PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Yarrowia lipolytica*

GIZELE CARDOSO FONTES

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
2008

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Yarrowia lipolytica*

Gizele Cardoso Fontes

Dissertação submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em tecnologia de processos químicos e bioquímicos da escola de química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em ciências.

Aprovada por:

Orientadores

_____

Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

_____

Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc

Banca Examinadora

_____

Prof[a]. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

_____

Prof[a]. Juliana Vaz Bevilaqua, D. Sc.

_____

Prof[o]. Márcio Nele de Sousa, D. Sc.

Rio de Janeiro, R.J. - Brasil

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

F682p Fontes, Gizele Cardoso

Produção de Biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* / Gizele Cardoso Fontes. --2008.

xv, 122 p. 29,7 cm .

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, Rio de Janeiro,2008.

Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho
Priscilla Filomena Fonseca Amaral

1. Biossurfactante; 2. *Yarrowia lipolytica*; 3.Tensoativos; 4. Otimização. I. Coelho, Maria Alice Zarur; Amaral, Priscilla Filomena Fonseca. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Título (Série).

“Eu creio que a inteligência está manifestada em toda a Natureza. A base do trabalho científico é a convicção de mundo, é uma entidade ordenada e compreensível e não uma coisa ao acaso.”

Albert Einstein

AGRADEÇO *a Deus, por toda força, proteção e por ter permitido completar mais essa etapa da vida...*

DEDICO *a minha querida família, aos meus pais Divino e Maria Rita pelo carinho e apoio de sempre...*

OFEREÇO *ao meu amado marido Alexandre, pelo amor, carinho, companheirismo, paciência, incentivo...*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Rita e Divino, por todo amor, amparo, incentivo e pelos esforços que realizaram para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu querido marido Alexandre pela presença, amor, apoio, alegria, inspiração....por me fazer feliz.

À minha irmã Jacqueline e meu cunhado Marcos Paulo pelo apoio e amizade.

À minha segunda família, Rui, Graça, Rui Jr e Viviane pelo carinho, orações e pela torcida em todos os momentos.

As minhas amigas de república Priscila, Simone e Grace..que me acolheram com muito carinho quando cheguei ao Rio de Janeiro.

Agradeço a minha orientadora Alice por abrir as portas do laboratório para realização de estágio em 2005. Pela oportunidade de realizar este trabalho e pelos ensinamentos sempre essenciais.

Á Priscilla, pela orientação, pela paciência e ajuda nos momentos críticos dos experimentos e por sempre estar disposta a me ajudar.

Ao Professor Márcio Nele por disponibilizar os equipamentos do Laboratório de Sistemas Particulados e pelo aprendizado. Ao pessoal do laboratório...Kelly, Liane, Rogério e Luís que sempre estiveram prontos a me ajudar.

À turma do laboratório 103: Ariana, Kelly, Diego, Etel, Lívia, Tatiana, , André, Roberta, Carlos André, Rafael, Mariana, Natasha, Ana Claudia, Bernardo, Ana Paula, Ana Iraidy, Luiza...pela ajuda e amizade.

Ao apoio financeiro da FAPERJ e da CAPES.

Á todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da dissertação apresentada à EQ/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

Gizele Cardoso Fontes

Março/2008

Orientadoras: Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho
Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Programa: Tecnologia em Processos Químicos e Bioquímicos

Este trabalho tem como objetivo estudar a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando planejamento de experimentos para otimização do meio de produção, incluindo o emprego de substratos renováveis de baixo custo. Os efeitos da aeração e da velocidade de agitação foram previamente testados, sendo que as maiores produções de biossurfactante ocorreram a 250 rpm e com uma razão volume de meio (Vm) / volume de frasco (Vf) de 0,5, atingindo índice de emulsificação (IE) de 38,91%, variação da tensão superficial (ΔTS) 14,39 mN/m e diâmetro da zona clara (OS) de 1,15 cm. Planejamentos de experimentos foram realizados afim de avaliar os efeitos da fonte de nitrogênio e de carbono. Primeiramente um planejamento fatorial completo 2^4 foi utilizado visando a influência das interações da uréia, sulfato de amônio, extrato de lêvedo e peptona nas variáveis de resposta IE, ΔTS e OS. Os melhores resultados (73,18% IE e 20,9 mN/m ΔTS) foram obtidos em meio de cultivo composto por 10 $g.L^{-1}$ de sulfato de amônio e 0,5 $g.L^{-1}$ de extrato de lêvedo, sendo que a técnica "oil spreading" não demonstrou ser um bom parâmetro de medida da produção do biossurfactante. Um planejamento fatorial completo 2^4 foi utilizado para na análise da fonte de carbono: glicerol, hexadecano, óleo de oliva e glicose. O glicerol e a glicose foram as fontes de carbono que mais favoreceram a biossíntese do surfactante, atingindo máximo de IE de 82,33% e 20,55 mN/m de ΔTS. A utilização de substratos hidrofóbicos (hexadecano e óleo de oliva) influenciou negativamente a produção do biossurfactante. Um delineamento composto central rotacional 2^2 foi realizado para analisar a interação entre a glicose e glicerol, sendo obtido um nível ótimo de glicose e glicerol de 4% (p/v) e 2% (v/v), respectivamente. Sob as condições ótimas obtidas acima, o efeito do pH inicial no crescimento e na produção de biossurfactante foi investigado. O crescimento e a produção de biossurfactante foram similares na faixa de pH estudada (5 a 9). Como fonte de carbono de origens renováveis para o crescimento e a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* foram utilizados o suco de caju e o glicerol, subproduto da produção do biodiesel. O suco de caju diluído 1:1 e 1:10 foram analisados sem e com fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) adicional. O suco de caju diluído 1:10 e suplementado com sulfato de amônio 10 $g.L^{-1}$ apresentou maiores valores de IE (65%) e ΔTS (23,

44 mN/m). A fase glicerinosa bruta e a tratada (ambas a 3%v/v) oriundas da produção do biodiesel foram utilizadas como substrato para o crescimento celular e produção de biossurfactante. Resultados satisfatórios foram obtidos com a glicerina bruta, com ΔTS de 22 mN/m e IE de 70,22%. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o suco de caju clarificado e a glicerina são matérias primas renováveis apropriadas para o crescimento de *Y. lipolytica* e para produção do biossurfactante.

Abstratct of a Final Project presented to EQ/ UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

Gizele Cardoso Fontes

Março/2008

Supervisors: Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho
Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Department: Chemical and Biochemical Process

This work aimed to improve biosurfactant production *by Yarrowia* IMUFRJ 50682, using experimental designs and renewable substrates of low cost. The effect of aeration and agitation speed was initially carried out and the best condition was observed with a medium volume (Vm) / (flask volume) (Vf) ratio of 0.5 and at 250 rpm, reaching an emulsification index (EI) of 38,91%, maximum variation of surface tension of 14,39 mN/m and maximum diameter of clear zone (OS) of 1.15 cm. A 2^4 full factorial design was used to investigate the effects of the nitrogen source (urea, ammonium sulfate, yeast extract, peptone) on ΔST, EI and OS. The best results (73.18 % of EI and 20.9 mN/m of ΔST) were obtained with a medium composed of 10 g/L of ammonium sulfate and 0.5 g/L of yeast extract. The results show that analyses of oil spreading didn't reliable in detecting biosurfactant produced by *Y.lipolytica*. A 2^4 full factorial design was carried out to evaluate the effect of the carbon source (glycerol, hexadecane, olive oil and glucose) on biosurfactant production Glycerol and glucose were the carbon sources that most favorable biosurfactant production. It was found that the maximum EI and ΔST produced was 82.33% and 20.55 mN/m, respectively. When hydrophobic substrate (hexadecane and olive oil) were used, its presented a negative influence in the biosurfactant production. The interactions of glucose and glycerol were than investigated using a two-factor central composite design and response surface methodology. The optimum point was evident and the better levels of glucose and glycerol were respectively, 4% w/v and 2% v/v and the maximum biosurfactant production were 81.33% of EI and 20.55 mN/m of ΔST. Under the optimal conditions obtained above, the effects of initial pH on cell grow and biosurfactant production was investigated, leading to identical profiles in the pH range studied (5 to 9). As alternative substrates from renewable-resources the clarified cashew apple juice (CCAJ) and by product of biodiesel production (glycerol) were investigated. The microorganism was able to grow and produce biosurfactant on CCAJ, achieving a maximum emulsification index of 68 % and maximum variation on surface tension of 18 mN/m, when the CCAJ was diluted ten times with distilled water and sulfate ammonium (10 $g.L^{-1}$) was added as nitrogen source. *Y.lipolytica* growth and biosurfactant production were also observed when the crude glycerol from biodiesel production (3% v/v) was used as carbon source and supplementated with sulfate ammonium (10 $g.L^{-1}$),

reaching 70,22% of EI and 22 mN/m of ΔTS. The results herein obtained indicate that the clarified cashew apple juice and by product of biodiesel synthesis are appropriate raw materials for biosurfactant production by *Y.lipolytica*.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO..... 1
2. OBJETIVO..... 4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 5
3.1.BIOSSURFACTANTES..... 5
3.1.1 - Classificação química dos biossurfactatnes..... 6
3.1.1.1 - Glicolipídeos……..... 7
3.1.1.2 - Biossurfactantes poliméricos..... 8
3.1.1.3 - Lipopeptídeos e lipoproteínas..... 9
3.1.1.4 - Fosofolipídeos e ácidos graxos..... 10
3.1.2 - Propriedades físico - químicas..... 10
3.1.3 - Potencial de aplicação..... 13
3.2 - PRODUÇÃO MICROBIANA DE BIOSSURFACTANTES..... 17
3.3 - ***YARROWIA LIPOLYTICA***..... 19
3.4 - FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE..... 22
3.4.1 - A fonte de carbono..... 23
3.4.2. Fontes de carbono de origens renováveis..... 29
3.4.2.1. Suco de caju como substrato não-convencional..... 31
3.4.2.2. Subproduto do biodiesel como substrato não-convencional..... 33
3.4.3 - A fonte de nitrogênio..... 35
3.4.4. Forma de condução do processo..... 38
3.4.5 - Temperatura, pH, aeração e agitação 41
4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 44
4.1. Materiais..... 44
4.2. Equipamentos..... 44
4.3 Microorganismo..... 45
4.4 Manutenção da cultura..... 45
4.5 Obtenção do inóculo..... 46
4.6. Efeito da velocidade de agitação e da aeração..... 46
4.7. Otimização da fonte de nitrogênio..... 47
4.8. Estudo da influência da fonte de carbono..... 48
4.9. Estudo da influência do pH inicial na produção de biossurfactante..... 49
4.10. Produção de biossurfactante utilizando fontes de carbono de origens renováveis..... 49
4.10.1. Suco de caju clarificado..... 49
4.10.2. Subproduto do biodiesel..... 51

4.10.2.1. Glicerina bruta 51
4.10.2.2. Glicerina tratada 51
4.11.Esterilização dos meios de cultura..... 52
4.12. Amostragem..... 52
4.13. Determinação da produção de biossurfactante..... 53
4.13.1 Tensão superficial 53
4.13.2. Índice de emulsificação..... 54
4.13.3. Método “Oil spreading”..... 55
4.13.4. Viscosidade..... 56
4.14. Métodos Analíticos..... 57
4.14.1. Quantificação do Crescimento Celular..... 57
4.14.2. Determinação da concentração de glicose..... 58
4.14.3. pH do meio de cultivo..... 58
4.14.4. Determinação da concentração de Açúcares Totais..... 59
4.14.5. Determinação da concentração de glicerol..... 59
4.14.6. Quantificação de carbono total 61
4.14.7. Quantificação de nitrogênio total..... 61
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 62
5.1. Influência da aeração e velocidade de agitação..... 62
5.1.1. Os perfis de crescimento celular 62
5.1.2. A produção de biossurfactante..... 63
5.2. Influência da fonte de nitrogênio..... 68
5.3. Influência da fonte de carbono..... 75
5.3.1. Planejamento fatorial completo 2^4 para otimização da fonte de carbono..... 75
5.3.2. Delineamento composto central rotacional 2^2..... 81
5.4. Influência do pH inicial na produção de biossurfactante e crescimento celular... 89
5.5. Produção de biossurfactante utilizando como substrato o suco de caju clarificado..... 91
5.6. Produção de biossurfactante utilizando como substrato a fase glicerinosa, subproduto da produção de biodiesel. 98
5.7. Análise comparativa dos resultados obtidos nas diferentes etapas do processo de otimização..... 103
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES..... 107
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA..... 111

