células também foi testado. As análises foram conduzidas em frascos de penicilina de 10 ml de capacidade contendo 10 larvas em 5 ml de sal marinho sintético por frasco. As larvas contidas em cada frasco foram expostas a 5 ml das soluções do biossurfactante nas concentrações testadas durante 24 horas e depois foram observadas quanto à mortalidade [21,22]. O sal marinho sintético foi utilizado como controle. A concentração tóxica limite foi definida como a menor concentração capaz de provocar a morte do crustáceo em 24 horas.

2.4.21 Aplicação do biossurfactante na remoção de poluentes hidrofóbicos adsorvidos em areia através de ensaio cinético

A capacidade de remoção dos contaminantes hidrofóbicos petróleo e diesel adsorvidos em areia foi testada através da saturação de 20g de areia para ensaio de cimento NBR 7214 [23], cuja matéria orgânica é expressa em termos de ácido tânico; num nível não superior a 100 partes por milhão, sendo a mesma retida entre as peneiras de abertura nominal de 0,3 mm (denominação fina) e de 0,6 mm (denominação grossa), impregnadas com 10% do contaminante. Porções de 20g dos sistemas (areia e contaminante) artificialmente obtidos foram transferidas para Erlenmeyers de 250 ml, adicionando-se 40 ml de água (controle), 40 ml do líquido metabólico livre de células ou 40 ml de solução aquosa do biossurfactante isolado na CMC e cinco vezes acima da CMC. Os frascos foram agitados a 150 rpm por 24 horas, à temperatura ambiente e então, centrifugados a 2000 g por 20 minutos para separação da solução de lavagem das amostras de areia. Os percentuais dos contaminantes hidrofóbicos na areia lavada foram determinados por gravimetria, após extração com hexano [24].

2.4.22 Análises estatísticas

Os dados apresentados são as médias aritméticas de três réplicas, sendo as médias e os desvios padrão apresentados nas Tabelas de resultados. As análises foram conduzidas com o software Microsoft Excel, versão 2000 (Microsoft Corporation).

2.5 Resultados e discussão

As pesquisas desenvolvidas na área de biossurfactantes revelam a influência que a composição do meio e as condições de cultivo exercem sobre os tipos e os rendimentos dos surfactantes produzidos, sendo de fundamental importância o estudo desses parâmetros [25].

Nesse sentido, a influência da concentração da fonte de carbono, dos tipos de fonte de nitrogênio e da concentração de nitrogênio, bem como das condições de cultivo envolvendo velocidade de rotação, aeração e temperatura foram avaliadas a fim de estabelecer melhores condições de produção do biossurfactante.

2.5.1 Influência da concentração de glicerol na produção do biossurfactante

Inicialmente, a influência da concentração de glicerol foi avaliada, sendo a melhor concentração selecionada com base na maior redução de tensão superficial e no maior rendimento em biossurfactante isolado. As concentrações testadas foram selecionadas a partir de estudos prévios, bem como de resultados descritos na literatura [26]. Os resultados obtidos demonstraram que a concentração de 3% foi mais favorável em termos de tensão superficial e rendimento (Tabela 1).

Santa Anna et al. [27] estudaram o efeito da concentração de glicerol (3, 4, 5 e 6%) na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 cultivada em meio mineral contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio. Os autores observaram que a melhor produção também foi obtida com 3% de glicerol, correspondendo a uma razão C/N de 60.

Wu et al. [26] determinaram a produção de 4,9 g/l de raminolipídeos quando a *P. aeruginosa* EM1 foi cultivada em meio mineral contendo 4% de glicerol como fonte de carbono após 7 dias de fermentação, com uma redução da tensão superficial do meio para 26,4 mN/m.

A influência da concentração da fonte de carbono na produção de raminolipídeos em biorreator por *P. aeruginosa* zju.u1M foi investigada de 1 a 5%. Os resultados indicaram maior produção, de 12,54g/l, para a concentração de 4% de óleo de fritura [28].

2.5.2 Influência da fonte de nitrogênio na produção do biossurfactante

A fonte de nitrogênio, assim como a fonte de carbono, exerce grande influência na produção de biossurfactantes [29]. A partir da melhor concentração de glicerol, a influência da fonte de nitrogênio foi avaliada para as fontes orgânicas e inorgânicas mais comumente citadas na literatura, observando-se que o NaNO_3 e a milhocina forneceram os melhores resultados. Foi selecionado o NaNO_3 , considerando o baixo custo desse sal e a provável variação na composição da milhocina, o que poderia alterar os valores de tensão e rendimento obtidos em função de sua natureza residual (Tabela 2). Os sais de amônio e a uréia, por outro lado, não foram utilizados para a produção de biossurfactantes, como também demonstrado para o cultivo de *Bacillus subtilis* cultivado em 2% de sacarose [29].

Santa Anna et al., [27] também estudaram o efeito da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* PA1 cultivada em meio mineral contendo 3% de glicerol. O NaNO_3 foi mais efetivo do que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para uma razão C/N de 60, ou seja, correspondente a 0,145% de NaNO_3 , descrevendo que a limitação de nutrientes direciona o metabolismo celular para a formação de produto.

De acordo com Mulligan e Gibbs [30], a *P. aeruginosa* usa amônia, nitratos e aminoácidos como fontes de nitrogênio. A amônia pode ser assimilada pela glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.4) para formar glutamato ou, com o glutamato, pela ação da glutamina sintetase (EC 6.3.1.2.) para formar glutamina. A glutamina e o α -cetoglutarato são então convertidos em glutamato pela L-glutamina 2-oxiglutarato aminotransferase (EC 1.4.1.13). Os nitratos, por sua vez, devem ser reduzidos a nitrito e, em seguida, a amônia. Conseqüentemente, em comparação com a amônia, a assimilação de nitrato é mais lenta, simulando, assim, uma condição limitante de nitrogênio, que é favorável à produção do raminolípido [31]. Por outro lado, durante a síntese de um raminolípido, a formação do lipídeo é a etapa determinante, e a limitação de nitrogênio pode promover o acúmulo de

lipídeo.

Wu et al. [26] também observaram que o NaNO_3 foi a fonte de nitrogênio mais eficiente na produção de raminolipídeos (8,63 g/l) quando a *P. aeruginosa* EM1 foi cultivada em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono após 7 dias de fermentação.

A literatura tem demonstrado que as fontes orgânicas de nitrogênio, embora favoráveis ao crescimento celular, não favorecem a produção de surfactantes glicolipídicos [26,32,33].

Guerra-Santos et al. [34] observaram que a produção de biossurfactante foi reduzida em presença de nitrato e extrato de levedura. Quando o extrato de levedura foi omitido, a concentração de biomassa diminuiu, mas o acúmulo de raminolipídeos aumentou, indicando uma condição limitante de nitrogênio.

A bactéria *Arthrobacter paraffineus* demonstrou preferência por sais de amônio e uréia como fonte de nitrogênio, enquanto que a *P. aeruginosa* 44T1 cultivada em óleo de oliva [35] e glicose [32] e a *P. aeruginosa* CRTF-6 [36] cultivada em glicose produziram maiores quantidades de biossurfactante, medidas como redução da tensão superficial, quando utilizaram NaNO_3 em preferência aos sais de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 e NH_4Cl . Makkar e Cameotra [25], estudando a influência de diferentes fontes de nitrogênio a 0,3% de concentração também observaram a preferência do *Bacillus subtilis* MTCC2423 por íons nitrato. Por outro lado, Cha et al. [37], testando várias fontes de nitrogênio, determinaram máxima produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* EMS1 cultivada em 2% de óleo de soja com 0,3% de NH_4NO_3 . O rendimento obtido foi de 5 g/l em produto isolado. Já Prieto et al. [38], estudando a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* LBM10, embora tenham observado efeitos semelhantes entre o NH_4NO_3 (0,4%) e o NaNO_3 (0,85%) no que se refere ao rendimento de produção, observaram uma redução significativa nas emulsões formadas em presença do NH_4NO_3 , sendo o nitrato de sódio considerado a melhor fonte de nitrogênio para a produção de raminolipídeos, que atingiu um rendimento de 0,94g/l em raminose. O

sulfato de amônio e a uréia, assim como os resultados apresentados nesse trabalho, não foram considerados fontes de nitrogênio adequadas para a produção de biossurfactante.

2.5.3 Influência da concentração da fonte de nitrogênio na produção do biossurfactante

Em muitos processos fermentativos, a relação C/N é um parâmetro extremamente sensível, influenciando consideravelmente o acúmulo de metabólitos no meio de cultivo. Relações de C/N elevadas, ou seja, níveis reduzidos de nitrogênio no meio limitam o crescimento bacteriano, favorecendo o metabolismo celular em direção à produção de metabólitos. Em contrapartida, um excesso da fonte de nitrogênio direciona o substrato para a síntese de material celular, limitando relativamente o acúmulo de produtos [32].

Após a seleção da fonte de nitrogênio, a influência da concentração do NaNO_3 foi testada, observando-se melhores resultados, em termos de redução da tensão e de rendimento em surfactante isolado, para a concentração de 0,6%, o que correspondeu a uma razão C/N de 12,24 (Tabela 3). O aumento da razão C/N para 18, 46, 37,5, 75 e 150 exerceu influência negativa na produção do biossurfactante.

Os resultados obtidos nesse trabalho são semelhantes aos observados por Haba et al. [39] que variaram a concentração de NaNO_3 para 0,3, 0,4, 0,5 e 0,7%, observando que o maior rendimento em biossurfactante de *P. aeruginosa* foi obtido para 0,5% de NaNO_3 , correspondendo a uma razão C/N de 8. Benincasa e Accorsini [40] também estudaram o efeito da concentração de NaNO_3 na produção de raminolipídeos por *P. aeruginosa* LB1 cultivada em 3,2% de resíduo de refinaria nas concentrações 0,4, 0,5, 0,6 e 0,7%, observando que a maior produção, de 7,5g/l, correspondeu a uma razão C/N de 8.

Wu et al. [26], para o cultivo de *P. aeruginosa* em 4% de glicerol, obtiveram maior produção de raminolipídeos, de 7,5 g/l, quando o NaNO_3 foi utilizado na concentração de 0,2%, correspondendo a uma razão C/N de 52. Nesse mesmo trabalho observou-se que o rendimento em surfactante foi similar para razões C/N de 6,5 a 52, enquanto que o aumento

da razão para 130 provocou uma queda acentuada na produção. Por outro lado, Lima et al., [41], que estudaram a variação da concentração de NH_4NO_3 para valores de 0,125, 0,56 e 1,0% no cultivo de *P. aeruginosa* em óleo residual de fritura, após 48 horas, demonstraram maior rendimento, de 2,2 g/l calculados como raminose, para a concentração de 0,56% do sal.

2.5.4 Influência das condições de cultivo na produção do biossurfactante

A influência da velocidade de rotação na redução da tensão superficial e no rendimento em biossurfactante foi testada a 150 e 200 rpm. Os resultados obtidos demonstraram que a velocidade de 200 rpm favoreceu o acúmulo de biossurfactante, que atingiu 6,5 g/l, enquanto que o rendimento obtido a 150 rpm foi de 5,0 g/l. Por outro lado, a tensão superficial permaneceu inalterada para as duas velocidades de agitação, em torno de 27,5 mN/m.