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1. Principais biossurfactantes do tipo glicolipídeos (SHAFI e KHANNA, 1995)....7
Tabela 3.2. Biossurfactantes poliméricos (SHAFI e KHANNA, 1995).....9
Tabela 3.3. Biossurfactantes do tipo lipopeptídeos e lipoproteína (DESAI e BANAT, 1997).....9
Tabela 3.4. Biossurfactante do tipo fosfolipídeos (SHAFI e KHANNA, 1995).....10
Tabela 3.5. Potencial de aplicação de biossurfactantes.....14
Tabela 3.6. Principais leveduras produtoras de biossurfactantes.....18
Tabela 3.7. Diferentes estratégias de produção de biossurfactante (SYLDATK e WAGNER,1987).....23
Tabela 3.8. Dados de estudos da produção de biossurfactantes produzidos por leveduras registrados na literatura.....39
Tabela 4.1. Experimentos realizados para avaliar o efeito da velocidade de agitação e aeração.....46
Tabela 4.2. Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2^4.....47
Tabela 4.3. Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0.....48
Tabela 4.4. Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2^4.....49
Tabela 4.5. Meios de cultivo utilizados para produçã o de biossurfactante por *Y.lipolytica*.....50
Tabela 4.6. Composição do suco de caju clarificado.....50
Table 5.1. Planejamento experimental e respectivos resultados para a otimização da fonte de nitrogênio.....69
Tabela 5.2. ANOVA para ΔTS e IE.....71
Tabela 5.3. Custos das fontes de nitrogênio utilizadas no planejamento experimental....78
Tabela 5.4. Matriz do planejamento fatorial com os valores reais e os resultados experimentais.....79
Tabela 5.4. ANOVA para ΔTS e IE.....79
Tabela 5.5. Faixa de valores estudados no DCCR 2^2.....81
Tabela 5.6. Matriz do planejamento experimental DCCR 2^2, com os valores codificados e reais em parêntese e os resultados experimentais. 82
Tabela 5.7. ANOVA para ΔTS e IE.....84
Tabela 5.8. Composição das amostras de glicerina.....98
Tabela 5.9. Evolução dos resultados do índice de emulsificação e variação da tensão superficial produzido a partir de cultivo de *Y.lipolytica,* nas diferentes etapas do processo de otimização. 104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Estruturas básicas formadas por biossurfactantes (CHAMPION *et al*, 1995).....5

Figura 3.2. Estruturas dos principais glicolídeos. (A) Ramnolipídeos do tipo 1 (B Trealolipídeos (C) Soforolipídeos. Fonte: DESAI & BANAT(1997).....8

Figura 3.3. Estrutura do biossurfactante emulsan. (DESAI & BANAT,1997).....8

Figura 3.4. Estrutura da surfactina (MULLIGAN,2005).....9

Figura 3.5. Estrutura da fosfatidiletanolamina (DESAI e BANAT, 1997).....10

Figura 3.6. Estrutura de organização das moléculas de surfactantes (Nitschke e Pastore, 2002). 11

Figura 3.7.Perfis de tensão interfacial, superficial, CMC e solubilidade em função do aumento da concentração do surfactante (MULLIGAN, 2004). 12

Figura 3.8. Esquema de adsorção das moléculas de biossurfactantes na interface: (a) maioria da cadeia hidrofóbica é linear; (b) Presença de ramificação ou múltiplas cadeias hidrocarbônica (MYERS, 1999). 12

Figura 3.9. Demonstração do efeito de emulsificação de um biossurfactante, neste caso um ramnolipídeos produzido por *Pseudomonas* sp., dentro da interface óleo/água. Fonte: FRITSCHE & HOFRICHTER, 2001. 15

Figura 3.10. Perfil da produção de bioemulsificante pelas leveduras *C. lipolytica* IA 1055 (A) e *Y. lipolyitica* IMUFRJ 50682 (B).....19

Figura 3.11. Interação das células de *Y.lipolytica* com substrato durante crescimento com substratos hidrofóbicos. Adesão celular de *Y.lipolytica* a pequenas (a) e grandes (b) gotas de hexadecano e (c) Adesão da gota de óleo na superfície celular durante crescimento da *Y.lipolytica* em ácido rinoleico como substrato (FLICKERS *et al*., 2005).....21

Figura 3.12. Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: A. fosfofrutoquinase; B. Piruvato quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos). E: piruvato desidrogenase (SYLDATK e WAGNER, 1987).....26

Figura 3.13. Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose – 1,6 bifosfatase (SYLDATK e WAGNER, 1987).....27

Figura 3.14. Caju . (www.amazon.com.br).....31

Figura 3.15. Esquema do processo de produção do biodiesel, a partir da semente de mamona (RIBEIRO, 2005).....34

Figura 3.16. Equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo (GERIS *et al*., 2007)..37

Figura 3.17. Cultivo de *Candida antarctica*, mostrando o consumo de nitrogênio (amônio) e o início da produção do biossurfactante MEL-SY16 37

Figura 4.1. Morfologia microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.....45

Figura 4.2. Tensiômetro K100 Krüss.....53

Figura 4.3. Procedimento de medida do índice de emulsificação.....54

Figura 4.4. Técnica "oil spreading". Adição de 40 µL de óleo cru na superfície da água destilada em placa de Petri (A)e posterior adição de 10 µL de meio de cultura livre de

células na superfície do óleo cru, levando a formação de uma zona clara (B).(Foto: Etel Kameda) 55

Figura 4.5. Curva padrão "oil spreading". Concentração de pectina (mg/L) versus diâmetro da zona clara (cm). .....

Figura 1.6. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000.....57

Figura 4.7. Curva padrão de DNS (glicose + frutose) para quantificação de açúcares redutores presentes no meio de cultivo. 57

Figura 4.8. Curva padrão glicerol.....60

Figura 5.1. Perfil de crescimento de *Y.lipolytica* sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf): Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5).....63

Figura 5.2. Diâmetro da zona clara do sobrenadante do cultivo de *Y.lipolytica* sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf) : Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5). Desvio padrão médio das análises é de 0,27 cm.....64

Figura 5.3. Índice de emulsificação do meio de cultivo livre de células sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf) : Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5). Desvio padrão médio das análises é de 0,63 %.....64

Figura 5.4. Variação da tensão superficial do meio de cultivo livre de células sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf) : Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5). Desvio padrão médio das análises é de 0,09 mN/m.....65

Figura 5.5. Variação da viscosidade do meio de cultivo livre de células em relação ao tempo de fermentação sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf) : Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5). Desvio padrão médio das análises é de 0,09 mm^2/s.....67

Figura 5.6. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial completo 2^4. Variável dependente: variação na tensão superficial (A) e índice de emulsificação (B).....70

Figura 5.7. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial completo 2^4. A variável dependente é a metodologia "Oil spreading".....71

Figura 5.8 – Superfície de resposta da variação máxima da tensão superficial em relação à concentração de sulfato de amônio e de extrato de levedura.....72

Figura 5.9 – Superfície de resposta do índice de emulsificação em relação à concentração de sulfato de amônio e de extrato de levedura.....73

Figura 5.10. Resultado experimental da produção de biossurfactante em diferentes concentrações de extrato de levedura. Máxima variação do Índice de emulsificação (A) e tensão superficial (B).....74

Figura 5.11. Diagrama de Pareto para o índice de emulsificação.....77

Figura 5.12. Diagrama de Pareto para variação na tensão superficial.....72

Figura 5.13 – Superfície de resposta das variáveis dependentes índice de emulsificação (A) e variação da tensão superficial (B)em relação à concentração de glicerol e de glicose....80

Figura 5.14. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento experimental DCCR 2^2. Variável dependente: índice de emulsificação (A) e variação máxima da tensão superficial (B). (L) linear e (Q) quadrático.....83

Figura 5.15. Superfícies de respostas do índice de emulsificação em relação às concentrações de glicerol e de glicose.....85

Figura 5.16. Superfície de resposta da variação da tensão superficial em relação às concentrações de glicerol e de glicose.....85

Figura 5.17. Perfil de crescimento e consumo de substrato pela *Y.lipolytica* , nas condições realizadas no ponto central do planejamento DCCR 2^2.....86

Figura 5.18. Evolução da tensão superficial (■) e do índice de emulsificação (♦) durante a fermentação nas condições do ponto central do DCCR 2^2, baseado em triplicata.....87

Figura 5.19. Evolução do pH nos diferentes sistemas de cultivo durante fermentação.....89

Figura 5.20. Perfil cinético do crescimento celular em sistemas de cultivo com diferentes pH's iniciais.....89

Figura 5.21. Variação do índice de emulsificação durante a fermentação em sistemas com diferentes pH's iniciais.....90

Figura 5.22. Variação da tensão superficial durante a fermentação em sistemas com diferentes pH's iniciais.....91

Figura 5.23. Perfil de crescimento celular e consumo de açúcares redutores pela *Y.lipolytica* em meio contendo suco de caju diluído 1:1 sem fonte de nitrogênio adicional (exp.1) e em meio de suco de caju diluído 1:1 com adição de sulfato de amônio (0,224% p/v) (exp.2).....92

Figura 5.24. Evolução do pH durante a fementação utilizando suco de caju clarificado diluído1:1, sem adição de fonte de nitrogênio (exp.1) e com adição de sulfato de amônio 0,244 % p/v (exp.2).....93

Figura 5.25. Evolução do Índice de emulsificação durante cultivo com suco de caju clarificado diluído 1:1 com a adição da fonte de nitrogênio (exp.1) e sem a adição de nitrogênio (exp.2)..... 94

Figura 5.26. Variação da tensão superficial durante cultivo com suco de caju clarificado diluído 1:1 sem a adição de nitrogênio (exp.1) e com a adição da fonte de nitrogênio (exp.2) 94

Figura 5.27. Perfil de crescimento celular e consumo de açúcares redutores pela *Y.lipolytica*, cultivado em meio contedo suco de caju diluído 1:10 sem fonte de nitrogênio (exp.3) e com a adição de sulfato de amônio 1%(exp.4) 95

Figura 5.28. Evolução da tensão superficial e do índice de emulsificação do meio livre de células durante cultivo em meio contendo suco de caju diluído 1:10 sem fonte de nitrogênio (exp.3) e com a adição de sulfato de amônio 1%(exp.4).....96

Figura 5.29. Perfil cinético de crescimento de *Y.lipolytica* em meio contendo glicerina bruta (3% v/v), tratada (3% v/v) e pura (2% v/v).....99

Figura 5.30. Perfil de consumo do glicerol por *Y.lipolytica* em meio contendo glicerina bruta (3%), glicerina tratada (3%) e glicerina pura (2%).....100

Figura 5.31. Evolução do índice de emulsificação durante a produção de biossurfactante em meio contendo glicerina bruta, tratada e pura.....101

Figura 5.32. Evolução da tensão superficial durante a produção de biossurfactante em meio contendo glicerina bruta, tratada e pura.....102

Figura 5.33. Evolução dos resultados do índice de emulsificação (A) e variação da tensão superficial (B) produzido a partir de cultivo de Y.lipolytica, nas diferentes etapas do processo de otimização.....104

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes constituem uma classe de surfactantes que são produzidos a partir de organismos vivos, podendo ser encontrados em superfícies de células microbianas ou secretados extracelularmente. São moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica.

A maioria dos surfactantes atualmente utilizados nas indústrias é derivada do petróleo, entretanto esses compostos são tóxicos para o meio ambiente, não são biodegradáveis e sua acumulação se torna prejudicial ao ambiente. Esse acúmulo na biosfera pode causar um efeito chamado "estresse biológico" que, frequentemente, é apontado como causa de contaminações prejudiciais a saúde.

A necessidade de produtos menos agressivos fez aumentar o interesse por surfactantes microbianos (biossurfactantes) nas últimas décadas. As indústrias estão redirecionando suas tecnologias emergentes e a biotecnologia apresenta-se como um grande desafio e com várias oportunidades de aplicação (BANAT *et al*., 2000). Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser utilizados em uma gama de aplicações industriais. Entretanto os biossurfactantes ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados aos métodos ineficientes de recuperação do produto e o uso de substratos caros, não sendo por enquanto capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos (BANAT *et al*., 2000).

O problema econômico da produção dos biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50 % do valor do produto final (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002). O principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos envolve a seleção de um substrato que contenha um balanço correto de nutrientes que suporte tanto o crescimento celular quanto a produção do composto de interesse (MANEERAT *et al.*, 2005).

Os resíduos agroindustriais apresentam um grande potencial como matéria–prima para produção de biossurfactante, uma vez que são ricos em nutrientes e são de baixo custo.

No Brasil, o problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, como, por exemplo, o pedúnculo do caju, pois apenas uma pequena parte do pedúnculo produzido é aproveitada industrialmente, em torno de 2 a 6 % (CAMPOS *et al.* 2002). A quantidade desperdiçada (94 a 92 %) apresenta elevado potencial, sendo uma matéria-prima rica em carboidratos (açúcar e amido), fibras, vitaminas e sais minerais. A alta taxa de desperdício do pedúnculo do caju ocorre principalmente devido a sua extrema perecibilidade e à ausência de técnicas de manuseio e preservação adequadas. Ademais, a intensa adstringência do pedúnculo, causada pela presença de polifenóis (taninos), e a formação de duas fases no interior das garrafas de suco são fatores que diminuem a aceitação deste produto no mercado externo (ASSUNÇÃO e MERCADANTES, 2003).

De igual modo, o subproduto da produção de biodiesel também é uma matéria-prima de origem renovável promissora, pois o crescente interesse mundial no uso de combustíveis a partir de fontes alternativas tem aumentado a demanda por biocombustíveis, como o biodiesel. A glicerina constitui o principal subproduto do processo de produção de biodiesel por transesterificação. Ela é obtida sob a forma bruta, cujo valor é muito baixo devido à presença das diversas impurezas presentes (THOMPSON *et al*., 2006). Entretanto, este co-produto constitui uma rica fonte de carbono para obtenção de produtos de alto valor agregado, como polímeros, através de conversão química ou bioquímica (rotas fermentativas) e aditivos para combustíveis, como ésteres e éteres de glicerina (KARINEN *et al*., 2006).

Desta forma, o estudo da utilização do pedúnculo do caju e a glicerina como meio de cultura para o crescimento celular e, conseqüente, obtenção de produtos de alto valor agregado pode indicar rotas econômicas alternativas para a produção de biossurfactantes.

Com o aumento dos esforços no desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação, no melhoramento das linhagens e dos processos de produção, e devido a sua versatilidade, biodegradabilidade e baixa toxidade, os biossurfactantes poderão se tornar compostos de uso comum nas indústrias em um futuro próximo.

Em resposta a esta problemática, pretende-se com esse trabalho o aumento da produção de substâncias com propriedades surfactantes, a partir da cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando meio de cultivo sintético e substratos de origem renováveis, diminuindo os custos de produção para o

desenvolvimento de um processo biotecnológico com potencial de aplicação futura. O trabalho visa dar continuidade àquele desenvolvido por AMARAL (2007), no qual se vislumbrou o potencial da levedura *Y. lipolytica* como agente de produção de um bioemulsificante, denominado Yansan, o qual apresentou excelentes propriedades fisico-químicas.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral estudar a produção do biossurfactante produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica*, através da otimização do meio de cultivo e da aplicação de matérias-primas de origens renováveis, visando a diminuição dos custos de produção e obtenção de extrato fermentativo rico em biossurfactante.

Para alcançar este objetivo, estudos sobre a formulação de meios e condições de cultivo para aumentar o estímulo da síntese do biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foram conduzidos através de:

- Estudo da influência da aeração e velocidade de agitação em frascos agitados;

- Otimização das fontes de nitrogênio e carbono;

- Avaliação do efeito do pH inicial no crescimento celular e na produção de biossurfactante;

- Avaliação do potencial de produção do biossurfactante utilizando suco de caju clarificado e glicerina, subproduto da produção do biodiesel, como matérias-primas não convencionais.

O trabalho está estruturado em quatro partes básicas:

A primeira parte apresenta a revisão bibliográfica, como forma de embasamento aos objetivos propostos neste capítulo, procurando fornecer base teórica bem como os resultados obtidos na literatura referentes ao tema deste trabalho. A segunda parte apresenta os materiais e métodos utilizados para alcançar os objetivos propostos. Na terceira parte são apresentados os resultados e as discussões. Para finalizar, conclusões e sugestões para trabalhos futuros, são apresentados na quarta parte.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biossurfactantes

Uma grande quantidade de compostos com propriedades tenso-ativas é sintetizada por organismos vivos, desde plantas (saponinas), microorganismos (biossurfactantes), até humanos (sais biliares) (BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes, uma classe de agentes surfactantes naturais, são compostos anfipáticos, com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica (LANG, 2002), capazes de formar diversas estruturas, tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares e estruturas lamelares, como mostrados na Figura 3.1 (CHAMPION *et al*., 1995).

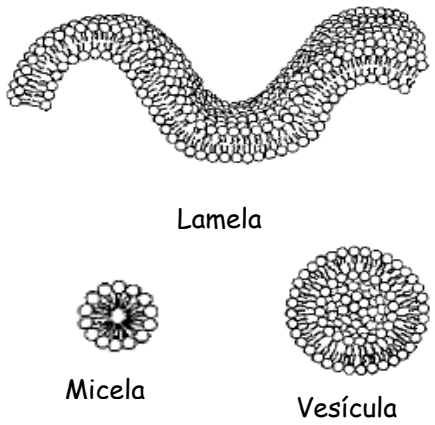


Figura 3.1. Estruturas básicas formadas por biossurfactantes (CHAMPION *et al*, 1995).

Quando comparado com os surfactantes sintéticos convencionais, os biossurfactantes possuem algumas características que lhes são próprias (BOGNOLO, 1999), a saber:

● Atividade de superfície e interface: os biossurfactantes são mais efetivos e eficientes que, por exemplo, sulfonatos aniônicos, já que reduzem a tensão superficial mais rapidamente;

● Estruturas complexas e volumosas: aumenta a adsorção na interface óleo-água através de múltiplos pontos de ancoragem, aumentando a estabilidade das cadeias em uma única fase, o que produz uma efetiva estabilidade esférica. A grande área interfacial coberta pela molécula adsorvida

e a multiplicidade de pontos de ancoragem asseguram que não ocorra dessorção durante a colisão das partículas, e aumentam grandemente a estabilidade das emulsões;

●Tolerância à temperatura: alguns biossurfactantes e sua atividade interfacial não são afetados, mesmo em altas temperaturas (90ºC);

● Tolerância à força iônica: os biossurfactantes não precipitam em solução salina de até 10% (m/v) enquanto que soluções de 2-3% de sal são suficientes para desativar os surfactantes químicos;

● Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados na água ou no solo;

● As emulsões podem ser facilmente quebradas por adição de enzimas como, por exemplo, despolimerases que podem quebrar a emulsão de hidrocarbonetos em óleo;

● Concentrações micelares críticas (CMC) baixas e alta atividade surfactante;

● Atividade biológica como antimicrobianos, antitumorais, etc (KITAMOTO *et al.*, 2002);

● Podem ser produzidos a partir do uso de substratos renováveis: como por exemplo, efluentes agroindustriais, óleos vegetais, subprodutos da indústria do petróleo e alimentícia (MANEERAT, 2005).

3.1.1. Classificação química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes estruturalmente apresentam combinações diversas, principalmente aqueles produzidos por microorganismos na presença de hidrocarbonetos (ROSENBERG & RON., 1999)

As moléculas de biossurfactantes apresentam uma parte hidrofóbica composta por longas cadeias de ácido graxos, hidroxi ou alquil β - hidroxi de ácidos graxos enquanto que, a parte hidrofílica pode ser composta de carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfatos, ácidos carboxílicos ou álcoois. Enquanto os surfactantes químicos são classificados com base na natureza de seus grupos polares, os biossurfactantes são classificados de acordo com sua natureza química (DESAI & BANAT, 1997).

As maiores classes de biossurfactantes incluem glicolipídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e surfactantes poliméricos, sendo estes apresentados a seguir.

3.1.1.1) Glicolipídeos

Os glicolipídeos são os biossurfactantes mais conhecidos e estudados, sendo considerados de baixo peso molecular (ROSENBERG & RON, 1999). A sua estrutura é formada por combinação de carboidratos e uma longa cadeia de ácidos alifáticos. A Tabela 3.1 apresenta os principais tipos de glicolipídeos e as respectivas espécies produtoras.

Tabela 3.1. Principais biossurfactantes do tipo glicolipídeos (SHAFI e KHANNA, 1995).

Biossurfactante - Glicolipídeos	Espécies microbianas produtoras
Micolatos de trealose	*Rhodococcus erytropolis* *Arthobacter paraffineus* *Mycobacterium phlei*
Ésteres de trealose	*Mycobacterium fortitum* *Micromonospora sp.* *Mycobacterium paraffinicum* *Rhodococcus erytropolis*
Micolatos de mono di e trissacarídeos	*Corynebacterium diptheriae* *Mycobacterium smegmatis* *Arthobacter sp.*
Raminolipídeos	*Pseudomonas. sp*
Soforolipídeos	*Torulopis bombicola* *Torulopis petrophilum* *Candida sp.*

A Figura 3.2 apresenta as estruturas químicas de três tipos de biossurfactantes glicolipídeos. Os ramnolipídeos são os glicolipídeos mais bem estudados, sendo produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Sua estrutura contém uma ou duas moléculas de ramnose que são ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β - hidroxidecanóico (Fig. 3.2.A). Os trealolipídeos (Fig. 3.2.B) são dissacarídeos de trealose ligados a ácido micólico, sendo que em diferentes microorganismos a produção de trealolipídeos, diferem no tamanho da estrutura do ácido micólico e número de insaturações (DESAI & BANAT, 1997). Os soforolipídeos (Fig. 3.2.C) são produzidos principalmente por leveduras e compreendem de uma molécula de soforose ligada a uma cadeia de ácido graxo (JING *et al*., 2006).

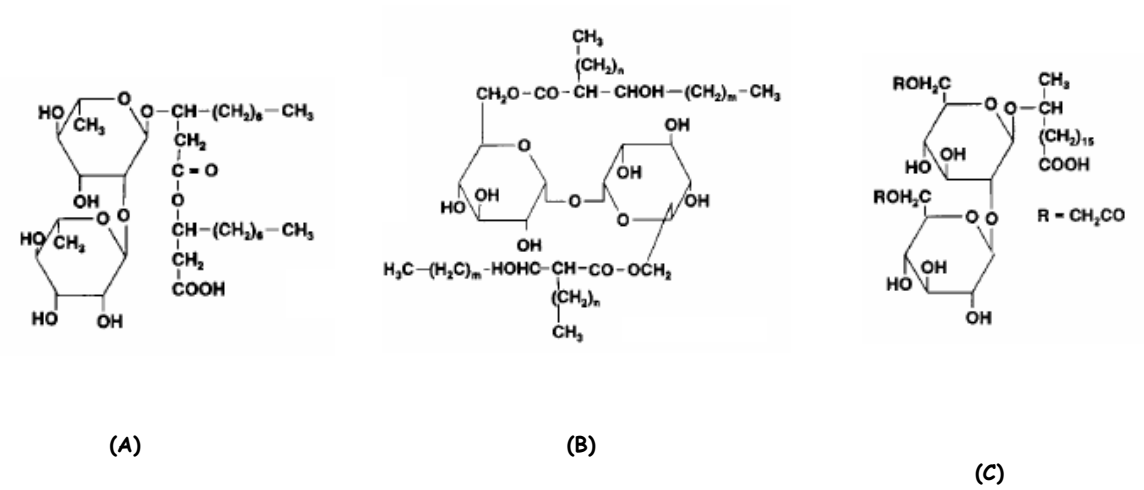


Figura 3.2. Estruturas dos principais glicolídeos. (A) Ramnolipídeos do tipo 1 (B) Trealolipídeos (C) Soforolipídeos. Fonte: DESAI & BANAT (1997).

3.1.1.2) Biossurfactantes poliméricos

Os biossurfactantes poliméricos possuem alto peso molecular, apresentam alta viscosidade e resistência ao cisalhamento, sendo formados por complexos de polissacarídeos ligados a cadeia hidrocarbônica (ROSENBERG & RON, 1999). A Figura 3.3 mostra a estrutura química do emulsan, um biossurfactante produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*. A Tabela 3.2 apresenta alguns tipos de biossurfactantes poliméricos com seus respectivos microorganismos produtores.

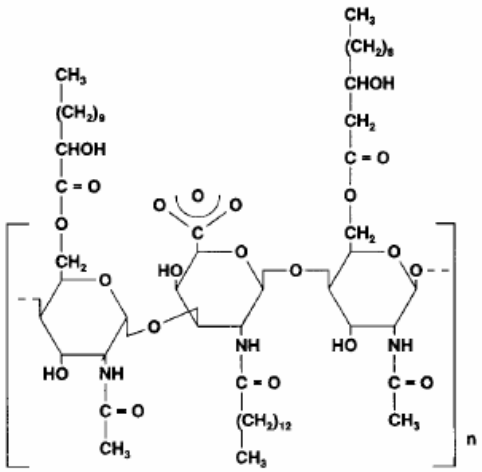


Figura 3.3. Estrutura do biossurfactante emulsan. Fonte : DESAI & BANAT., 1997.