A influência da velocidade de agitação na produção de biossurfactante foi avaliada para o cultivo em frascos de *Pseudomonas alcaligenes* em 0,5% de óleo de palma, observando-se que o aumento da velocidade de rotação de 260 para 300 favoreceu a redução da tensão superficial para 27,6 mN/m [42].

Oliveira et al. [43], por outro lado, estudando a produção de raminoliopídeos por *P. aeruginosa* cultivada em óleo de palma, observaram que a maior redução da tensão superficial, de 35 mN/m, foi observada para a velocidade de 150 rpm, enquanto que as velocidades de 50, 100 e 200 rpm provocaram aumento na tensão para 55, 39 e 51 mN/m, respectivamente.

Cunha et al. [44] 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 e 300 rpm. Desai e Banat [45]

também verificaram que o aumento da velocidade de agitação resultou na menor produção de biossurfactante por *Nocardia erythropolis*.

A *P. aeruginosa* é um microrganismo facultativo, podendo crescer em ambientes com pouca oxigenação; a produção de biossurfactantes, entretanto, envolve estágios de oxidação do substrato [43,46]. A velocidade de agitação do meio é um fator determinante, não só da mistura entre as fases aquosa e oleosa, como também da massa de oxigênio transferida às culturas nos frascos sob agitação. Consequentemente é possível que, no caso desse trabalho, onde não há fase oleosa envolvida, a velocidade de agitação tenha promovido uma taxa de transferência de oxigênio mais adequada para a maior produção de surfactante na velocidade de 200 rpm.

O efeito da aeração foi avaliado para 60, 80 e 90%, observando-se que os valores de tensão superficial (27,5 mN/m) e de rendimento em biossurfactante isolado (6,5 g/l) permaneceram inalterados. Por outro lado, Abdel-Mawgoud et al. [47] observaram máxima produção de surfactina por *Bacillus subtilis* BS5 para uma aeração de 90% e uma grande redução na produção com maiores reduções na aeração.

Vale destacar a importância da aeração dos cultivos no sentido de inibir o mecanismo de respiração anaeróbia da bactéria, o qual pode ser utilizado através do uso de nitratos como aceptores terminais de elétrons para a respiração celular. Assim, a aeração intensa pode evitar tal comportamento [32].

A influência da temperatura de cultivo na tensão superficial e no rendimento em biossurfactante isolado também foi investigada, observando-se que não houve variação desses valores nas temperaturas de 28 e 37 °C, indicando que o metabolismo da *P. aeruginosa* UCP0992 não foi afetado pelas temperaturas testadas.

Considerando que temperaturas elevadas incidem sobre um maior custo de produção, a temperatura de 28 °C foi selecionada para os experimentos descritos nesse trabalho.

De acordo com Guerra-Santos et al. [48], a faixa de temperatura compreendida entre 32-34°C resultou na maior produção de raminolipídeos por *P. aeruginosa*. Subasioglu e Cansunar [49] observaram que, para o cultivo de *P. aeruginosa* em manitol, a máxima produção de raminolipídeos foi detectada para 34,5 °C, enquanto que a partir da temperatura de 36 °C observou-se uma grande redução no rendimento em biossurfactante isolado. Por outro lado, Robert et al. [32] observaram que a temperatura de 37°C favoreceu o acúmulo de biossurfactante pela *P. aeruginosa* 44T1 cultivada em glicose, quando comparada à temperatura de 27 °C.

2.5.5 Cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante na condição selecionada

Após o estudo da influência dos constituintes do meio e das condições de cultivo, a cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante foi estabelecida para a *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em frascos de Erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio mineral (aeração de 80%), suplementado com 3% de glicerol e 0,6% de NaNO₃, como fonte de nitrogênio, a 28 °C durante 120 horas sob agitação de 200 rpm.

As cinéticas ilustradas na Fig. 1 mostram uma relação entre o crescimento do microrganismo, a redução da tensão superficial, o consumo do glicerol, a obtenção do biossurfactante e a emulsificação do hexadecano, indicando uma produção associada ao crescimento.

A produção do biossurfactante teve início nas primeiras horas da fase exponencial, demonstrando um perfil bifásico, com a primeira fase se estendendo até 24 horas, com um platô até as 48 horas de fermentação, seguida do aumento gradativo da produção, que atingiu seu máximo após 96 horas de cultivo, na fase estacionária de crescimento celular. Nesse ponto, observou-se não só o maior acúmulo em biossurfactante (8,0 g/l), como

também o menor valor de tensão superficial, que foi reduzida de 56 mN/m para 27,4 mN/m, e a maior biomassa (4,0 g/l).

A curva de consumo do glicerol apresentou um perfil semelhante à curva de tensão superficial, enquanto que a emulsificação do hexadecano acompanhou a produção do biossurfactante, confirmando a possibilidade de utilização da redução da tensão superficial e da emulsificação como parâmetros indicativos da produção de agentes tensoativos no meio. A emulsificação aumentou com o tempo, atingindo seu máximo nas 72 horas e manteve-se até o fim do cultivo, com 75-80% de emulsificação do hexadecano.

A literatura descreve a ocorrência de diferentes perfis cinéticos de produção de raminolipídeos. A *P. aeruginosa* GS3, como exemplo, produziu um biossurfactante após as células atingirem a fase estacionária de crescimento [12], embora a produção associada ao crescimento tenha sido descrita em vários outros trabalhos.

Cha et al. [37], a exemplo dos resultados obtidos nesse trabalho, observaram uma produção associada ao crescimento de *P. aeruginosa* EMS1 cultivada em 2% de óleo de soja acidificado. A maior produção de biossurfactante, de 5 g/l, foi observada após 60 horas do cultivo, com uma concentração celular de 25 g/l. A produção de biossurfactante de *P. aeruginosa* EMS1 cultivada em 2% de óleo de soja também foi descrita como sendo associada ao crescimento, observando-se uma relação paralela entre a produção do biossurfactante, o crescimento celular e a utilização do substrato. O rendimento em biossurfactante foi de 5,0 g/l. Por outro lado, a *P. aeruginosa* cultivada em meio mineral suplementado com 1% de glicerol produziu 1,0 g/l e 0,69 g/l de raminolipídeos como metabólitos secundários, após 7 dias de cultivo, com redução da tensão superficial do meio de 53 mN/m para 27,4 mN/m e 27,5 mN/m, como descrito por Rashedi et al. [50] e Santa Anna et al. [27], respectivamente.

O biossurfactante de *Pseudomonas putida* cultivada em hexadecano também foi produzido como metabólito secundário, com rendimento de 6,28 g/l após 72 horas de cultivo [51]. Os biossurfactantes de *P. aeruginosa* BS2 cultivada em hexadecano ou glicose foram

produzidos na fase estacionária de crescimento, reduzindo a tensão superficial do meio de 57 mN/m para 27 mN/m, com um rendimento de 0,97 g/l. Biossurfactantes também foram produzidos como metabólitos secundários pela mesma bactéria cultivada em resíduo de refinaria ou em soro de leite, reduzindo a tensão superficial do meio de 54 mN/m para 27 mN/m, com um rendimento de 0,91 e 0,92 g/l, respectivamente [52].

Várias pesquisas têm sido conduzidas com glicerol como fonte de carbono. Os resultados descritos na literatura são comparáveis aos obtidos nesse trabalho, demonstrando o potencial da *P. aeruginosa* UCP0992 em produzir biossurfactantes a partir do glicerol como fonte de carbono, como descrito a seguir.

A *P. aeruginosa* MTCC7815 cultivada em 2% de glicerol foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de 70 mN/m para 29,7 mN/m após 96 horas, com um rendimento de 4,25 g/l em biossurfactante isolado [53].

Rahman et al. [54] observaram a produção de 1,77 g/l de raminolipídeos pela *P. aeruginosa* DS10-129 cultivada em glicerol. Resultado semelhante foi obtido por Ciapina et al., (2006) observaram a produção de 1,7 g/l de biossurfactante quando *Rhodococcus erythropolis* foi cultivado em 1,5% de glicerol após 51 horas, com emulsificação de 67% de hexadecano.

Monteiro et al. [5] descreveram a produção de 3,9 g/l de biossurfactante pela *P. aeruginosa* DAUPE614, cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol após 9 dias de cultivo, com uma tensão superficial de 27,3 mN/m.

A maior produção de raminolipídeos por *P. aeruginosa* cultivada em meio mineral enriquecido com uma solução de minerais traço e suplementado com 3% de glicerol, foi observada após 120 horas de cultivo, atingindo um máximo de 15,4 g/l, para um crescimento celular de 2,3 g/l, como descrito por Zhang et al. [55].

O pH de um processo fermentativo exerce influência sobre a velocidade de metabolismo dos produtos. Para o cultivo da *P. aeruginosa* UCP0992, o pH da fermentação foi reduzido para 6,0 durante as primeiras 24 horas, correspondendo à menor biomassa a ao

primeiro intervalo bifásico de produção do biossurfactante a de emulsificação do hexadecano, aumentando em seguida e atingindo valores em torno de 8,5 após as 120 horas de cultivo. Em uma fermentação sem controle de pH, o valor deste, em um determinado momento, é o resultado do metabolismo do microrganismo em relação ao pH inicial, e à composição do meio. Para os experimentos conduzidos em presença de nitrato, o desenvolvimento da bactéria produziu uma alcalinização do meio, atingindo valores em torno de 8,0.

O pH dos cultivos de *P. aeruginosa* LB1 em 2% dos óleos vegetais de cupuaçu ou de buriti também atingiu valores acima de 8,0 após 120 horas de cultivo [15]. Robert et al. [32], estudando a produção de raminolipídeos por *P. aeruginosa* 44T1 cultivada em glicose, também observaram uma redução no pH para 6,0 nas primeiras 20 horas de cultivo, o qual aumentou após esse período para atingir valores em torno de 9,0 ao fim da fermentação.

As fontes de carbono utilizadas na produção de biossurfactantes podem ser divididas em três categorias: carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais. Alguns microrganismos produzem biossurfactante apenas em presença de substratos hidrofóbicos como óleos e hidrocarbonetos, outros usam apenas carboidratos, enquanto que outros usam uma grande variedade de fontes de carbono, individualmente ou combinadas. A *P. aeruginosa* é capaz de produzir compostos surfactantes a partir de várias categorias desses substratos, incluindo diferentes tipos de resíduos industriais.

A quantificação de raminolipídeos no líquido metabólico livre de células de *P. aeruginosa* UCP0992, realizada através da determinação da concentração de raminose, demonstrou a presença de 6,8 g/l. Cultivos para a produção de raminolipídeos em óleo de fritura [39], resíduo de refinaria [56], soro de leite [57] e melão de cana [12] renderam 2,7, 1,85, 1,78 e 0,24 g/l, respectivamente, em termos de raminose.

Quando a mutante *Pseudomonas putida* 300-B foi cultivada em óleos de fritura e glicose, em batelada alimentada, observou-se a produção de 4,1 g/l de biossurfactante [58].

Os resultados obtidos por Lima et al. [41] para o cultivo de *P. aeruginosa* cultivada

em óleo residual de fritura, após 48 horas, revelaram uma redução da tensão superficial para 25,7 mN/m, um percentual de 100% de emulsificação de querosene e um rendimento de 2,2 g/l, calculados como raminose.

Rocha et al. [59] observaram a máxima produção em biossurfactante (3,86 g/l) após 48h de cultivo de *P. aeruginosa* em suco de caju, com redução da tensão superficial para 29,5 mN/m e maior produção de biomassa de 1g/l.

O biossurfactante de *P. aeruginosa* MTCC2297 cultivada em meio mineral, contendo 4% de pele de laranja, reduziu a tensão superficial do meio de 57 mN/m para 31 mN/m, com um rendimento de 9,18 g/l após 192 horas de cultivo [60].

Os biossurfactantes de *P. aeruginosa* BS2 cultivada em resíduo de refinaria ou em soro de leite, reduziram a tensão superficial do meio de 54 mN/m para 27 mN/m, com um rendimento de 0,91 e 0,92 g/l, respectivamente [52].

Vários estudos têm sido conduzidos com a cepa de *P. aeruginosa* LB1. Inicialmente, a bactéria produziu 15,9 g/l de biossurfactante quando cultivada em resíduo de refinaria, em biorreator [61]. Em outra pesquisa, a *P. aeruginosa* LB1 produziu raminolípídeos em vários substratos imiscíveis como óleo de girassol, óleo de soja e óleo de oliva, fornecendo 4,9, 4,8 e 5,3 g/l em raminolípídeos [40], enquanto que Costa et al. [15] para a mesma cepa cultivada em óleo de canola, observaram a produção de 11 g/l de raminolípídeos, enquanto que o cultivo em óleo de palma permitiu o isolamento de 9,9 g/l em biossurfactante e o cultivo em óleo de buriti, 2,9 g/l. Segundo os autores, as tensões superficiais para o cultivo dessa bactéria em óleos nativos brasileiros variaram de 29,8 a 31,5 mN/m.

2.5.6 Atividade de emulsificação

Em adição à tensão superficial e/ou interfacial, a estabilidade de emulsões óleo/água também é muito utilizada como um indicador de atividade superficial, embora a habilidade

de uma molécula em formar uma emulsão estável não esteja sempre associada à redução da tensão superficial [62].

Uma emulsão é formada quando uma fase líquida encontra-se dispersa como gotas microscópicas em outra fase líquida contínua [45]. Quando um líquido é disperso em outro, as pequenas gotas formadas promovem uma grande quantidade de área interfacial e superficial. Na presença de surfactantes, as emulsões formadas podem permanecer estáveis através da redução da tensão interfacial e da redução do grau de coalescência. A estabilidade de uma emulsão está relacionada, assim, ao comportamento do equilíbrio da fase óleo/água/surfactante formada pela ação deste último [63].

A maioria dos surfactantes microbianos é específica para determinados substratos, solubilizando ou emulsificando diferentes hidrocarbonetos em proporções variáveis [64]. A capacidade reduzida ou até mesmo a total incapacidade de emulsificar alguns hidrocarbonetos pode ser devido à incapacidade de estabilizar as gotículas microscópicas.

Vários microrganismos degradadores de óleos produzem substâncias tensoativas e alguns produzem emulsões óleo-água estáveis. Esses microrganismos podem ser divididos em duas categorias; a que produz surfactantes de baixa massa molar e, usualmente, não produzem emulsões estáveis, e a que produz polímeros que agem, inicialmente, como estabilizadores de emulsões, embora não sejam capazes de alterar a tensão superficial. Em alguns casos, poucas bactérias e leveduras possuem ambas as propriedades [65,66]. Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que a *P. aeruginosa* UCP0992 possa ser incluída na última categoria de microrganismos, uma vez que a bactéria foi capaz não só de reduzir a tensão superficial do meio, como também de produzir emulsões com diferentes substratos (Tabela 4). Percentuais acima de 50% foram observados, destacando-se a capacidade do biossurfactante bruto contido no líquido metabólico livre de células após 96 horas de cultivo de emulsificar 100% de petróleo. As emulsões do tipo água em óleo apresentaram-se compactas e permaneceram estáveis por mais de seis meses à temperatura ambiente, sugerindo o uso do biossurfactante em processos de descontaminação ambiental; ou seja, a

adição do biossurfactante em processos de remediação pode aumentar a disponibilidade de hidrocarbonetos recalcitrantes [40]. Por outro lado, a capacidade de emulsificar os óleos vegetais sugere potencial de aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética.

O líquido metabólico de *P. aeruginosa* GS3 cultivada em melaço e milhocina, de forma semelhante aos resultados obtidos nesse trabalho, emulsificou 100% de petróleo, 72% de hexadecano, 73% de benzeno e 62% de óleo de oliva. As emulsões nesse trabalho também permaneceram estáveis por mais de seis meses [12].

Para o biossurfactante de *P. aeruginosa* DAUPE614 cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol, sob condições semelhantes às observadas nesse trabalho, o maior índice de emulsificação foi observado para o tolueno (86,4%), enquanto que as emulsões com gasolina, querosene e diesel atingiram entre 60 e 70% [5].

Os índices de emulsificação do óleo de girassol e do querosene pelo líquido metabólico contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* MTCC 2297 foram de 50,3% e 73,3%, respectivamente [60].

O líquido metabólico de *P. aeruginosa* LB1 cultivada em óleos nativos brasileiros emulsificou cerca de 93-100% tolueno e entre 70-92% de querosene [15], enquanto que o cultivo dessa cepa em resíduo de refinaria permitiu a emulsificação de 75% de petróleo, 60% de benzeno, 33% tolueno 50% de querosene. A estabilidade das emulsões nesse trabalho foi controlada durante 21 dias [40].

Nove amostras de *Pseudomonas* cultivadas em óleo residual de fritura reduziram a tensão superficial do meio para valores em torno de 32-34 mN/m, enquanto que as emulsões do líquido metabólico livre de células com querosene apresentaram índices entre 53 e 60%, permanecendo estáveis por mais de três meses [39].

O líquido metabólico contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* BS20 cultivada em óleo de soja emulsificou 62,5% de querosene, 54% de diesel e 62% de óleo de motor [46,47].

O líquido metabólico contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* MTCC2297 cultivada em meio mineral contendo 4% de pele de laranja, emulsificou 50,3% de óleo de girassol e 73,3% de querosene [60], enquanto que o líquido metabólico contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* ATCC 10145, cultivada em suco de caju emulsificou 71,79% de óleo de soja, 24% de hexadecano e 16,5% de querosene [59].

O líquido metabólico contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* LBM10, cultivada em meio mineral, contendo 4% óleo de soja e 0,187% de nitrato de sódio, emulsificou 56% de óleo de soja, 56% de diesel, 39% de hexano, 53% de gasolina e 52% de clorobenzeno [38].

2.5.7 Estabilidade do biossurfactante relacionada à manutenção da tensão superficial e à capacidade de emulsificação

A aplicação dos biossurfactantes no setor industrial irá requerer, sem dúvida, produtos estáveis a condições operacionais e/ou ambientais extremas. No caso da indústria petroquímica, especificamente, o uso de biossurfactantes como coadjuvantes nos processos de recuperação avançada de petróleo, conhecidos como "MEOR" (Microbial Enhanced Oil Recovery), tem sido bastante promissor, embora as condições encontradas nos reservatórios de óleo, ou seja, alta temperatura, pressão e salinidade exijam a utilização de agentes eficientes e estáveis [52,67].

A etapa de purificação de biossurfactantes representa cerca de 60% dos custos totais de produção. Considerando a indústria do petróleo e, mais especificamente, a remoção de óleos poluentes, a aplicação da maioria dos surfactantes microbiológicos exigiria a utilização do líquido metabólico obtido ao fim do cultivo ou do extrato bruto contendo o biossurfactante. Nesse sentido, a aplicação do biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 contido no líquido metabólico livre de células foi testada em condições ambientais específicas de pH, temperatura e concentrações salinas.

Inicialmente, a resistência do biossurfactante à adição de NaCl foi investigada. O biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 manteve a capacidade de redução da tensão superficial até a concentração de 10 % de NaCl, apresentando uma tendência discreta de redução da tensão proporcional ao aumento da concentração do sal. A capacidade de emulsificação dos substratos testados também permaneceu praticamente inalterada na presença do sal (Tabela 5). Esse fenômeno foi interpretado pelos achados do estudo desenvolvido por Helvaci et al. [68]. Segundo os autores da pesquisa, os eletrólitos afetam diretamente os grupos carboxílicos dos raminolipídeos. A interface ar/solução teria uma carga líquida superficial negativa devido a presença dos grupos de ácidos carboxílicos ionizados em pH alcalino com fortes forças eletrostáticas repulsivas entre as moléculas dos raminolipídeos. Essa carga negativa seria blindada pelos íons Na⁺ na dupla camada elétrica, em virtude da presença de NaCl, provocando a formação de uma monocamada empacotada reduzindo, conseqüentemente, os valores da tensão superficial.

A influência da salinidade foi avaliada em função da possibilidade de uso do biossurfactante produzido em ambientes marinhos. Considerando que a maior salinidade encontrada no mundo é de 3% (<http://en.wikipedia.org/wiki/seawater>), o biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 foi capaz de manter a capacidade de reduzir a tensão superficial na presença de até 10% de sal.

A estabilidade do biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 também foi testada para diferentes temperaturas. O biossurfactante demonstrou pequenas variações nos valores de tensão superficial e na capacidade de emulsificação durante 1 hora de incubação a temperaturas variando entre 4 a 120 °C (Tabela 6), indicando a possibilidade de uso em indústrias onde o aquecimento até temperaturas elevadas seja de importância fundamental no processo.

Estudos com o líquido metabólico livre de células, contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 em diferentes pHs, demonstraram a estabilidade da capacidade de

reduzir a tensão superficial na faixa de pH compreendida entre 4 e 12, enquanto que para os pH extremos de 2 e 14 observou-se uma redução da tensão superficial. Sugere-se que o comportamento observado tenha ocorrido em virtude da alteração de algum componente estrutural do biossurfactante. Um comportamento semelhante foi observado para a capacidade de emulsificação dos óleos vegetais testados, embora com efeito contrário nos extremos ácido e básico de pH, ou seja, uma acentuada redução nos percentuais das emulsões formadas. Já para o diesel, a emulsificação manteve-se ao longo da escala de pH, com exceção do pH 2 (Tabela 7).

Os raminolipídeos possuem ótima solubilidade em pH de neutro a alcalino. Este fenômeno é atribuído à natureza ácida desses glicolipídeos, uma vez que o pKa reportado é de 5,6. Os raminolipídeos possuem um grupo ácido carboxílico livre, correspondendo à porção β -hidróxi ácido graxo, e isto confere a natureza aniônica dos raminolipídeos. Tem sido reportado que, com o aumento do pH de 5 para 8, a carga negativa do grupo polar aumenta, ou seja, a presença de mais $[\text{OH}^-]$ aumenta a carga negativa e conseqüentemente a repulsão entre os grupos polares negativos, dificultando a micelização e aumentando, assim, a solubilidade em água, caso não se tenha o surfactante acima da CMC. Se eles estiverem em concentrações elevadas, o aumento do pH pode alterar a morfologia das estruturas formadas acima da CMC, que passam de lamelas a vesículas e, então, a micelas [47,69].