Tabela 3.2. Biossurfactantes poliméricos (SHAFI e KHANNA, 1995).

Biossurfactante polimérico	Microorganismo produtor
Lipopolissacarídeos	*Acinetobacter calcoaceticus RAG-1*
Heteropolissacarídeos	*Acinetobacter calcoaceticus A1*
Carboidrato - proteína	*Candida lipolytica*
Complexo lipídico	*Candida petrophillum*
Manose/eritrose	*Endomycopsis lipolytica*
Complexo lipídico	*Candida tropicalis*
	Shizonella melanograma
	Ustilago maydis
	Pseudomonas fluorescence
	Debaryomyces poolymorphus

3.1.1.3) Lipopeptídeos e lipoproteína

É uma classe de biossurfactantes que inclui uma cadeia de aminoácidos na parte hidrofílica ligada a uma cadeia de ácido graxo. O lipopeptídeo mais conhecido é a surfactina produzido pelo microorganismo *Bacillus subtilis*, cuja estrutura é apresentada na Figura 3.4 (MULLIGAN, 2004). Os tipos mais comuns e os respectivos microorganismos produtores estão descritos na Tabela 3.3.

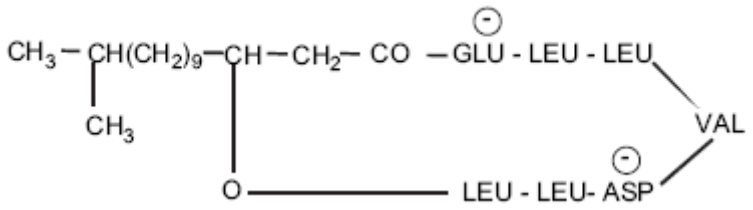


Figura 3.4. Estrutura da surfactina (MULLIGAN, 2005).

Tabela 3.3. Biossurfactantes do tipo lipopeptídeos e lipoproteína (DESAI e BANAT, 1997)

Tipos de Lipopeptídeos	Microorganismo produtor
Lipopeptídeos cíclicos	*Bacillus brevis*
	Bacillus polymyxia
Lipídeos associados à ornitina	*Pseudomonas rubescens*
	Thiobacillues thiooxidans
Lipídeos associados à ornitina e taurina	*Gluconobacter cerinus IFO 3267*
Lipídeos associados à lisina	*Agrobacter tumefaciens IFO 3058*
Serratomolide	*Serratia marcescens*
Lichenisina A	*Bacillus licheniformis*

3.1.1.4) Fosfolipídeos e ácidos graxos

Certas bactérias e leveduras degradadoras de hidrocarbonetos produzem grandes quantidades de fosfolipídeos e ácidos graxos que possuem propriedades tensoativas. A Figura 3.5 mostra a estrutura da fosfatidiletanolamina, produzida pela bactéria *Acinetobacter sp.*, a qual se apresenta na forma de vesícula produzindo microemulsões em soluções de alcanos e água (KAPELI *et al,* 1979). A Tabela 3.4 apresenta alguns biossurfactantes do tipo fosfolipídeos e ácidos graxos.

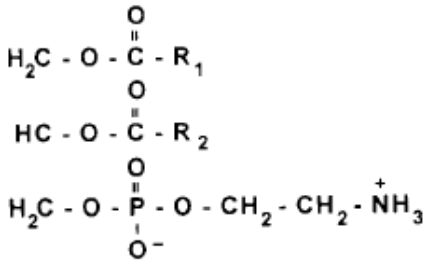


Figura 3.5. Estrutura da fosfatidiletanolamina (DESAI e BANAT, 1997).

Tabela 3.4. Biossurfactante do tipo fosfolipídeos (SHAFI e KHANNA, 1995).

Biossurfactante - fosfolipídeos	Espécie microbiana produtora
Fosfolipídeos e ácidos graxos	*Candida sp.* *Corynebacterium sp.* *Micrococcus sp.*
Fosfolipídeos	*Acinetobacter* *Thiobacillus thiooxidans* *Aspegillus sp.*

3.1.2. Propriedades físico - químicas dos biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam a capacidade de atuar na interface de sistemas óleo/água, ar/água, sólido/água. Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes, como os surfactantes sintéticos, em reduzir a tensão superficial e interfacial pelo remanejamento molecular (GEORGIOU *et al*., 2002). Devido às características da sua molécula, os tensoativos tendem a se posicionar e a se orientar na superfície limite entre duas fases (Figura 3.6), tornando miscíveis duas fases imiscíveis como, por exemplo, água e óleo

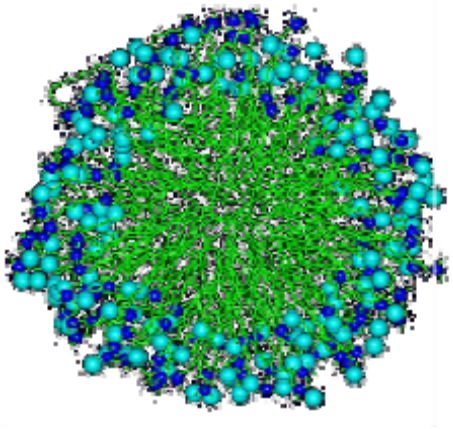


Figura 3.6. Estrutura de organização das moléculas de surfactantes (Nitschke e Pastore, 2002).

A eficácia de um biossurfactante é determinada pela sua habilidade em reduzir estas tensões, sendo a tensão superficial definida como o trabalho necessário para aumentar a superfície em uma unidade de área. Com a presença do biossurfactante, pouco trabalho é requerido para trazer as moléculas da fase volumar para a superfície, sendo a tensão superficial reduzida (MULLIGAN, 2004).

As dinâmicas das tensões superficial e interfacial são explicáveis, em termos de forças de atração tipo van der Waals de curto alcance entre as moléculas localizadas no interior de um líquido, que estão sujeitas à forças de atração iguais em todas as direções, e as moléculas situadas em uma superfície de separação as quais estão submetidas às forças de atração não balanceadas, do que resulta uma força em direção ao interior do líquido. O maior número de moléculas se deslocará da superfície para o interior do líquido e a superfície tenderá por isso a contrair-se espontaneamente (SHAW, 1975).

A Figura 3.7 mostra a correlação entre a concentração de surfactante, que se aplica também aos biossurfactantes, com a tensão superficial, tensão interfacial e a solubilização. Quando ocorre um aumento na concentração do biossurfactante, este diminui a área interfacial e as moléculas se agregam formando micelas, na chamada concentração micelar crítica (CMC), que é a concentração na qual as formas micelares começam a aparecer. A solubilidade aumenta, com o aumento da concentração do biossurfactante, como mostra a Figura 3.7.

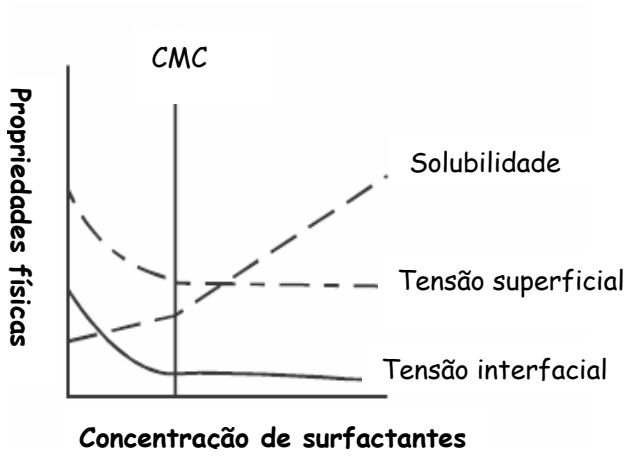


Figura 3.7.Perfis de tensão interfacial, superficial, CMC e solubilidade em função do aumento da concentração do surfactante (MULLIGAN, 2004).

Vários fatores afetam a adsorção dos biossurfactantes na interface, como temperatura, força iônica, pH, dentre outras. A Figura 3.8 mostra a influência da estrutura dos biossurfactantes: quanto mais ramificada e insaturada for a cadeia hidrocarbônica, maior será a sua concentração micelar crítica, pois diminui a eficiência do empacotamanto das moléculas de biossurfactantes na superfície. A eficácia da adsorção é, portanto, diretamente relacionada com o tamanho do grupo hidrofóbico e a porção hidrofílica das moléculas (MYERS, 1999).

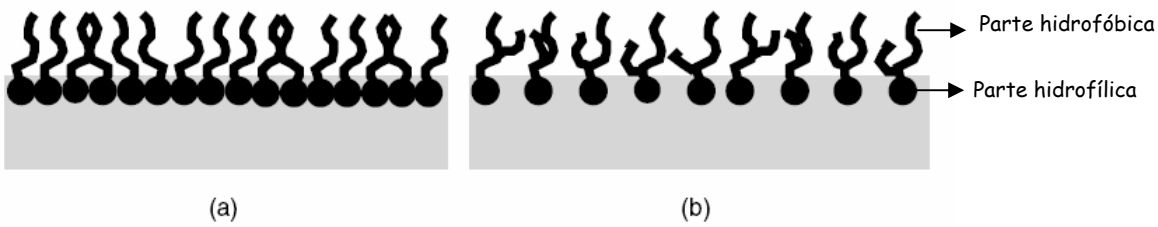


Figura 3.8. Esquema de adsorção das moléculas de biossurfactantes na interface: (a) maioria da cadeia hidrofóbica é linear; (b) Presença de ramificação ou múltiplas cadeias hidrocarbônica (MYERS, 1999).

AMÉZCUA - VEGA *et al*. (2007) estudaram os efeitos das condições de cultivo na composição dos ácidos graxos e nas mudanças da tensão superficial do meio de cultura para produção de biossurfactante por *Candida ingens*. Os autores observaram uma redução média de 25 mN/m em relação a tensão superficial inicial, quando a concentração de extrato de levedura foi de 1g/L. Os

autores concluíram que a tensão superficial varia de acordo com a composição do meio.

Os biossurfactantes em meio aquoso provenientes de *Candida antarctica* são capazes de reduzir a tensão superficial de 72,25 mN/m para 35 mN/m, além de alcançar baixos valores de concentração micelar crítica (ADAMCZAK e BEDNARSKI, 2000).

KIM *et al*. (2006) obtiveram um biossurfactante do tipo glicolipídeos, produzido por *Candida* sp. SY16 utilizando fermentação por batelada alimentada. O glicolipídeo foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de cultura de 72 mN/m para 30 mN/m quando cultivados em meio contendo óleo de soja. Estes autores observaram que a ação deste tipo de biossurfactante é dependente do pH: em baixos valores de pH os autores obtiveram baixos valores de tensão superficial.

A maioria dos biossurfactantes produzidos por via fermentativa, possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial a valores inferiores a 30 mN/m e a tensão interfacial em n-alcanos a valores menores que 1 mN/m (GEORGIOU *et al*., 2002).

Um parâmetro frequentemente usado para avaliar o comportamento do biossurfactante é o balanço lipofílico e hidrofílico. Geralmente biossurfactantes, com valores de HLB menores que 6, são mais solúveis na fase oleosa e com valores entre 10 e 18 tem características opostas (LIN., 1996).

Um ponto importante a ser avaliado é a propriedade tensoativa de molhabilidade do biossurfactante, segundo DESHPAND *et al*. (1990), pois direciona a utilização destes em aplicações industriais como nos tratamentos têxteis, pinturas, recuperação terciária do petróleo, dentre outras.

3.1.3) Potencial de aplicação

As propriedades dos biossurfactantes fazem com que estes sejam adequados para uma ampla gama de aplicações industriais. A Tabela 3.5, apresenta as diversas possibilidades de aplicação dos biossurfactantes (LIN, 1996).

Tabela 3.5. Potencial de aplicação de biossurfactantes.

FUNÇÃO	ÁREA DE APLICAÇÃO
Emulsificantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, adesivos
Solubilizadores e microemulsões	Farmacêutica
Agentes penetrantes e umectantes	Industria têxtil , farmacêutica, tintas
Detergentes	Uso doméstico, agricultura, produtos de alta tecnologia
Agentes espumantes	Cosméticos
Agentes redutores	Tintas
Agentes sequestrantes de metais	Mineração
Material formador de vesícula	Cosméticos, medicamentos
Incremento de crescimento microbiano	Tratamento de lodos contendo óleo
Desemulsificadores	Tratamento de lamas
Agentes de fontes de recuperação	Recuperação terciária do petróleo
Agentes redutores de viscosidade	Transporte em oleodutos

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera. Porém as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais (BANAT *et al*., 2000).