A influência do tempo de aquecimento a 90°C está apresentada na Tabela 8. Foi possível observar a manutenção da capacidade de emulsificação e da tensão superficial ao longo do intervalo de tempo testado, embora uma leve tendência ao aumento da tensão tenha sido detectada.

Resultados promissores relacionados à estabilidade sob condições salinas também têm sido demonstrados para outros surfactantes produzidos por bactérias [64,70,71].

Por outro lado, Bonilla et al. [72] observaram uma redução de 50% na atividade de emulsificação do líquido metabólico de *P. putida* ML2 cultivada em 3% de glicose após aquecimento a 110 °C por 10 minutos.

O biossurfactante de *P. aeruginosa* Bs20 cultivada em óleo de soja foi capaz de manter a tensão superficial quando submetido a 100°C por 1 hora e a 120°C por 10 minutos, na presença de sal (até 6% de NaCl) e em ampla faixa de pH (até 13) [47].

O líquido metabólico contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* LBM10 cultivada em óleo de soja emulsificou entre 40 e 60% de diferentes hidrocarbonetos, incluindo hexano, diesel, gasolina, óleo bruto e ciclohexano. A formação de emulsões estáveis foi favorecida em concentrações salinas abaixo de 0,5%, embora a retenção de 80% de sua capacidade emulsificante tenha sido observada até 3% de sal. Emulsões estáveis também foram observadas em uma faixa de pH entre 6 e 9 e em temperaturas variando de 35 a 40°C [38].

O líquido metabólico livre de células contendo os isolados de *P. aeruginosa* MTCC7815 e MTCC7812 cultivados em 2% de glicerol durante 96 horas apresentou um pequeno aumento nos valores de tensão superficial com a variação gradativa do pH de 2,5 a 11,0, com aumento de 28 a 33 mN/m e de 31 a 36 mN/m, respectivamente. Por outro lado, quando os líquidos metabólicos foram aquecidos de 5 a 60 minutos a 100°C, as tensões superficiais mantiveram-se estáveis, em torno de 31-32 e 33-34 mN/m, respectivamente [53].

Espécies de *Bacillus* também têm sido descritas como promissoras para aplicações ambientais. A capacidade de redução da tensão superficial do biossurfactante produzido por isolados de *Bacillus subtilis*, cultivados em melaço e soro de leite, permaneceu inalterada quando o líquido metabólico livre de células foi submetido a 80°C durante 9 dias, na faixa de pH de 6,0 a 12,0 e na presença de até 7% de NaCl [67]. Já o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LB5a cultivado em manipueira reteve suas propriedades tensoativas quando

exposto a elevadas temperaturas (100°C), alta salinidade (20%) e em uma ampla faixa de pH [73].

2.5.8 Caracterização do biossurfactante

Os raminolipídeos compreendem, normalmente, uma mistura das espécies homólogas R1, R2, R3 e R4, embora uma grande variação de homólogos tenha sido detectada, dependendo da cepa de *Pseudomonas*, da fonte de carbono, do meio e das condições de cultivo. Sabe-se que também as propriedades dos raminolipídeos dependem da distribuição desses homólogos, ou seja, de sua composição e distribuição, que variam de acordo com a espécie bacteriana, com as condições de cultivo e com a composição do meio de produção. Outra possibilidade para explicar as diferenças existentes pode estar em função da presença de impurezas, como ácidos graxos não metabolizados no líquido metabólico, que podem interferir nas propriedades surfactantes [60].

A maioria das pesquisas descritas na literatura a cerca da produção de biossurfactantes por espécies de *Pseudomonas* reportam a obtenção de glicolipídeos do tipo raminolipídeos, embora alguns trabalhos tenham relatado sobre a produção de exopolissacarídeos com propriedades emulsificantes [72].

O biossurfactante isolado de *P. aeruginosa* UCP0992 apresentou-se como um sólido viscoso e brilhante e de coloração marrom clara. O biossurfactante apresentou solubilidade em água e em vários solventes como clorofórmio, metanol, acetato de etila. Características semelhantes têm sido descritas na literatura para outros raminolipídeos [47].

Os testes de difusão dupla em ágar revelaram o surgimento de linhas de precipitação entre o biossurfactante produzido pela *P. aeruginosa* UCP0992 e o composto iônico selecionado (cloreto de bário) demonstrando, nas condições experimentais estudadas, o caráter aniônico do biossurfactante através da utilização de um teste bastante simples.

Resultado semelhante foi obtido para a *Pseudomonas fluorescens* 495 submetida ao mesmo teste [19].

A composição dos ácidos graxos do surfactante isolado analisada por cromatografia gasosa revelou a presença de C16:0 (42.3%) e C18:1 (39.8%) em maiores quantidades, seguido da presença de C18:0 (6.5%), C16:1 (5.5%), C18:2 (3.6%) e C12:0 (2.3%).

O biossurfactante extraído do líquido metabólico foi submetido à cromatografia em camada delgada e visualizado com reagentes específicos, produzindo pontos com diferentes valores de R_f (fator de retenção) (Fig. 2). Cinco pontos com diferentes valores de R_f , incluindo frações mais e menos móveis, demonstraram reação positiva para açúcares com o Reagente de Molish e para lipídeos com vapores de iodo, enquanto que não foram detectados grupos amínicos com ninhidrina. A presença de ambas as porções de unidades glicosídicas e lipídicas no mesmo ponto indicaram a estrutura de glicolipídeos. Esses resultados sugerem que a *P. aeruginosa* UCP0992 produziu glicolipídeos em meio com glicerol como fonte de carbono.

Os resultados obtidos nesse trabalho exibem semelhanças com relação aos perfis de separação obtidos por cromatografia em camada delgada publicados com diferentes amostras de *P. aeruginosa*.

George e Jayachandran [60], estudando a produção de biossurfactante por *P.aeruginosa* MTCC2297 cultivada em casca de laranja, detectaram pontos com R_f 0,19 (diraminolipídeos), 0,36 (monoraminolipídeos), 0,59 e 0,71 (diferentes formas raminolipídicas), 0,82 e 0,98 em placas de sílica gel, eluídas com o mesmo sistema usado nesse trabalho. Haba et al. [39], por outro lado, observaram que a *Pseudomonas* sp. cultivada em meio contendo óleos vegetais produziu dois tipos de raminolipídeos com R_f de 0,7 e 0,45, enquanto que os raminolipídeos R1 (Rha-C₁₀C₁₀, ou seja, 1 raminose e 2 ácidos graxos) e R2 (Rha-Rha-C₁₀, ou seja, 2 raminoses e 1 ácido graxo) detectados por cromatografia em coluna de sílica gel usando o mesmo sistema de solventes desse trabalho demonstraram R_f de 0,74 e 0,36, respectivamente [74]. Arino et al. [75] caracterizaram uma

mistura de raminolípídeos produzidos por *P. aeruginosa* GL1. O valor de R_f para diferentes pontos foram calculados, correspondendo a R_1 0,72 (Rha- $C_{10}C_{10}$), R_2 0,40 (Rha- C_{10}), R_3 0,32 (Rha-Rha- $C_{10}C_{10}$) e R_4 0,13 (Rha-Rha- C_{10}). Em particular, o biossurfactante raminolípídico produzido por *P. aeruginosa* AT10 cultivada em refinaria de óleo de soja foi identificado como uma mistura de sete homólogos [76].

Monteiro et al. [5], estudando a produção de raminolípídeos por *P. aeruginosa* DAAUPE614 cultivada em glicerol e nitrato de amônio, detectaram dois pontos, com orcinol como revelador, com R_f 0,55 e 0,36, representantes de monoramínolípídeos e diraminolípídeos, respectivamente. Análises posteriores dessas frações por cromatografia gasosa-espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear revelaram a presença de seis homólogos monoramínolípídicos e seis homólogos diraminolípídicos. Zhang et al. [55], estudando a produção de raminolípídeos por *P. aeruginosa* cultivada em glicerol e nitrato de sódio, também detectaram dois pontos com R_f 0,52 e 0,32. Benincasa e Accorsini [40] estudando a produção de raminolípídeos por *P. aeruginosa* LBI cultivada em óleo de girassol, também detectaram dois pontos com R_f 0,47 e 0,67, identificados como R_1 (Rha- $C_{10}C_{10}$) e R_2 (Rha-Rha- C_{10}). Parra et al., [7] detectaram a presença de dois pontos com R_f 0,45 e 0,70, também identificados como R_1 (Rha- $C_{10}C_{10}$) e R_2 (Rha-Rha- C_{10}). para a *P. aeruginosa* 44T1 cultivada em querosene. O mesmo resultado foi obtido por Zhu et al. [28] para a *P. aeruginosa*, cultivada em óleo de fritura (R_f 0,47 e 0,65). Esses dois pontos também foram detectados nos resultados descritos nesse trabalho, sugerindo a presença de mono e diraminolípídeos.

2.5.9 Tensão superficial, tensão interfacial e concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante

As propriedades tensoativas de um surfactante dependem principalmente de sua habilidade em reduzir as tensões superficial e interfacial, dos seus valores de CMC e da formação de emulsões compactas e estáveis [52].

A capacidade de reduzir a tensão superficial depende da concentração do composto tensoativo, isto é, da CMC, que é definida como a concentração mínima do surfactante requerida para reduzir ao máximo a tensão superficial da água, dando início à formação de micelas. Surfactantes eficientes possuem valores de CMC muito reduzidos, o que significa que pouco surfactante é requerido para reduzir a tensão superficial [52].

Para fins práticos, é importante fazer a distinção entre um surfactante eficiente e um surfactante eficaz. A eficiência é medida pela concentração de surfactante requerida para produzir uma redução significativa da tensão superficial da água, enquanto que a eficácia é medida pelo valor mínimo que a tensão superficial pode atingir [70,77].

O biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 70 mN/m para 29 mN/m para uma concentração de 700mg/l (Fig. 3) e a tensão interfacial da mistura água/hexadecano de 40 m/N para 2 mN/m.

O valor de CMC encontrado difere bastante do valor de 53 mg/l reportado para a mistura de raminolípideos produzidos por *P. aeruginosa* UG2, cultivada em óleo de milho [78] ou de 230 mg/l, encontrado para uma mistura de sete homólogos [76] ou de 120 mg/l, encontrado para a mistura de seis homólogos de *P.aeruginosa* LB1 cultivada em resíduo de refinaria de óleo de soja [1].

Já a biossurfactante de *P. aeruginosa* DAUPE614, cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol apresentou uma CMC de 13,9 mg/l, para uma tensão superficial de 30 mN/m [5], enquanto que Santa Anna et al. [27], estudando a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* PA1 cultivada em meio mineral, contendo 3% de glicerol observaram uma CMC de 190 mg/l para uma tensão superficial de 27 mN/m. Robert et al. [35], por outro lado, obtiveram, para a *P. aeruginosa* 44T1 cultivada em 2% de glicerol, uma CMC de 20 mg/l, para uma tensão de 30 mN/m, enquanto que o biossurfactante de uma

amostra de *P. aeruginosa*, cultivada em meio mineral suplementado com 5% de glicerol, apresentou uma CMC de 19 mg/l para uma tensão de 27 mN/m [50].

Os valores de CMC de misturas de surfactantes obtidos do cultivo de *P. aeruginosa* LB1 em óleos nativos brasileiros variaram de 29,8 a 31,5 mN/m, com CMC entre 55 e 163 mg/l, sendo a tensão interfacial contra hexadecano reduzida de 40 mN/m para valores abaixo de 1,8 mN/m [15]. Já o biossurfactante de *P. aeruginosa* Bs20 cultivada em óleo de soja reduziu a tensão superficial da água para 30 mN/m a uma concentração de 13,4 mg/l [47].

A mutante *P. putida* 300-B cultivada em óleos de fritura e glicose, em batelada alimentada, apresentou uma CMC de 91mg/l e tensão superficial de 31,2 mN/m nesse ponto [58]. Valores de CMC em torno de 230 mg/l foram encontrados para o biossurfactante de *P. aeruginosa* AT10 cultivada em óleo de soja [79], enquanto que os raminolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* GS3 cultivada em melão e milhocina foram capazes de reduzir a tensão interfacial do líquido metabólico livre de células contra óleo bruto de 21 mN/m para 0,47 mN/m, embora a máxima produção de biossurfactante tenha alcançado apenas valores em torno de 0,24 g/l em raminose [12].

Bai et al. [80] obtiveram tensões interfaciais de 1mN/m com o biossurfactante de *P. aeruginosa* (CMC de 50 mg/l), de 9,6 mN/m com o surfactante sintético não iônico Tween 80 e de 25,2 mN/m com o surfactante sintético aniônico SDS, usados no sistema água-hexadecano a uma concentração de 500 mg/l.

Biossurfactantes isolados recentemente da bactéria *Micrococcus luteus* BN56 foram capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 24,1 mN/m e a tensão interfacial entre água e hexadecano de 43 mN/m para 1,7 mN/m. A CMC desses surfactantes foi de 25 mg/l [81].

As variações nos valores de CMC observados entre os diferentes raminolipídeos produzidos se devem, muitas vezes, aos graus de pureza dos produtos isolados [47]. Devido à variação intrínseca dos raminolipídeos acumulados e à complexidade de sua composição,

número e proporção de homólogos, quantidade de insaturações e comprimento das cadeias de ácidos graxos, que influenciam o arranjo molecular das estruturas em solução, os valores de tensão superficial variam bastante entre os raminolipídeos produzidos [40]. A proporção entre os homólogos produzidos, por sua vez, também pode variar em função da bactéria, do meio e das condições de cultivo [79].

2.5.10 Toxicidade do biossurfactante

O biossurfactante de *P.aeruginosa* foi testado quanto a sua toxicidade utilizando-se uma hortaliça e um microcrustáceo.

Os testes com a *Artemia salina* demonstraram que o biossurfactante provocou 100 e 50% de letalidade quando testado em elevadas concentrações, de 700 e 525 mg/l, respectivamente, enquanto que não houve letalidade para as demais concentrações testadas e para o líquido metabólico livre de células. Por outro lado, Wang et al., [82] demonstraram o potencial algicida dos raminolipídeos de *P. aeruginosa* contra espécies da nociva alga bloom (*Heterosigma akashiwo*) acima de 0,4 mg/l. Os testes de toxicidade aguda do surfactante JE1058BS produzido pela bactéria *Gordonia* sp., para duas espécies de larvas marinhas, *Mysidopsis bahia* (camarão) e *Menidia beryllina* (peixe), também demonstraram a baixa toxicidade desse biossurfactante [83].

O índice de germinação (IG), que combina as medidas da germinação relativa das sementes e o crescimento relativo das raízes foi utilizado para avaliar a toxicidade do biossurfactante frente ao repolho (*Brassica oleracea*). Considerando que um IG de 80% tem sido utilizado como indicador do desaparecimento da fitotoxicidade [20], os resultados obtidos indicaram que as soluções testadas não apresentaram efeito inibitório sobre a germinação das sementes e sobre o alongamento das raízes do repolho, uma vez que IG de 245, 187, 132 e 86% foram obtidos para soluções do biossurfactante isolado nas concentrações de 175, 350, 520 e 700mg/l, respectivamente. Foi possível visualizar,

também, o crescimento de raízes secundárias e o surgimento de folhas para todas as soluções testadas.

2.5.11 Aplicação do biossurfactante na remoção de poluentes hidrofóbicos adsorvidos em areia através de ensaio cinético

A despeito da possibilidade de inúmeras aplicações dos biossurfactantes, a indústria petroquímica apresenta maior potencial para essas biomoléculas, uma vez que requer especificações mínimas de pureza, de modo que o líquido metabólico possa ser usado, eliminando as etapas de purificação que representam cerca de 60% do custo total de produção [45,52].

Os biossurfactantes podem aumentar a remoção de poluentes hidrofóbicos através dos processos de solubilização e mobilização [80]. A capacidade de solubilização depende da habilidade do surfactante em aumentar a solubilidade dos constituintes hidrofóbicos na fase aquosa. Um grande aumento desta capacidade é observado acima da CMC, a qual é atribuída à partição do hidrocarboneto no sítio hidrofóbico das micelas surfactantes. Neste processo, maiores concentrações em surfactantes são normalmente requeridas uma vez que a solubilidade dos constituintes dos hidrocarbonetos na solução surfactante dependerá totalmente da concentração do surfactante [80].

A mobilização pode ser dividida em deslocamento e dispersão. O deslocamento consiste na liberação de gotas de hidrocarbonetos do meio poroso devido à redução na tensão interfacial. Partindo de uma explicação teórica, os hidrocarbonetos serão removidos se a tensão interfacial entre a fase aquosa e a fase oleosa for suficientemente reduzida a fim de superar as forças de capilaridade que causam a formação da saturação residual. A dispersão é o processo no qual o hidrocarboneto é disperso na fase aquosa como emulsões muito pequenas. As emulsões não são normalmente estáveis termodinamicamente. Contudo, elas podem permanecer estáveis por períodos significantes de tempo em função

de restrições cinéticas. A dispersão está relacionada à tensão interfacial e à concentração do surfactante e difere do deslocamento uma vez que o processo de deslocamento está relacionado apenas à tensão interfacial entre as fases aquosa e hidrofóbica, sem formação de emulsões [80].

A eficiência de um surfactante na remoção de compostos hidrofóbicos depende também do pH e da força iônica da solução, que pode alterar a configuração dos agregados micelares e a sorção do surfactante ao solo. A sorção do surfactante ao solo limita, por sua vez, o transporte do hidrocarboneto pelo surfactante. Os raminolipídeos são considerados bons exemplos de surfactantes aniônicos uma vez que são menos retidos pelo solo do que outros surfactantes não iônicos ou neutros devido à carga negativa superficial dos solos [84].

Nesse sentido, a capacidade do biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 em remover compostos hidrofóbicos adsorvidos em areia foi avaliada no líquido metabólico livre de células e em soluções do surfactante isolado na e acima da CMC (Tabela 9).

Percentuais elevados de remoção de diesel foram observados para todas as soluções testadas, embora o biossurfactante não tenha demonstrado eficiência em remover o petróleo nas condições estudadas nesse trabalho. O tamanho das partículas das amostras de areia padrão usadas e o aumento da concentração do surfactante isolado, por sua vez, não exerceram grande influência na remoção dos poluentes. Observou-se que o líquido metabólico contendo o biossurfactante foi bastante eficiente na remoção de diesel, indicando a possibilidade de utilização do biossurfactante bruto em processos de remoção, o que representa uma significativa economia no processo, uma vez que as etapas de isolamento e purificação tornam-se desnecessárias.

É possível sugerir que o biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 utilizou o mecanismo de deslocamento para liberar as gotas de óleo adsorvidas na areia, uma vez que o aumento da concentração não aumentou o percentual de remoção dos poluentes.

Bai et al. [80] investigaram o potencial do raminolipídeo aniônico isolado de *P.*

aeruginosa adsorvido em solo em colunas empacotadas. O biossurfactante foi capaz de remover 84% de hexadecano adsorvido em areia de 20-30 mesh (0,6-0,85 mm), enquanto que 22% de remoção foram obtidos quando areia de 40-50 mesh (0,3-0,42 mm) foi utilizada. A capacidade de remoção do raminolípido foi comparada com a capacidade de remoção dos surfactantes sintéticos SDS (CMC de 2360 mg/l), também aniônico, e Tween 80 (mono oleato de sorbitana polioxietileno 20) (CMC de 13 mg/l), não iônico, utilizados em concentração de 500 mg/l, para areia de 40/50 mesh. O SDS (472 mg/l) e o Tween 80 (51 mg/l) removeram 0 e 6% do hexadecano, respectivamente.

Por outro lado, a capacidade do surfactante sintético SDS em remover diesel adsorvido em solo contido em coluna demonstrou que, enquanto a água, adicionada como controle, foi capaz de remover 24,7% do diesel, o SDS removeu 97% do combustível. Nesse trabalho foi observada a influência de fatores como a concentração de surfactante e o tempo de contato na cinética de remoção do poluente [85].

Concentrações elevadas (2,5 e 5,0 g/l) do biossurfactante isolado da *P. aeruginosa* 57SJ, que apresentou uma CMC de 400 mg/l, foram necessárias para remover 70% de pireno adsorvido em solo com tamanho de partículas de 2 mm [84].

O líquido metabólico livre de células contendo os isolados de *P. aeruginosa* MTCC7815, MTCC7812 e MTCC8165 cultivados em 2% de glicerol removeram cerca de 49-54% do óleo bruto contido em colunas empacotadas [53].

O líquido metabólico contendo o biossurfactante de *Rhodococcus erythropolis* cultivado em 1,5% de glicerol removeu cerca de 94% após 120 minutos de agitação a 100 rpm em frascos contendo solo contaminado com óleo bruto. Após a lavagem, a fase oleosa manteve-se dispersa na fase aquosa, caracterizando o fenômeno de remoção associado ao processo de dispersão e deslocamento [86].

Resultados obtidos por Abu-Ruwaida et al. [87] para o líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante produzido por *Rhodococcus*, demonstraram remoções de 86 % de óleo bruto residual adsorvido em areia. Uma pesquisa mais recente com um

biossurfactante também produzido por *Rhodococcus* cultivado em n-hexadecano revelou a habilidade do polímero em remover 82 % de óleo bruto contido em coluna [88].

Makkar e Cameotra [29] demonstraram que o biossurfactante isolado de *Bacillus subtilis* foi capaz de remover 56 % do óleo adsorvido em areia contida em coluna, enquanto que os biossurfactantes produzidos por espécies de *Bacillus* cultivados em resíduos (melaço e soro de queijo) em condições termofílicas removeram cerca de 30 % do óleo contido em coluna [67].

O biossurfactante designado como JE1058BS, produzido por *Gordonia* sp. JE-1058, em condições experimentais semelhantes às utilizadas nesse trabalho, removeram cerca de 80% do óleo bruto adsorvido em areia (tamanho de partícula de 3-6 mm), quando adicionado numa concentração de 40 mg/l [83].