Dentro da indústria do petróleo atualmente o destaque é para a aplicação dos biossurfactantes na área de biorremediação de solos impactados com petróleo. O papel dos biossurfactantes no processo de biorremediação está voltado principalmente para emulsificação dos hidrocarbonetos aumentando a solubilidade desses compostos hidrofóbicos e consequentemente, disponibilizando-os para biodegradação pela flora microbiana nativa (BENTO *et al*., 2005). A Figura 3.9 apresenta um esquema de atuação do biossurfactante na degradação de hidrocarbonetos.

OBERBREMER *et al*. (1990) utilizaram uma população microbiana mista juntamente com soforolipídeos, produzidos por *Candida* sp., na degradação de uma mistura de tretadecano, pentadecano, hexadecano, pristano e fenantreno em meio mineral. Os autores observaram um aumento significativo na biodegradabilidade destes compostos, em relação ao sistema controle.

SHIN *et al*. (2006) estudaram a utilização do biossurfactante produzido pela bactéria *Sphingomonas* sp. para remediação de solos contaminados com fenantreno, um hidrocarboneto poliaromático. Os autores utilizaram uma combinação do processo de solubilização e biodegradação do fenantreno, testando também a influência do pH. Observou-se que a solubilização é dependente do pH, sendo que esta obteve valores máximos em pH 5 e a concentração de fenantreno foi diminuída com a presença do biossurfactante, em relação ao controle.

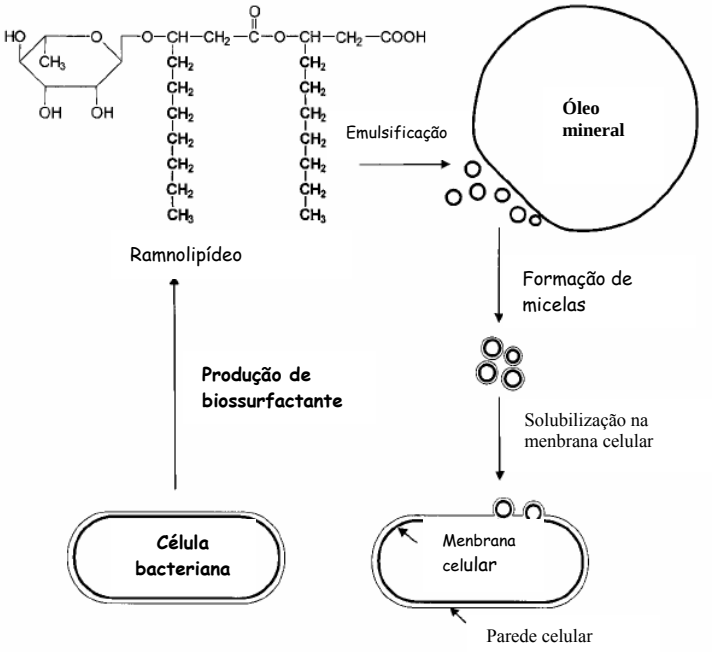


Figura 3.9. Demonstração do efeito de emulsificação de um biossurfactante, neste caso um ramnolipídeos produzido por *Pseudomonas* sp., dentro da interface óleo/água. Fonte: FRITSCHE & HOFRICHTER, 2001.

Os biossurfactantes podem ser utilizados na remediação de solos contaminados com metais. A remoção de íons zinco e cromo de soluções aquosas na presença de biossurfactante foi investigada por ZOUBOULIS *et al.* (2003). Estes autores utilizaram a surfactina e a lichenisina na etapa de flotação, estágio de separação do metal do material adsorvente. A remoção dos metais foi significativamente mais eficiente quando se utilizou o biossurfactante em comparação com a aplicação convencional de produtos químicos.

MULLIGAN *et al*. (2006) estudaram a aplicação da espuma produzida pelo biossurfactante ramnolipídeo na remediação de solo contaminado com metais pesados de cádmio e níquel. Os autores obtiveram remoção máxima quando utilizaram 0,5% da solução de biossurfactante para produção da espuma, a eficiência da remoção utilizando a espuma do biossurfactante foi de 73,2% de Cd e 68,1% de Ni, enquanto que a eficiência na remoção utilizando solução líquida de biossurfactante foi de 61,7% de Cd e 51% para o Ni, e a remoção com água destilada foi de apenas 18% para ambos os casos.

Outra importante aplicação dos biossurfactantes é na limpeza de óleos em tanques de estocagem, devido a redução da viscosidade de óleos pesados, facilitando sua recuperação e transporte em oleodutos (BANAT *et al.,* 1993). Uma investigação em escala piloto foi realizado por BANAT *et al.* (1993) para

avaliar a habilidade do biossurfactante produzido por uma bactéria fazer a limpeza de óleos em tanques de estocagem e para recuperação de hidrocarbonetos da lama emulsionada. Duas toneladas de meio de cultivo com células e biossurfactante foram utilizadas na limpeza de 850m^3 de lama oleosa e aproximadamente 91 % (773,5m^3) de lama foram recuperados com óleo cru a ser reciclado e 76,5m^3 de materiais, sem hidrocarbonetos foram limpos manualmente. Esse processo além de apresentar baixos custos, também apresentou a vantagem de ser um processo menos perigoso que a tecnologia convencional de limpeza.

Ainda dentro da indústria do petróleo, os biossurfactantes têm um potencial de utilização em recuperação avançada do petróleo (MEOR) (BANAT *et al*., 2000). Neste processo, os microorganismos do reservatório são estimulados a produzir surfactantes, de forma a melhorar a recuperação do óleo pelos efeitos de queda da tensão interfacial na interface rocha-óleo, reduzindo as forças capilares e promovendo a movimentação do mesmo através dos poros da rocha (BANAT *et al*., 2000).

As estratégias envolvendo MEOR dependem das condições do reservatório, temperatura, pressão, pH, porosidade, salinidade, condições geológicas e a presença de flora endógena. Dentro dessas estratégias podemos citar a de MAKKAR e CAMEOTRA (1997), que injetaram nos poços, melaço e micronutrientes orgânicos de maneira a estimular a produção de biossurfactantes pela flora microbiana endógena. SPRINGHAM (1984) introduziu bactérias anaeróbicas, *Clostridium acetobutylicum*, em poços contendo óleo pesado e obteve aumento na recuperação de óleo (12%) em relação ao controle. Esse incremento foi atribuído pelo autor, a mudanças na viscosidade e no pH do óleo cru, devido a ação do biossurfactante produzido pela bactéria.

Um outro grande mercado para utilização de biossurfactante está nas aplicações como agentes antimicrobianos, antivirais, terapêuticos e umectantes em cosméticos (SINGH e CAMEOTRA, 2004).

Um biossurfactante com propriedades antimicrobianas é a iturina A, um potente lipopeptídico antifúngico, produzido por *Bacillus subtilis*. Em células de levedura, a iturina rompe a membrana plasmática pela formação de pequenas vesículas e agregação de partículas intramembranares, levando a liberarão do conteúdo celular (THIMON *et al*., 1995).

Vários estudos comprovam a utilização da surfactina, um lipopeptídeo cíclico produzido por *Bacillus subtilis*, em aplicações terapêuticas (SINGH e

CAMEOTRA, 2004). Existem três tipos de surfactina, A, B e C, os quais diferem em sua seqüência de aminoácidos. As propriedades antifúngicas e antibacterianas se devem às seguintes características apresentadas: indução da formação de canais de íons na membrana plasmática e inibição da adenosina monofosfato (cAMP) (SINGH e CAMEOTRA., 2004).

Em 1995, SHEPERD *et al*. testaram a utilização de uma gama de microorganismos para a produção de biossurfactantes com potencial de aplicação na indústria alimentícia. Dos 24 microorganismos testados, nove apresentaram boa atividade emulsificação, mas oito tiveram propriedades de emulsificação melhores do que aqueles já utilizados na indústria de alimentos como a goma arábica e carboximetilcelulose. Os oitos microorganismos incluem *Candida valida, Candida utilis, Hansenula anômala, Rhodospiridium diobovatum* e *Rhodotorula graminis*, a alga vermelha *Pophiridium cruentum* e as bactérias *Klebsiella spp e Acinetobacter calcoaceticus.*

3.2. Produção microbiana de biossurfactantes

Vários microorganismos possuem a capacidade de produzir moléculas com atividade interfacial (DESAI & BANAT, 1997). Nas últimas décadas tem-se aumentado o interesse em identificar e isolar novos microorganismos produtores de moléculas tenso-ativas que apresentem boas características de surfactante, como baixa CMC (concentração micelar crítica), baixa toxicidade, alta atividade de emulsificação, dentre outros (ROSENBERG & RON, 1999).

A maioria dos surfactantes microbianos relatados na literatura são de origem bacteriana como os produzidos por *Pseudomonas sp., Acinetobacter sp., Bacillus sp., Arthrobacter sp.* (GOUVEIA *et al*., 2003). Entretanto, a grande maioria dos biossurfactantes de origem bacteriana não é adequada para utilização na indústria alimentícia, devido a sua natureza patogênica (SHEPERD *et al.*, 1995).

As leveduras também têm sido estudadas para a produção de emulsificadores. Entre as leveduras, espécies de *Candida* (*Yarrowia*) têm sido largamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biossurfactanes. A Tabela 3.6 apresenta as espécies de leveduras mais estudadas e os respectivos biossurfactantes produzidos.

Uma grande vantagem do uso de leveduras é que muitas delas, como *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis,*

apresentam status GRAS (*generally regarded as safe*). Organismos com *status* GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

Tabela 3.6. Principais leveduras produtoras de biossurfactantes

Tipo de Biossurfactante	Microorganismo produtor	Referência
Manoproteína	*Kluyveromyces marxianus*	LUKONDEH *et al* ., 2003
	Saccharomyces cerevisiae	CAMERON *et al*., 1988
Soforolipídeos	*Wickerhamiella domercqiae*	JING *et al*., 2006
	Candida bombicola	CASAS e OCHOA, 1999
	Torulopis petrophilum	COOPER e PADDOCK, 1983
Manosileritritol – lipídeos	*Candida antarctica*	KITAMOTO *et al*., 1992
	Candida sp. SY16	KIM et al., 2006
Complexo carboidrato – proteína - lipídeo	*Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682*	AMARAL et al., 2006
	Yarrowia lipolytica NCIM 3589	ZINJARDE e PANT, 2002
	Debaryomyces polymorphus	SINGH e DESAI, 1989
	Candida tropicalis	SINGH e DESAI, 1989
	Candida lipolytica IA 1055	VANCE - HARROP et al., 2003
Complexo carboidrato - proteína	*Candida lipolytica ATCC 8662*	CIRIGLIANO e CARMAN, 1984
Ácido graxo	*Candida ingens*	AMÉZCUA - VEGA et al., 2007
ND*	*Candida utilis*	SHEPERD et al., 1995
	Cadida valida	SHEPERD et al., 1995
Polióis – lipídeos	*Rhodotorula glutinis,*	YOON & RHEE,1983
	Rhodotorula graminis	

ND* não determinado

Alguns microorganismos podem produzir biossurfactantes quando crescem em diferentes substratos, estes podem variar desde carboidratos até hidrocarbonetos. A mudança do substrato pode alterar a estrutura do biossurfatante, e consequentemente as propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se deseja propriedades específicas para uma aplicação direcionada (COOPER, 1986).

Diversos são os estudos realizados por vários autores na produção de biossurfactantes, envolvendo propriedades físico – químicas. A maioria dos

biossurfactantes é geralmente produzida quando as culturas alcançam o estágio estacionário de crescimento (RON & ROSENBERG, 2001). Porém, algumas espécies podem apresentar pequena produção durante a fase exponencial de crescimento. Exemplos de perfis de produção de bioemulsificante pelas leveduras *C. lipolytica* IA 1055 (SARUBBO, *et al*., 2001)) e *Y. lipolyitica* IMUFRJ 50682 (AMARAL *et al*., 2006) são apresentados na Figura 3.10. Apesar da produção de bioemulsificante por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 ocorrer durante a fase exponencial de crescimento, a atividade de emulsificação mais significativa se dá durante a fase estacionária.

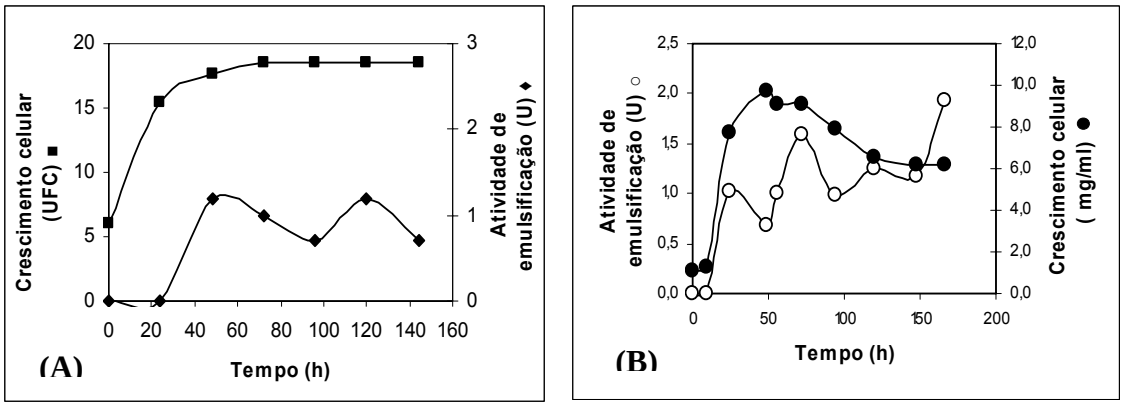


Figura 3.10. Perfil da produção de bioemulsificante pelas leveduras *C. lipolytica* IA 1055 (A) e *Y. lipolyitica* IMUFRJ 50682 (B).

3.3. *Yarrowia lipolytica*

A levedura *Yarrowia lipolytica* (anteriormente conhecida como *Candida, Endomycopisis* ou *Saccharomyces lipolytica*) é um microorganismo eucarioto, pertencente ao reino Fungi, a classe dos Ascomicetos e subclasse Hemiascomiceto. É uma das espécies não convencionais mais estudadas (TSUGAWA *et al.*, 1969). Isso, devido as suas características bioquímicas distintas, sua capacidade de produzir vários intermediários metabólicos, intensa atividade secretora de proteínas e ácidos orgânicos e de biossíntese de peroxissomas (SZABO, 2001).

Yarrowia lipolytica pode ser facilmente isolada de ambientes ricos em lipídeos e proteínas, como produtos lácteos, saladas de carne ou camarão, em aves cruas, no meio ambiente (como a Baía de Guanabara (RJ)) e em ambientes com elevadas concentrações de sais, como águas do mar

hipersalinas, dentre outros (BUTINAR *et al*., 2005; AMARAl *et al*., 2006; ISMAIL *et al*., 2001; VASDINYEI & DEAK, 2003; ISMAIL *et al*., 2001)

Dujon *et al.* (2004), estudando a evolução de leveduras, determinaram a seqüência genômica de vários microrganismos, incluindo todo o cromossomo 6 de *Yarrowia lipolytica*. Desta forma, possibilitou estudos de vários genes responsáveis pela expressão de proteínas, enzimas e até mesmo das moléculas de biossurfactantes produzidas por *Y. lipolytica* que tenham interesse industrial, permitindo aumentar a expressão de seus produtos metabólicos via engenharia genética. Hoje ela representa uma espécie aceitável para técnicas de biologia molecular e genética.

A utilização industrial de *Yarrowia lipolytica* para a produção de ácido cítrico ou proteínas celulares permitiu a acumulação de dados sobre o comportamento desta em grandes biorreatores (MADZAK *et al.*, 2004).

No processo de assimilação de substratos hidrofóbicos, *Yarrowia lipolytica* produz moléculas com propriedades tensoativas, como mostra o trabalho de CIRIGLIANO e CARMAN (1984). Os autores utilizaram diversos substratos hidrofóbicos como fonte de carbono, durante crescimento de *Yarrowia lipolytica* e observaram a presença de biossurfactantes.

AMARAL *et al.* (2006) isolaram um novo biossurfactante, denominado Yansan. Este foi secretado durante crescimento de *Y. lipolytica* em meio contendo glicose como fonte de carbono. Yansan apresentou alta atividade de emulsificação, mostrando que a produção de biossurfactantes não se dá apenas em meio hidrofóbico. Outro trabalho relatado na literatura foi desenvolvido por SARUBBO *et al.* (2001), no qual os autores também utilizaram glicose para a produção de biossurfactantes por *Y. lipolytica.*

O catabolismo de substratos hidrofóbicos, tais como alcanos, ácidos graxos e triglicerídeos nas leveduras, como em *Yarrowia lipolytica*, incluem várias vias metabólicas e diferentes compartimentos celulares (FICKERS *et al*., 2005).

Os triglicerídeos são primeiramente hidrolisados por enzimas lipolíticas (lipases) em ácidos graxos livres, os quais então entram na célula; já os alcanos passam pela membrana celular diretamente. A primeira oxidação dos alcanos em seu álcool correspondente ocorre no retículo endoplasmático pela citocromo P450 monooxigenase, sendo este posteriormente convertido em seu ácido graxo correspondente por dois passos. Os ácidos graxos são então ativados no retículo endoplasmático, no peroxissoma, antes de entrar na via da

β - oxidação dos ácidos graxos, que resulta em acetil-CoA e propionil-CoA (no caso de alcanos de cadeias ímpares). Dependendo das condições ambientais as células podem armazenar os ácidos graxos diretamente (FICKERS *et al*., 2005). Os intermediários metabólicos produzidos na β - oxidação entram no ciclo do glioxalato, o qual interage com o ciclo do ácido cítrico e o ciclo de metilcitrato na mitocôndria (FICKERS *et al*., 2005).

Duas hipóteses têm sido formuladas para explicar o transporte de substratos apolares para dentro da célula, uma delas é a produção de biossurfactantes, anteriormente citada e a outra é a interação dos substratos com a superfície celular da levedura, na qual há um aumento nas propriedades apolares da superfície da célula, tornando-as mais hidrofóbica (KIM *et al*., 2000). A Figura 3.11 mostra a interação da levedura *Y.lipolytica* com substratos hidrofóbicos.

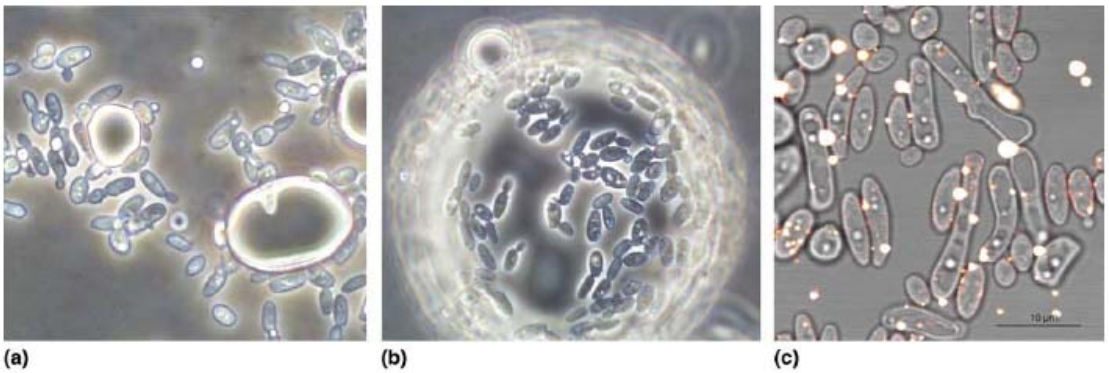


Figura 3.11. Interação das células de *Y.lipolytica* com substrato durante crescimento com substratos hidrofóbicos. Adesão celular de *Y.lipolytica* a pequenas (a) e grandes (b) gotas de hexadecano e (c) Adesão da gota de óleo na superfície celular durante crescimento da *Y.lipolytica* em ácido rinoleico como substrato (FLICKERS *et al*., 2005).

O mecanismo de utilização de açúcares por leveduras tem sido bastante estudado em *Saccharomyces cerevisiae,* sendo que existem algumas variações entre as espécies de levedura. Uma delas é que na maioria das leveduras não convencionais, como *Yarrowia lipolytica*, ao contrário com que acontece com *S. cerevisiae*, a respiração em presença de oxigênio é essencial para o uso de açúcares (FLORES *et al.*, 2000).

As membranas celulares não são totalmente permeáveis para uma variedade de substâncias, incluindo os açúcares. O transporte desses solutos é a etapa inicial do metabolismo de carboidratos, exceto nos casos de um trissacarídeo que é hidrolisado no exterior da célula. O transporte através da membrana se dá por transportadores conhecidos como permeases. O

transporte de monossacarídeos comuns, como glicose, frutose ou manose em *S. cerevisiae* é facilitado pelo processo de difusão, entretanto essa situação pode ser diferente em outras leveduras. Em *Y. lipolytica*, existem sistemas de transporte de glicose com dois componentes, que apresentam a mesma atividade independente da concentração de glicose no meio (FLORES *et al.*, 2000).

RODRIGUEZ e PAIS (2000) estudaram a influência do ácido acético e de outros ácidos carboxílicos fracos no crescimento e na morte celular de *Yarrowia lipolytica*. Estes autores observaram que esta levedura apresenta crescimento diáuxico quando colocadas em meio contendo glicose e ácido cítrico ou lático, sugerindo que este ácidos são utilizados em função da repressão por glicose. A presença de ácido propiônico, butírico e sórbico inibiu o crescimento da levedura.

3.4. FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por microorganismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido (BANAT, 1995). Para obtenção de grande quantidade de biossurfactante é de fundamental importância o estudo dos requerimentos nutricionais e das condições do processo.

A produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (DESAI e BANAT, 1997). A Tabela 3.7 apresenta diferentes estratégias para produção de biossurfactantes.

A produção de biosurfactantes por “resting cells” é uma forma de produção, em que não há multiplicação celular. Contudo, as células continuam a utilizar a fonte de carbono para produção do biossurfactante (DESAI e BANAT, 1997). Na literatura há alguns exemplos de produção de biossurfactantes por “resting cells” de leveduras, como a produção de

manosileritritol por *Candida antarctica* (KITAMOTO *et al*., 1992) e produção de soforolipídeos por *Torulopsis bombicola* (GÖBBERT *et al*., 1984; CASAS e OCHOA, 1999) e *Candida apicola* (HOMMEL *et al*., 1993) dentre outros.

Tabela 3.7. Diferentes estratégias de produção de biossurfactante (SYLDATK e WAGNER,1987).

Produção de biossurfactante associado ao crescimento celular
Indução da produção por substratos lipofílicos
Aumento da produção por otimização da composição do meio
Aumento da produção por otimização das condições de pH, aeração, velocidade de agitação, etc.
Aumento da produção por adição de reagentes, o qual causa uma mudança na permeabilidade da parede celular, como penicilina e EDTA
Produção de biossurfactante por crescimento celular em condições limitantes
Condições limitantes de nitrogênio
Condição limitante de cátions multivalentes
Condições limitantes por mudanças no ambiente do meio, como pH e temperatura.
Produção de biossurfactante por ”resting cell”
Produção por células livres
Produção por células imobilizadas
Produção por células imobilizadas com remoção simultânea do produto
Produção de biossurfactantes por crescimento associado e “resting cells” com adição de precursores

3.4.1. A fonte de carbono

A influência da fonte de carbono na produção de biossurfactante por diferentes cepas de microorganismos tem sido bastante estudada. A literatura aponta uma ampla diversidade entre as fontes de carbono. Pareilleux (1979) isolou compostos tenso-ativos a partir da levedura *Candida lipolytica* em meio contendo *n*-alcanos como fonte de carbono, mas quando foi cultivada em meio contendo glicose a levedura não produziu nenhum bioemulsificante. Em um estudo similar, ZINJARDE e PANT (2002) mostraram que a biossíntese de surfactante por *Y. lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fonte de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool) não é

viabilizada. Entretanto, em meio contendo óleo cru e alcanos (C_{10} – C_{18}) detectou-se a produção de bioemulsificante. Observações similares foram obtidas por Kim e Rehm (1982).

CIRIGLIANO e CARMAM (1984) mostraram que a levedura *Y. lipolytica* produz biossurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono tais como: hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão, sendo que com hexadecano houve maior produção de biossurfactante.

Em 2001, SARUBBO *et al*. produziram biossurfactante utilizando glicose como fonte de carbono a partir da levedura *C. lipolytica* IA 1055, o qual apresentou uma alta atividade de emulsificação. Estes autores mostraram que não é necessária a presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de surfactantes.AMARAL *et al.* (2006) utilizaram também como fonte de carbono a glicose para a síntese do biossurfactante denominado Yansan, a partir de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Yansan apresentou alta atividade de emulsificação e capacidade de estabilização de emulsões óleo/água. Adicionalmente, meios de cultura contendo lactose como substrato foram utilizados para a produção de manoproteínas, com propriedades emulsificantes, pela levedura *K. marxianus* (LUKONDEH *et al*., 2003).

Apesar da produção de biossurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, como os açúcares, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados (HOMMEL *et al*., 1994). Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel em água e um carboidrato, como constituintes do meio de cultura.