2.6. Conclusões

O uso de glicerol como fonte de carbono constitui uma alternativa atrativa para a produção de biossurfactantes, uma vez que a demanda mundial de biodiesel tem disponibilizado uma quantidade cada vez maior desse substrato a custos reduzidos. Os raminolipídeos produzidos pela *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 apresentam atividade superficial altamente estável e habilidade de emulsificação a altas temperaturas, diferentes pHs e em condições salinas elevadas. O líquido metabólico contendo o surfactante bruto apresenta baixa toxicidade e capacidade de remoção de cotaminantes oleosos, demonstrando, em consequência, elevado potencial para aplicações industriais e ambientais a um baixo custo, onde poderá ser utilizado na recuperação de óleos, na limpeza de reservatórios e como coadjuvante na biorremediação de solos contaminados com poluentes hidrofóbicos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Universidade Católica de Pernambuco, Brasil.

Referências

- [1] M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira, A. Manresa, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85 (2004) 1.
- [2] M. Benincasa, *Curr. Microbiol.* 54 (2007) 445.
- [3] J. Sabaté, M. Vinas, A.M. Solanas, *Int. Biodeterioration Biodegradation*, 54 (2004) 19.
- [4] M. Sánchez, F.J. Aranda, M.J. Espuny, A. Marqués, J. A. Teruel, A. Manresa, A. Ortiz, *J. Colloid Int. Sci.* 307 (2007) 246.
- [5] S.A. Monteiro, G.L. Sasaki, L.M. Souza, J.A. Meira, J.M. Araújo, D.A. Mitchell, L.P. Ramos, N. Krieger, *Chem. Phys. Lipids*, 147 (2007) 1.
- [6] S. Lang, D. Wullbrandt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (1999) 22.
- [7] J.L. Parra, J. Guinea, M.A. Manresa, M. Robert, M.E. Mercadè, F. Comelles, M.P. Bosch, *JAOCS* 66 (1989) 141.
- [8] T. Morita, M. Konishi, T. Fukuoka, T. Imura, D. Kitamoto, *J. Biosci. Bioeng.* 104 (2007) 78.
- [9] E. R. Easterling, W.T. French, R., Hernandez, M. Licha, *Biores. Technol.* 100 (2009) 356.
- [10] Y.C. Sharma, B. Singh, S.N. Upadhyay, *Fuel* 87 (2008) 2355.
- [11] G.P. Silva, M. Mack, J. Contiero, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 30.
- [12] R.M. Patel, A.J. Desai, *Letf. Appl. Microbiol.* 25 (1997) 91.
- [13] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350.
- [14] D.G. Cooper, B.G. Goldenberg, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 224.
- [15] S.G.V.A.O. Costa, M. Nitschke, R. Haddad, M.N. Eberlin, J. Contiero, *Process Biochem.* 21 (2005) 1593.
- [16] M. Deshpande, L. Daniels, *Biores. Technol.* 54 (1995) 143.

- [17] A.S. Santos, A.P.W. Sampaio, G.S. Vasquez, L.M.S. Anna, N. Pereira Jr., D.M.G. Freire, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98 (2002) 1025.
- [18] D.R. Durham, W.E. Kloos, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28 (1978) 228.
- [19] T. Meylheuc, C.J. Van Oss, M.N. Bellon-Fontaine, *J. Appl. Microbiol.* 91 (2001) 822.
- [20] S.M.Tiquia, N.F.Y.Tam, I.J. Hodgkiss, *Environ. Poll.* 93 (1996) 257.
- [21] B.N.N.R. Meyer, J.E. Ferrigni, L.B. Putnam, D.E. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, *Journal Med. Plant Res.* 45 (1982) 31.
- [22] National Committee for Clinical Laboratory Standards, 8th edition, M2-A8 v. 23, n. 1 replaces M2-A7, v. 20, n.1. NCCLS: Wayne, PA, USA, 2003.
- [23] 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).
- [24] J.M. Luna, L.A. Sarubbo, G.M. Campos-Takaki, *Brazilian Arch. Biolo. Technol.* 52 (2009) 785.
- [25] R.S. Makkar, S.S. Cameotra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (2002) 428.
- [26] J-Y Wu, K-L. Yeh, W-B. Lu, C-L. Lin, J-S. Chang, *Biores. Technol.*, 99 (2008) 1157.
- [27] I.M. Santa Anna, G.V. Sebastian, N. Pereira Jr., T.L.M. Alves, E.P. Menezes, D.M.G. Freire, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91 (2002) 459.
- [28] Y .Zhu, J-J. Gan, G-L. Zhang, B. Yao, W-J. Zhu, Q. Meng, *J. Zhejiang University SCIENCE* 8 (2007) 1514.
- [29] R.S. Makkar, S.S. Cameotra, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20 (1998) 48.
- [30] C.N. Mulligan, B.F. Gibbs, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (1989) 3016.
- [31] W.P. Barber, D.C. Stukcey, *Water Res.*, 34 (2000) 2413.
- [32] M. Robert, 1991
- [33] H.S. Kim, J.W. Jeon, B.H. Kim, C.Y. Ahn, H.M. Oh, B.D. Yoon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (2006) 391.
- [34] L.H. Guerra-Santos, O. Käppeli, A. Fiechter, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 301.

- [35] M. Robert, M.E., Mercadé, M.P. Bosch, J.L. Parra, M.J. Espuny, M.A. Manresa, J. Guinea, *Biotechnol. Lett.* 11, (1989) 871.
- [36] K.V. Ramana, N.G. Kranth, *Biotechnol. Lett.* 11 (1989) 437.
- [37] M. Cha, N. Lee, M. Kim, M. Kim, S. Lee, *Biores. Technol.* 99 (2008) 2192.
- [38] L.M. Prieto, M. Michelin, J.F.M. Burkert, S.J. Kalil, C.A.V. Burkert, *Chemosphere*, 71 (2008) 1781.
- [39] E. Haba, M.J. Espuny, M. Busquets, A. Manresa, *J. Appl. Microbiol.*, 88 (2000) 379-387.
- [40] M. Benincasa, F.R. Accorsini, *Biores. Technol.*, 99 (2008) 3843.
- [41] C.J.B. Lima, F.P. França, E.F.C. Sérvulo, M.M. Resende, V.L. Cardoso, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 7 (2007) 136.
- [42] F.J.S. Oliveira, L. Vazquez, N.P. Campos, F.P. França, *Process Biochem.* 44 (2009) 383.
- [43] F.J.S. Oliveira, L. Vazquez, N.P. Campos, F.P. França, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 6, (2006) 727.
- [44] C.D. Cunha, M. Rosário, A.S. Rosado, S.G.F. Leite, *Process Biochem.* 39 (2004) 2277.
- [45] J.D. Desai, I.M. Banat, *Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 47.
- [46] R.M. Mayer, G. Soberon-Chavez, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (2000) 625.
- [47] A.M. Abdel-Mawgoud, M.M. Aboulwafa, N.A-H. Hassouna, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157 (2009) 329.
- [48] L. Guerra-Santos, O. Kappeli, A. Fiechter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24 (1986) 443.
- [49] T. Subasioglu, E. Cansunar, *J. Appl. Biol. Sci.* 2 (2008) 31.
- [50] H. Rashedi, E. Jamshidi, M. Mazaheri Assadi, B. Bonakdarpour, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2 (2005) 121.
- [51] V. Pruthi, S.S. Cameotra, *J. Surf. Det.* 6 (2003) 65.
- [52] K. Dubey, A. Juwarkar, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (2001) 61.
- [53] N.K. Bordoloi, B.K. Konwar, *Colloids Surf. B*, 63 (2008) 77.

- [54] K.S. Rahmam, T.J. Rahman, S. Mcclean, R. Marchant, I.M. Banat, *Biotechnol. Progress*, 18 (2002) 1277.
- [55] G-L. Zhang, Y-T. Wu, X-P. Qian, Q. Meng, *J. Zhejiang, University SCIENCE 6B* (2005) 725.
- [56] A.K. Koch, J. Reiser, O. Kappeli, A. Fiechter, *Biotechnol.* 51 (1988) 1335.
- [57] P.S. Babu, A.N. Vaidya, A.S. Bal, R. Kapur, A. Juwarkar, P. Khanna, *Biotechnol. Lett.*
- [58] Z. A. Raza, M.S. Khan, Z. M. Khalid, *Process Biochem.* 42 (2007) 686.
- [59] M.V. Rocha, M.C.M. Souza, S.C.L. Benedicto, M.S. Bezerra, G.R. Macedo, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 7 (2007) 188.
- [60] S. George, K. Jayachandran, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, DOI 10.1007/s12010-008-8337-6, 2009.
- [61] M. Benincasa, J. Contiero, M.A. Manresa, I.O. Moraes, *J. Food Eng.* 54 (2002) 283.
- [62] N.H. Youssef, K.E. Duncan, D.P. Nagle, K.N. Savage, R. M. Hnapp, M.J. Mcinerney, *J. Microbiol. Meth.* 56 (2004) 339.
- [63] K. Urum, T. Pekdemir, *Chemosphere*, 57 (2004) 1139.
- [64] M.O. Ilori, C.J. Amobi, A.C. Odocha, *Chemosphere* 61 (2005) 985.
- [65] H. Bredholt, K. Josefsen, A. Vatland, P. Bruheim, K. Eimhjellen, *Canadian J. Microbiol.* 44 (1998) 330.
- [66] L.A. Sarubbo, J.M. Luna, G.M. Campos-Takaki, *Eletronic J Biotechnol.* 9 (2006) 400.
- [67] S. Joshi, C. Bharuch, S. Jha, S. Yadav, A. Nerurkar, A.J. Desai, *Biores. Technol.* 99 (2008) 195.
- [68] S.S. Helvacı, S. Peker, G. Ozdemir, *Colloids Surf. B, Biointerf.* 35 (2004) 225.
- [69] K.-H. Shin, K.-W. Kim, Y. Ahn, *J. Haz. Mat. B-137* (2006) 1831.
- [70] S.H. Kim, E.J. Lim, S.O. Lee, J.D. Lee, T.H. Lee, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31 (2000) 249.
- [71] M.A. Luna-Velasco, F. Esparza-García, R.O. Cañizares-Villanueva, A. Rodríguez-Vázquez, *Process Biochem.* 42 (2007) 310.