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

As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção de biossurfactante são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Por exemplo, quando se utiliza carboidratos como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de glicolipídeo, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias

lipogênicas (formação de lipídeos) e de formação da porção hidrofílica (através da via glicolítica) são especialmente supridas pelo metabolismo microbiano, como mostra a Figura 3.12.

O substrato hidrofílico utilizado, como por exemplo, a glicose, glicerol ou outros, é degradado até formar intermediários da via glicolítica como a glicose 6-fosfato que é um dos principais precursores dos carboidratos presentes na porção hidrofílica do biossurfactante (Figura 3.12). Para a produção de lipídeos, a glicose é oxidada a piruvato por meio da glicólise sendo o piruvato então convertido a acetil-CoA que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo, um dos precursores para síntese de lipídeos (SYLDATK e WAGNER, 1987).

Por outro lado, quando um hidrocarboneto é utilizado como fonte de carbono o metabolismo microbiano se dirige principalmente à via lipolítica e à gliconeogênese (formação de glicose a partir de precursores diferentes das hexoses), podendo desta forma ser utilizado para produzir ácidos graxos ou sacarídeos. Para a produção dos sacarídeos a via da gliconeogênese é ativada. Consiste na oxidação dos ácidos graxos via β-oxidação a acetil-CoA (ou propionil-CoA, no caso de ácidos graxos de cadeia ímpar). A partir da formação do acetil-CoA, as reações envolvidas na síntese dos precursores do polissacarídeo, tal como glicose 6-fosfato, são essencialmente o inverso daquelas envolvidas na glicólise. Entretanto as reações catalisadas pela piruvato quinase e fosfofrutoquinase-1 são irreversíveis, desta forma outras enzimas as quais são exclusivas para gliconeogênese são requeridas para contornar tais reações (SYLDATK e WAGNER, 1987). As principais reações são apresentadas na Figura 3.13, até a formação da glicose 6-fosfato que é a principal precursora dos polissacarídeos, dissacarídeos a serem formados para produção da porção hidrofílica dos glicolipídeos.

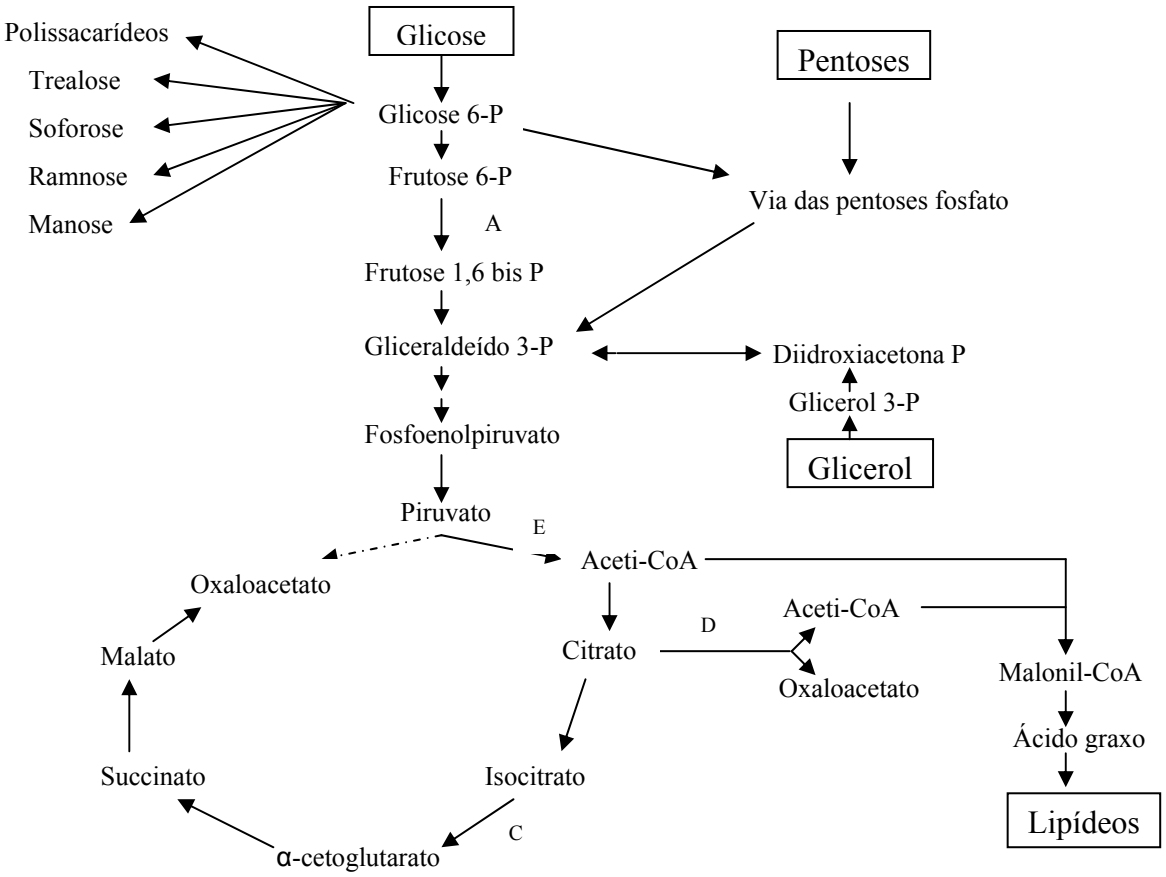


Figura 3.12. Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: A. fosfofrutoquinase; B. Piruvato quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos). E: piruvato desidrogenase (SYLDATK e WAGNER, 1987).

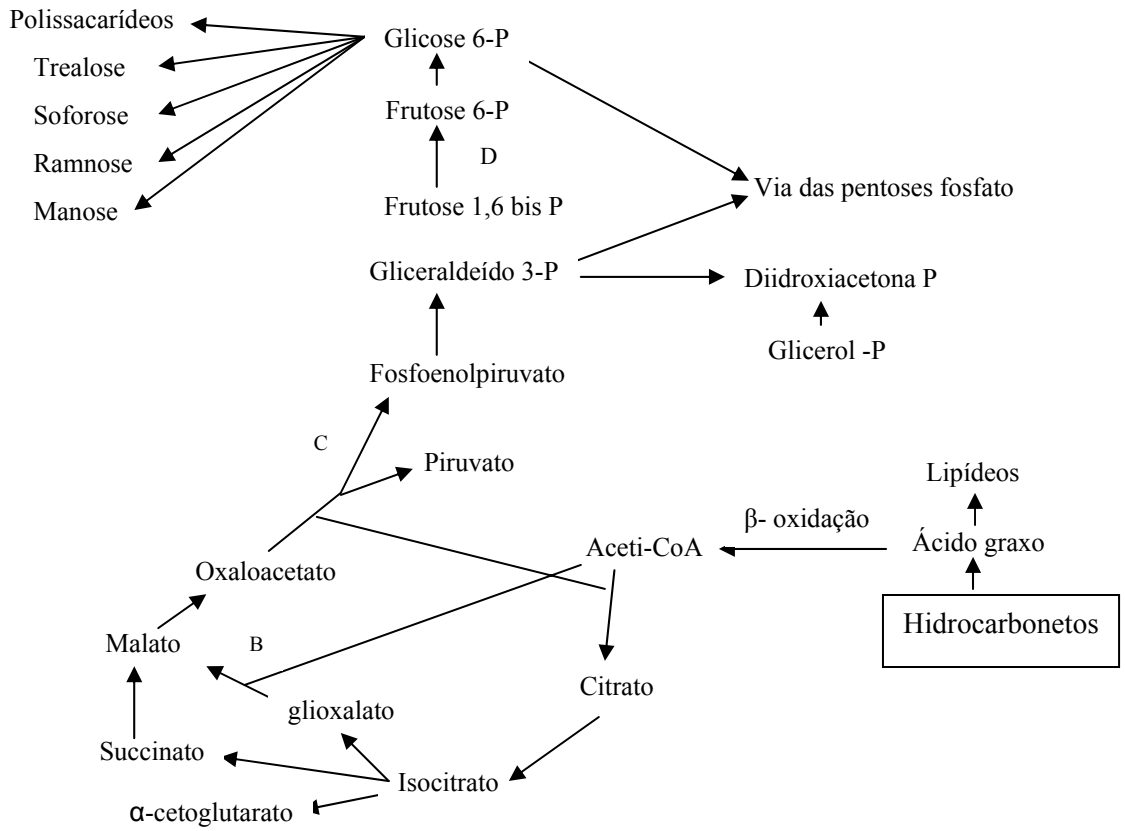


Figura 3.13. Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose – 1,6 bifosfatase (SYLDATK e WAGNER, 1987)

De acordo com SYLDATK e WAGNER (1987) a biossíntese do emulsificante pode acontecer seguindo quatro caminhos diferentes:

- Síntese do carboidrato e do lipídeo;

- Síntese da metade de carboidrato, enquanto que a síntese da metade lipídica dependerá do comprimento da cadeia do substrato carbônico presente no meio;

- Síntese da metade lipídica, enquanto que a síntese da metade de carboidrato dependerá do substrato utilizado;

- Síntese das metades carboidrato e lipídica dependendo do substrato.

Portanto, um fator que altera a biossíntese do surfactante é o comprimento da cadeia do *n*-alcano utilizado como fonte de carbono. KITAMOTO *et al.* (2001) estudaram a produção de lipídeos de manosileritritol (Mel) pela levedura *Candida antarctica* frente a diferentes *n*-alcanos. Observou-

se que essa espécie não cresce e nem produz biossurfactante em meio contendo uma mistura de *n*-alcanos entre C_{10} - C_{18}. Entretanto quando cultivado em meio contendo *n*-alcanos entre C_{12} e C_{18} houve produção, sendo que o octadecano foi o substrato que promoveu maior rendimento. Já em meio contendo *n*-alcanos com números de carbono maior que 19 a produção foi mínima.

A produção de manosileritritol lipídeo por *C. antarctica*, utilizando a metodologia "resting cell", também foi significativamente afetada pelo comprimento da cadeia carbônica do substrato utilizado, sendo que o maior rendimento foi obtido utilizando pentadecano como fonte de carbono (KITAMOTO *et al*., 1992).

CAVALERO e COOPER (2003) também mostraram que o rendimento da produção de biossurfactante aumenta com o aumento do comprimento da cadeia do *n*–alcano utilizado (C_{12} para C_{15}). Entretanto, ZINJARDE e PANT (2002) demonstraram que a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* foi similar quando se alterou o comprimento da cadeia do *n*–alcano (C_{10} a C_{18}) utilizado como substrato.

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

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

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

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

3.4.2. Fontes de carbono de origens renováveis

A utilização industrial dos biossurfactantes tem sido dificultada devido aos altos custos de produção associados ao uso de substratos dispendiosos. Por outro lado, estes custos podem ser significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes, com baixo custo, bem como através da obtenção de altos rendimentos em produtos (GALLERT e WINTER, 2002). Uma possível solução seria o reaproveitamento de subprodutos industriais como, por exemplo, aqueles provenientes da agroindústria.

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

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

BEDNARSKI *et al*. (2004), com o objetivo de avaliar a utilização de rejeitos gordurosos, empregaram o “soapstock” (resíduo da fábrica de sabão) como fonte de carbono para indução da biossíntese de glicolipídeos por leveduras (*C. antarctica* ATTCC 20509 e *C. apicola* ATCC 96134). Os autores mostraram que a eficiência na síntese de glicolipídeos por leveduras utilizando “soapstock” foi 7,5 a 8,3 vezes melhor do que em meio não suplementado com “soapstock”.

O resíduo da refinaria de óleo vegetal de soja e a milhocina (resíduo industrial do processamento de milho) foram utilizados como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Os resultados obtidos demonstraram que o melhor rendimento em biossurfactante foi obtido em meio de cultivo contendo 5% de resíduo de óleo vegetal e 2,5% de milhocina (SOBRINHO *et al.*, 2007)

Similarmente, ALMEIDA *et al.* (2006) utilizaram como substrato o resíduo do óleo de soja e a milhocina, e por meio de planejamento fatorial

demonstraram que a milhocina apresenta um resultado positivo, enquanto que o resíduo de óleo apresenta um efeito negativo.

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

C. glabrata foi cultivada em resíduo da indústria de fabricação de margarina (gordura vegetal) para a produção de biossurfactante. Já nas primeiras 24 h de cultivo, houve uma redução da tensão superficial do meio de 71 mN/m para 27mN/m, permanecendo constante até o final das 144 h de fermentação (GUSMÃO *et al*., 2006).