- [72] M. Bonilla, C. Olivaro, M. Corona, A. Vazquez, M. Soubes, *J. Appl. Microbiol.* 98 (2005) 456.
- [73] M. Nitschke, G.M. Pastore, *Biores. Technol.*, 97 (2006) 336.
- [74] T. Schenk, I. Schupan, B. Schmidt, *J. Chrom. A*, 693 (1994) 7.
- [75] S. Arino, R. Marchal, J.P. Vandecasteele, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 (1996) 162.
- [76] A. Abalos, A. Pinazo, M.R. Infante, M. Casals, F. García, A. Manresa, *Langmuir*, 17 (2001) 1367.
- [77] S-C. Lee, S-J. Lee, S-H. Kim, I-H. Park, Y-S. Lee, S-Y. Chung, Y-L. Choi, *Biores. Technol.*, 99 (2008) 2288.
- [78] J.C. Mata-Sandoval, J. Karns, A. Torrents, *J. Chrom. A*, 864 (1999) 211.
- [79] E. Haba, A. Abalos, O. Jáuregui, M.J. Espuny, A. Manresa, *J. Surf. Det.* 6 (2003) 155.
- [80] G. Bai, M.L. Brusseau, R.M. Miller, *J. Contaminant Hydrology*, 25 (1997) 157.
- [81] B. Tuleva, N. Christova, R. Cohen, D. Antonova, T. Todorov, I. Stoineva, *Process Biochem.* 44, (2009) 135.
- [82] X. Wang, L. Gong, S. Liang, X. Han, C. Zhu, Y. Li, *Harmful Algae* 4 (2005) 433.
- [83] H. Saeki, K.M. Sasaki, O. Komatsu, A. Miura, H. Matsuda, *Biores. Technol.*, 100 (2009) 572.
- [84] F. Bordas, P. Lafrance, R. Villemur, *Environ. Pollution*, 138 (2007) 69.
- [85] R. Khalladi, O. Benhabilesa, F. Bentahara, N. Moulai-Mostefab, *J. Haz. Mat.*, 164 (2009) 1179.
- [86] E.M.P. Ciapina, W.C. Melo, L.M.M. Santa Anna, A.S. Santos, D.M.G. Freire, N. Pereira Jr., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 6 (2006) 880.
- [87] A.S. Abu-Ruwaida, I.M. Banat, S. Haditiro, A. Salem, M. Kadri, *Acta Biotechnol.* 11 (1991) 315.
- [88] M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina, S.O. Makarov, L.V. Litvinenko, C.J. Cunningham, *J.C. Philip, Environ. Int.* 31 (2005) 155.

Tabela 1

Influência da concentração do glicerol na redução da tensão superficial e no rendimento em biossurfactante isolado de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral durante 120 horas

Glicerol (%)	Tensão superficial (mN/m)	Rendimento (g/l)
2	28,50±0,20	2,05±0,09
3	28,30±0,10	3,40±0,05
5	28,00±0,31	3,00±0,06
7	30,00±0,25	3,50±0,04

Tabela 2

Influência da fonte de nitrogênio, na concentração de 0,2%, na redução da tensão superficial e no rendimento em biossurfactante isolado de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral durante 120 horas

Fonte de nitrogênio	Tensão superficial (mN/m)	Rendimento (g/l)
NaNO ₃	28,30±0,01	3,30±0,03
Uréia	43,29±0,51	ND
(NH ₄) ₂ SO ₄	50,50±0,73	ND
Peptona	36,50±0,42	ND
(NH ₄)NO ₃	39,20±0,44	ND
Milhocina	28,20±0,23	2,50±0,05
Extrato de levedura	32,00±0,18	ND

ND = não determinado

Tabela 3

Influência da concentração de NaNO_3 na redução da tensão superficial e no rendimento em biossurfactante isolado de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral durante 120 horas

Concentração de NaNO_3 (%)	Tensão superficial (mN/m)	Rendimento (g/l)
0,05	30,00±0,10	2,0±0,07
0,10	30,00±0,50	2,3±0,01
0,20	28,30±0,09	3,3±0,03
0,40	27,80±0,12	3,5±0,05
0,60	27,40±0,35	5,5±0,02

Tabela 4

Emulsificação de substratos hidrofóbicos pelo líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3 % de glicerol durante 96 horas

Substrato	Índice de emulsificação (%)
Óleo de algodão	60,0±5,12
Óleo de milho	58,1±3,42
Óleo de arroz	57,2±3,00
Óleo de soja	40,5±2,50
Hexadecano	75,2±4,52
Benzeno	56,3±5,02
Óleo de motor	50,2±5,70
Diesel	53,7±3,24
Petróleo	100,0±5,32

Tabela 5

Influência da adição de NaCl na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3 % de glicerol durante 96 horas

NaCl (%)	Tensão superficial (mN m⁻¹)	Índice de emulsificação (%)^a	Índice de emulsificação (%)^b	Índice de emulsificação (%)^c
2,0	27,9±0,15	62,5±5,10	59,3±5,10	56,1±3,00
4,0	27,4±0,10	58,5±5,02	62,5±2,09	60,0±3,07
6,0	27,0±0,12	59,3±3,17	62,5±4,47	60,2±2,52
8,0	27,0±0,20	56,2±4,28	51,4±3,52	60,1±4,02
10,0	26,5±0,30	57,0±4,30	55,1±3,07	58,3±5,34

^a Índice de emulsificação do óleo algodão

^b Índice de emulsificação do óleo de milho

^c Índice de emulsificação do óleo de diesel

Tabela 6

Influência da temperatura na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol durante 96 horas

Temperatura (°C)	Tensão superficial (mN m ⁻¹)	Índice de emulsificação (%) ^a	Índice de emulsificação (%) ^b	Índice de emulsificação (%) ^c
4	28,0±0,34	58,0±5,11	54,3±4,38	50,2±3,00
28	28,5±0,42	60,2±4,02	58,0±2,85	53,4±2,89
70	29,0±0,39	60,1±5,00	58,1±3,27	53,2±3,49
100	29,5±0,35	55,5±3,03	56,5±4,15	55,4±2,31
120	30,0±0,28	53,5±4,30	55,1±5,02	56,8±3,02

^a Índice de emulsificação do óleo algodão

^b Índice de emulsificação do óleo de milho

^c Índice de emulsificação do óleo de diesel

Tabela 7

Influência do pH na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol durante 96 horas

pH	Tensão superficial (mN m ⁻¹)	Índice de emulsificação (%) ^a	Índice de emulsificação (%) ^b	Índice de emulsificação (%) ^c
2	24,0±0,35	22,0±2,97	17,0±5,12	30,0±3,24
4	26,1±0,12	46,1±3,08	46,0±3,80	50,0±3,02
6	26,5±0,41	60,0±4,09	60,1±2,35	50,0±2,95
8	28,5±0,32	60,0±4,03	58,2±3,21	53,0±3,45
10	29,0±0,42	58,2±2,51	51,0±4,57	60,0±3,01
12	28,5±0,22	60,0±3,15	60,0±3,43	53,0±3,32
14	24,3±0,52	20,0±4,00	11,1±5,13	53,0±4,00

^a Índice de emulsificação do óleo algodão

^b Índice de emulsificação do óleo de milho

^c Índice de emulsificação do óleo de diesel

Tabela 8

Influência do tempo de aquecimento a 90°C na capacidade de redução da tensão superficial e na estabilidade da atividade de emulsificação do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol durante 96 horas

Tempo (minutos)	Tensão superficial (mN m⁻¹)	Índice de emulsificação (%)^a	Índice de emulsificação (%)^b	Índice de emulsificação (%)^c
10	29,3±0,12	54,0±3,30	57,1±2,80	60,0±3,81
20	29,3±0,10	53,1±2,81	55,0±3,02	60,0±4,10
40	29,6±0,08	60,0±3,09	55,0±4,09	58,3±4,24
60	29,7±0,09	60,0±3,31	55,0±3,32	60,0±2,51
120	29,9±0,05	54,2±2,13	55,0±2,55	58,0±4,27

^a Índice de emulsificação do óleo algodão

^b Índice de emulsificação do óleo de milho

^c Índice de emulsificação do óleo de diesel

Tabela 9

Percentuais de remoção de petróleo e diesel adsorvidos em areia fina e grossa pelo líquido metabólico livre de células de *P. aeruginosa* UCP0992 (biossurfactante bruto), por soluções do biossurfactante isolado e por água destilada (controle)

Removedor	Remoção (%)			
	Areia fina (0,3-0,42 mm)		Areia grossa (0,6-0,85 mm)	
	Diesel	Petróleo	Diesel	Petróleo
Líquido metabólico livre de células	87,5±0,5	10,0±0,6	85,4±0,3	0
Biossurfactante isolado na CMC (700mg/l)	95,0±0,4	20,0±0,9	95±0,5	10,0±0,9
Biossurfactante isolado em concentração cinco vezes superior à CMC (3500mg/l)	91,0±0,5	10,0±0,7	90,0±0,4	7,0±0,8
Água destilada (controle)	50,0±0,1	0	45,2±0,2	0

Fig. 1. Curvas de crescimento, pH, tensão superficial, rendimento em biossurfactante isolado e emulsificação do hexadecano de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3,0 % de glicerol e 0,6% de NaNO₃ a 28°C durante 120 horas a 200 rpm

Fig. 2. Componentes raminolipídicos detectados por Cromatografia em Camada Delgada. Amostras aplicadas em volumes de 20 µL em placas de sílica gel desenvolvidas com o sistema clorofórmio:metanol:ácido acético (65:15:2, v/v) como eluente. As placas foram reveladas com vapores de iodo e com o Reagente de Molish, seguido de aquecimento a 110 °C por 10 minutos.

Fig. 3. Concentração Micelar Crítica do biossurfactante isolado de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em meio mineral suplementado com 3% de glicerol durante 96 horas

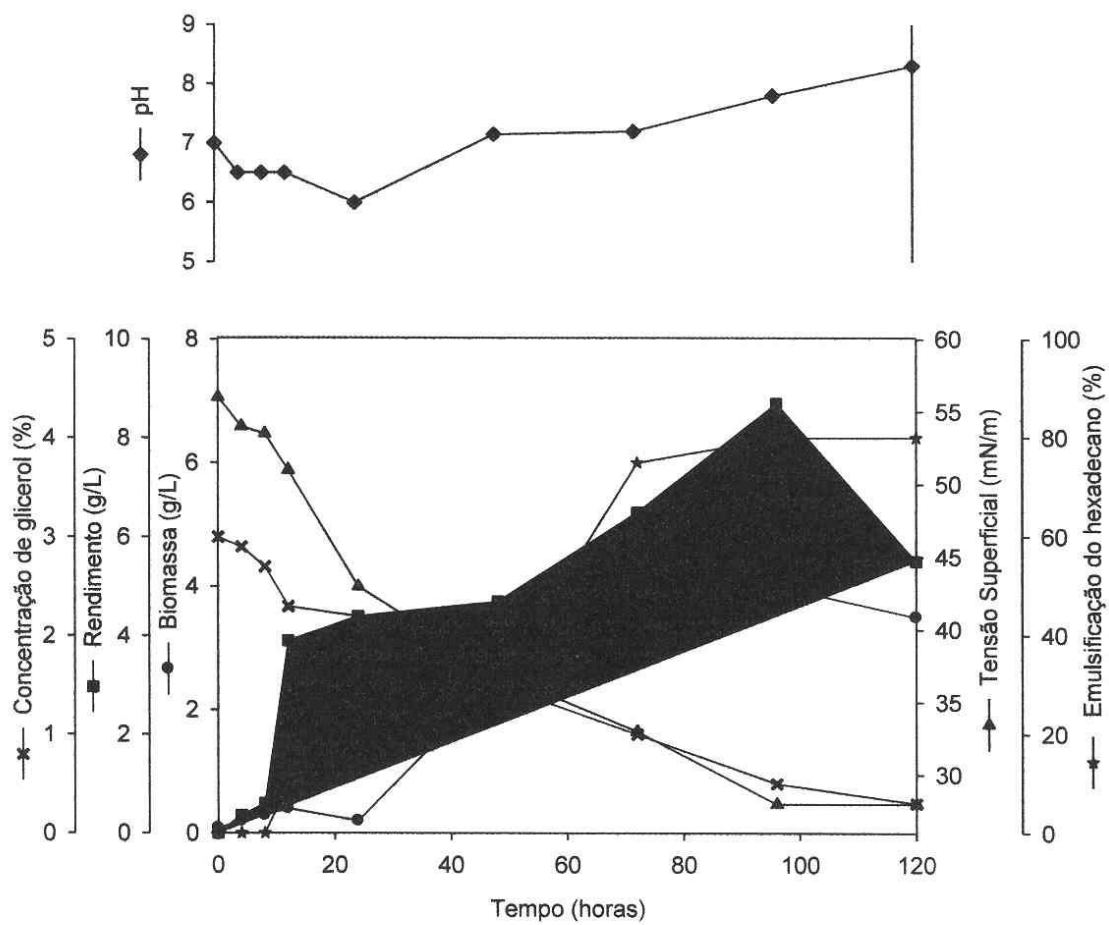


Fig. 1.

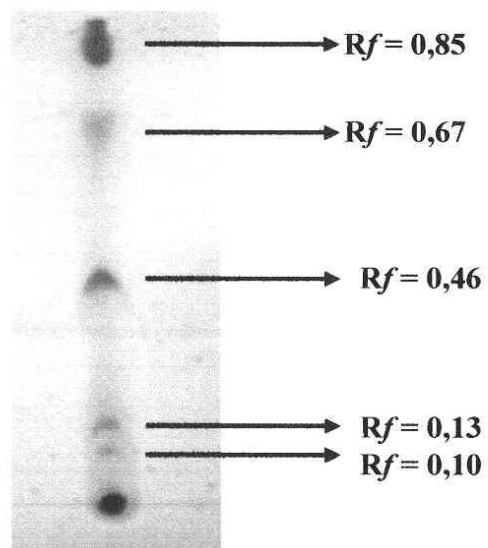


Fig. 2.

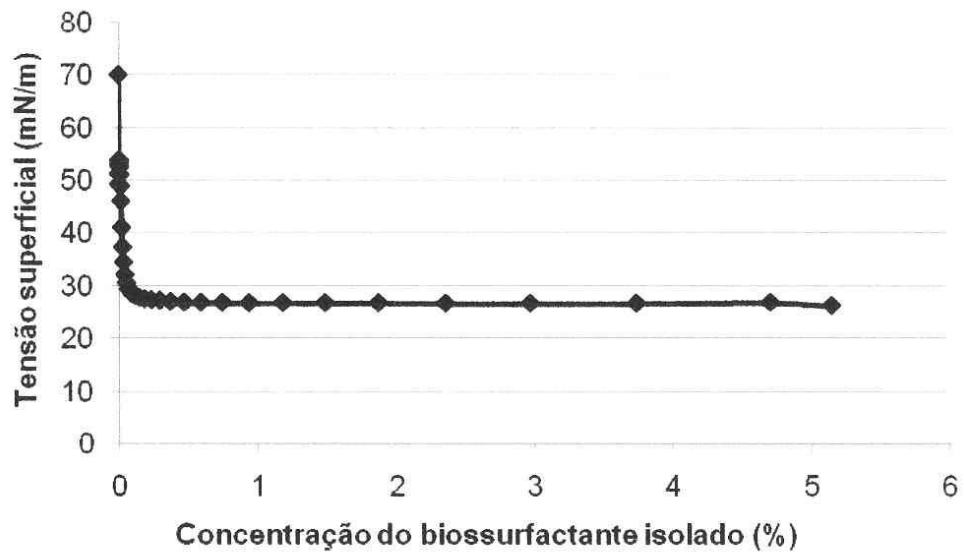


Fig. 3.

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados com a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 permitem as seguintes conclusões:

- a *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 apresenta grande potencial como microrganismo produtor de compostos com atividades surfactante e emulsificante a partir do uso de glicerol como fonte de carbono;
- a utilização de glicerol apresenta-se como alternativa vantajosa de formulação de um meio de baixo custo para a produção de biossurfactantes, considerando o aumento da produção desse substrato para atender à demanda mundial de biodiesel;
- o potencial de aplicação do biossurfactante produzido como agente de superfície foi evidenciado considerando que o menor valor de tensão superficial atingido foi semelhante a valores descritos na literatura para bactérias e leveduras super produtoras de surfactantes;
- o biopolímero produzido pode ser utilizado como emulsificante de óleos e gorduras, considerando o tipo de hidrocarboneto e as condições do meio de aplicação;
- a estabilidade dos raminolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 em condições drásticas como elevadas temperaturas, alta salinidade e valores extremos de pH indicam a aplicabilidade na biorremediação onde tais condições prevalecem.
- a habilidade dos raminolipídeos da *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 em emulsificar diferentes hidrocarbonetos pode facilitar a assimilação microbiana desses óleos, indicando o uso desse grupo de surfactantes no tratamento de poluentes de ambientes contaminados com óleos.
- o biossurfactante bruto não apresenta toxicidade nas condições testadas, enquanto que o biossurfactante isolado pode apresentar toxicidade em função da concentração utilizada.

- a utilização do biossurfactante bruto na remoção do poluente hidrofóbico indica a possibilidade de aplicação na área ambiental com redução dos custos do processo de produção;

ANEXOS

Parte dos resultados obtidos nesse trabalho foi submetida para apresentação em eventos:

Silva, S.N.R.L., Silva, A.F., Santos, D.K.F., Farias, C.B.B., Rufino, R.D., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M., Sarubbo, L.A. Production and characterization of biosurfactants by *Candida* species. **IV Simpósio em Microbiologia Aplicada**, Rio Claro, SP, 23 a 25 de abril de 2009.

Selma Neide R. L. Silva, Ranielly M. Batista, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna, Charles B. B. Farias, Leonie A. Sarubbo. Conversion of glycerol into biosurfactants by *Candida guilliermondii*. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 02 a 05 de agosto de 2009.

Farias, C.B.B., Silva, S.N.R.L., Silva, A.F., Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A. Use of glycerin as carbon source for the production of bioemulsifiers by *Pseudomonas aeruginosa*. **IV Simpósio em Microbiologia Aplicada**, Rio Claro, SP, 23 a 25 de abril de 2009.

Silva, S.N.R.L., Silva, A.F., Farias, C.B.B., Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M., Sarubbo, L.A. Influência dos constituintes do meio de cultivo na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. **XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 08 a 12 de novembro de 2009.

Silva, S.N.R.L., Silva, A.F., Farias, C.B.B., Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M., Sarubbo, L.A. Estabilidade do biossurfactante de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em glicerol frente a condições ambientais específicas. **XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 08 a 12 de novembro de 2009.

Silva, S.N.R.L., Silva, A.F., Farias, C.B.B., Albuquerque, C.F., Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A. Influência das condições de cultivo na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em glicerol como substrato. **XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 08 a 12 de novembro de 2009.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces



Introduction

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces is an international journal devoted to fundamental and applied research on colloid and interfacial phenomena in relation to systems of biological origin, having particular relevance to the medical, pharmaceutical, biotechnological, food and cosmetic fields. The objective of the journal is to cover all aspects of biointerfaces. Therefore contributions from both biological and physical scientists are strongly encouraged.

Examples of targeted topics are:

- Surface properties of materials of both synthetic and biological origin in relation to biological interactions.
- Adsorption of surfactants, proteins and other biopolymers, bacteria and mammalian cells.
- Cell-cell interactions and membrane fusion.
- Diffusion and transport in membranes and vesicles.
- Biopolymer and cell immobilization.
- Biofouling of surfaces.
- Biosurfactants and biopolymers: synthesis, surface activity, aggregation, solubilization, phase behaviour.
- Colloidal drug carriers, including nanoparticles, nanocapsules, liposomes, microspheres, microcapsules: drug diffusion, drug release kinetics, interactions of drugs and carrier materials.

Papers on the use of experimental methods such as X-ray diffraction, ellipsometry; scanning probe microscopes (STM, AFM), electron microscopy, light scattering techniques, XPS, FTIR, NMR, and other methods for the study of rapid reactions (temperature jump, stopped flow, time-resolved fluorescence) and their application to biological problems of an interfacial nature will also be included.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces publishes regular research papers, reviews, short communications and invited perspective articles, called *BioInterface Perspectives*. The

BioInterface Perspectives provide researchers the opportunity to review their own work, as well as provide insight into the work of others that inspired and influenced the author. As a guideline, reviews should have a length of approximately 3500 words (about 3 - 4 printed pages).



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/e/policy/b3.htm>;

EC Directive 86/609/EEC for animal experiments

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm;

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals

<http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>.

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

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), 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, without the written consent of the copyright-holder

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.

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 paper 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>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit [↗](http://www.elsevier.com/languagepolishing)<http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at [↗](http://epsupport.elsevier.com)<http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: [↗](http://www.elsevier.com/termsandconditions)<http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

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.

For submitting your manuscript to Colloids and Surfaces B: Biointerfaces please go to our Elsevier Editorial System (EES) Website at: [↗](http://ees.elsevier.com/colsub/)<http://ees.elsevier.com/colsub/> .

Referees

Upon submission, the author is obliged to suggest 5 reviewers who are not an Editor or an Editorial Board member. To the Editors' discretion manuscripts may be immediately rejected without review, when such manuscript falls outside the scope of the journal, or when the English language is not of appropriate level.



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. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. 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>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

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.

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.

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 telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **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 be no longer than 250 words

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.

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.).

Nomenclature and Units

The use of nomenclature and symbols adopted by IUPAC is recommended (Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, Blackwell Scientific, Oxford, 1988).

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.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.

- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure 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

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, 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: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- 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.

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.

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.

Reference Style

1. All references made to publications in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the information given in the text is exactly the same as that given in the reference list. References to the literature should be made according to the numerical system described below.
2. In the text refer to the subject or to the author's name (without initial), followed by the reference number in square brackets.
3. If reference is made in the text to publications written by more than two authors, the name of the first author should be used, followed by "et al.". Note that in the reference list the names of authors and co-authors should be given in full.
4. References should be arranged in the order in which they appear in the text.
5. Use the following system for arranging the references:

(i) For journals N. Levy, N. Garti and S. Margdassi, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 97 (1995) 91

(ii) For monographs B.E. Conway, *Ionic Hydration in Chemistry and Biophysics*, Elsevier, Amsterdam, 1981.

(iii) For edited books R.D. Thomas, in E. Buncl and J.R. Jones (Eds.), *Isotopes in the Physical and Biomedical Sciences*, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1991, Chapter

7.

For conference proceedings, symposia etc. A.G. Marshall, in P.G. Kistemaker and N.M.M. Nibbering (Eds.), *Advances in Mass Spectrometry*, Proc. 12th International Mass Spectrometry Conference, Amsterdam, 26-30 August 1991, Elsevier, Amsterdam, 1992, p. 37.6.

Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by the Chemical Abstract Service (Bibliographic Guide for Editors and Authors, The American Chemical Society, Washington, DC, 1974). If the correct abbreviation is not known, the title should be given in full.

7. Reference to a personal communication should be followed by the year, e.g. A.N. Other, personal communication, 1989. **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 serial title word abbreviations:

☞ <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): ☞ <http://www.cas.org/sent.html>.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, 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 ensure that data are provided 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. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For

more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.]

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. **Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" 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://epsupport.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. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they 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://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. 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/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

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. Therefore, it is important to ensure that all of your 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.

Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.