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

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

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

3.4.2.1. Suco de caju como substrato não-convencional

O cajueiro é uma planta tropical, originária do Brasil, pertencente à família *Anacardiaceae, Dicotyledonea* e ao gênero *Anacardium*, dispersa em quase todo o seu território. O caju compõe-se da castanha, que é o fruto, e do pedúnculo, considerado pseudofruto (Figura 3.14).

O cajueiro é encontrado em sua maioria na América Central, África, Ásia, Índia, Vietnam e Brasil, sendo estes responsáveis pela maior parte da produção mundial de castanha de caju. Atualmente o cajueiro vem sendo cultivado em 27 países. O Brasil lidera a produção de caju, detendo 95% da produção mundial (SANTOS *et al*., 2007).

No Brasil, a área ocupada com cajueiro corresponde a aproximadamente 700.000 ha, sendo que a região Nordeste responde com mais de 99% da área colhida e da produção nacional (aproximadamente 1,5 milhões Mg/ano). Os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte possuem cerca de 88% da área cultivada no País. Nestes locais, a cajucultura destaca-se, no contexto sócio e econômico, pelo valor nutritivo e comercial dos seus produtos, que garantem uma expressiva fonte de renda (SIMÕES *et al*., 2001; IBGE, 1996; ALMEIDA *et al*, 1998). Porém, cerca de 90 - 94% do pedúnculo é descartado no meio ambiente, pois é a castanha de caju que tem valor comercial.

Figura 3.14. Caju . (www.amazon.com.br)

O pedúnculo também apresenta altos valores nutricionais, constituindo fonte alimentícia no Nordeste do Brasil (MURA *et al*., 2001). A composição físico-química do pedúnculo varia largamente em função da variedade, do estádio de maturação, do tamanho, da duração da colheita e de variações

ambientais regionais, entre outros fatores. Dentre os principais constituintes do pedúnculo pode se citar: vitamina C, taninos, sais minerais, ácidos orgânicos, aminoácidos, carboidratos, ferro, cálcio, fazendo deste um importante alimento (FAO, 1986).

No entanto, apenas uma pequena parcela do pedúnculo produzido é aproveitada industrialmente. Uma pequena porcentagem, em torno de 6 a 12 %, é consumida ou processada industrialmente para produzir uma larga faixa de produtos como sucos, sorvetes, licor, mel, geléias, cajuína, refrigerantes gaseificados, aguardentes e doces. Os produtos processados industrialmente são basicamente consumidos pelo mercado local e não apresentam papel importante na economia regional (MOURA *et al*., 1998).

A enorme quantidade desperdiçada apresenta potencial de aplicação, pois é uma matéria-prima rica em açúcares, amido, fibras vitaminas e sais minerais. Pode-se considerar o pedúnculo de caju como um substrato nobre e de baixo custo, aproximadamente R$ 1,00/Kg (ROCHA, 2007).

Desta forma vários trabalhos na literatura estudam a utilização do suco de caju como substrato para obtenção de produtos biotecnológicos visando à diminuição dos custos do processo. Segundo (MANEERAT, 2005), a matéria-prima de um bioprocesso pode ser responsável por até 30% do custo total do processo.

Diversas são as aplicações, como por exemplo, a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* (OLIVEIRA, 2004), a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* (MENDES *et al.,* 2007), *Acinectobacter calcoaceticus* (OLIVEIRA *et al*., 2003), *Bacillus subtilis* (ROCHA, 2007).

HONORATO *et al*. (2007) utilizaram o suco de caju clarificado como substrato para o cultivo de *Leuconostoc mesenteroids* e biossíntese de produtos biotecnológicos de alto valor agregado. O suco de caju demonstrou ser um bom substrato para o crescimento do microorganismo e produção de dextrana, ácido lático, manitol e oligossacarídeos.

EZERONYE (2004) estudou a utilização do suco de caju como substrato para a fabricação de vinho, concluindo que este apresentou como um bom substrato para a fermentação em escala comercial. OSHO (2005) avaliou o suco de caju como suporte para o crescimento de leveduras e sugeriu como reserva alimentar e produção de vinho. Outro autor (AKINWALE, 2000) estudou

o uso do suco de caju para melhorar a qualidade nutricional de algumas frutas tropicais, por este apresentar alta concentração de vitamina C.

3.4.2.2. Subproduto do biodiesel como substrato não-convencional

A alta demanda de energia no mundo industrializado e no setor doméstico, bem como os problemas de poluição causados devido ao vasto uso de combustíveis, têm resultado em uma crescente necessidade de desenvolver fontes de energias renováveis sem limites de duração e de menor impacto ambiental que os meios tradicionais existentes, estimulando, assim, a busca de fontes alternativas para produção de combustíveis (GERIS *et al*, 2007). Como exemplos, podemos citar o biodiesel, cuja utilização permite reduzir as emissões de monóxido de carbono, comparados a combustíveis derivados do petróleo.

Biodiesel é definido como ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (monoésteres alquílicos) derivados de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gorduras animais (MEHER *et al*, 2004).

O Brasil é um país que contém grandes plantações de oleaginosas e, conseqüentemente, usufrui de uma diversidade de opções para produção de biodiesel a partir de plantas como palma, babaçu, soja, girassol, amendoim, mamona e dendê. O Governo Brasileiro lançou em 06 de dezembro de 2004 (ROUSSEFF, 2004) o marco regulatório que estabeleceu as condições legais para a introdução do biodiesel na Matriz Energética Brasileira de combustíveis líquidos. Em 2005, a Lei n° 11.097 estabelece a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor, em qualquer parte do território nacional. Esse percentual obrigatório será de 5% em oito anos após a publicação da referida lei, havendo um percentual obrigatório intermediário de 2% nos três anos após a publicação da mesma.

Das várias metodologias descritas na literatura para obtenção do biodiesel, a transesterificação de óleos vegetais é o principal método de escolha, pois as características físicas dos ésteres de ácidos graxos obtidas são muito próximas daquelas do diesel (SCHUCHARDT *et al*., 1998). O processo geral de obtenção do biodiesel está esquematizado na Figura 3.15., a partir da semente de mamona.

Na transesterificação de óleos vegetais, um triacilglicerídeo reage com um álcool na presença de uma base ou ácido forte, produzindo uma mistura de

ésteres de ácidos graxos e glicerol. A Figura 3.16, mostra a equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo

.

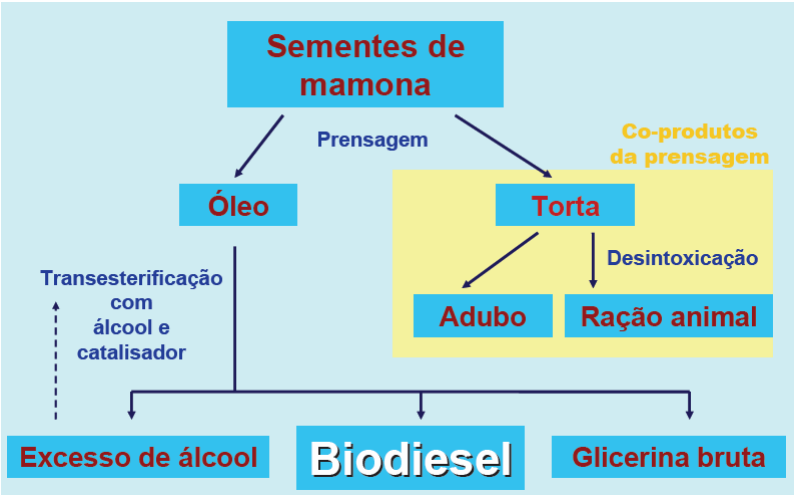


Figura 3.15. Esquema do processo de produção do biodiesel, a partir da semente de mamona (RIBEIRO, 2005)

Figura 3.16. Equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo (GERIS *et al.*, 2007)

A glicerina constitui o principal subproduto do processo de produção de biodiesel por transesterificação. Ela é obtida sob a forma bruta, cujo valor é muito baixo devido à presença de diversas impurezas (THOMPSON *et al.*, 2006). Entretanto, este subproduto constitui uma fonte de matéria-prima para produtos de alto valor agregado, como polímeros, através de conversão química ou bioquímica (rotas fermentativas), e aditivos para combustíveis, como ésteres e éteres de glicerina, que também se apresentam como alternativa rentável para este co-produto (KARINEN *et al.*, 2006).

Atualmente, a principal aplicação do glicerol é na indústria de cosméticos, sabão e fármacos, setores que são incapazes de absorver o volume de glicerina a ser gerado com a produção do biodiesel (GONÇALVES *et al.*, 2006). O aumento da glicerina disponibilizada no mercado brasileiro, com

a implantação do B2 (misturas de 2% de biodiesel em diesel), deverá ser da ordem de 60 a 80 mil toneladas/ano e com a introdução do B5 (misturas de 5% de biodiesel em diesel), em 2013, a previsão é que esta produção aumente para 150 mil toneladas por ano (MOTA *et al*., 2005). Sabe-se que a cada 1.000L de biodiesel produzido, cerca de 100Kg de glicerina é gerada, de acordo com dados da TECBIO-Tecnologias Bioenergéticas.

ASHBY *et al*. (2007) avaliaram a aplicação do subproduto da produção do biodiesel na produção de soforolipídeos a partir de *Candida bombicola*. Um rendimento de 60 $g.L^{-1}$ de biossurfactante foi obtido.

SOUSA *et al*. (2007) estudou a conversão da fase glicerinosa em biossurfactantes por *P. aeruginosa*. O biossurfactantes produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial da água em até 54,70%.

A literatura reporta vários trabalhos que estudaram a aplicação de glicerol puro como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes por diferentes microorganismos. Como exemplos tem-se *Pseudozyma antarctica* (MORITA *et al.*, 2007), *Rhodococcus erythropolis* (CIAPINA *et al*., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (SANTA ANNA, 2005), *Acinetobacter iwoffii* e, *Acinectobacter calcoaceticus* (OLIVEIRA *et al*, 2003).

3.4.3. A Fonte de nitrogênio

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

COOPPER e PADDOCK (1983) estudaram o efeito da fonte de nitrogênio, tais como nitrato de sódio, cloreto de amônio, nitrato de amônio,

$(NH_2)_2CO$ e extrato de levedura, na produção de biossurfactante por *T. bombicola* em frascos agitados. Os autores observaram que o nitrato não é uma boa fonte de nitrogênio, pois apresentou redução na produção da biomassa. Já com o extrato de levedura, na concentração de 5 g/L, houve melhor produção de biossurfactante. Quando se substituiu o extrato de levedura por peptona, a concentração obtida de biossurfactante foi reduzida à metade e quando esta foi substituída por uréia a produção foi muito baixa.

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

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

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

Como mostra a literatura, vários pesquisadores optaram por utilizar mais de um tipo de fonte de nitrogênio, obtendo boas concentrações de biossurfactante. VANCE –HARROP *et al* (1999) utilizaram como fonte de nitrogênio sulfato de amônio (0,1%) juntamente com uréia (0,1%) para a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*, detectando-se alta atividade de emulsificação.

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

Com o objetivo de aperfeiçoar o meio de produção do bioemulsificante por *C. lipolytica*, ALBUQUERQUE *et al* (2006) utilizaram planejamento fatorial para investigar efeitos e interações das concentrações de uréia, sulfato de amônio, dihidrogênio fosfato de potássio e óleo de milho na atividade de emulsificação. A presença de KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$ e óleo de milho tiveram uma influência positiva na atividade de emulsificação. Por outro lado a uréia teve uma influência negativa.

A produção de biossurfactante ocorre principalmente quando a fonte de nitrogênio está esgotada, durante a fase estacionária do crescimento da biomassa (KIM *et al.*, 2006). A Figura 3.17 apresenta o crescimento celular da levedura *C. antarctica* em batelada, em meio contendo íon amônio (10g/L) e peptona (1g/L) como fontes de nitrogênio. Observa-se que a produção do glicolipídeo ocorre quando há o esgotamento da fonte de nitrogênio (entre 50 e 200 horas), atingindo um valor de 38 g/L após 200h de fermentação (KIM *et al.*, 2006).

ALBRECHT *et al.* (1996) sugeriram um mecanismo pelo qual a síntese de biossurfactante acontece em condições limitantes de nitrogênio. Segundo os autores, esta condição causa um declínio na atividade específica da isocitrato desidrogenase (dependente de NAD^+ e $NADP^+$), enzima esta responsável pela oxidação do isocitrato a α - cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico. Como o declínio da atividade leva a um acúmulo de isocitrato e subseqüente citrato na mitocôndria, ambos são transportados para dentro do citosol onde o citrato é clivado pela citrato sintase, originando acetil-coA, que é o precursor da síntese de ácido graxo, aumentando dessa forma a produção de biossurfactante.

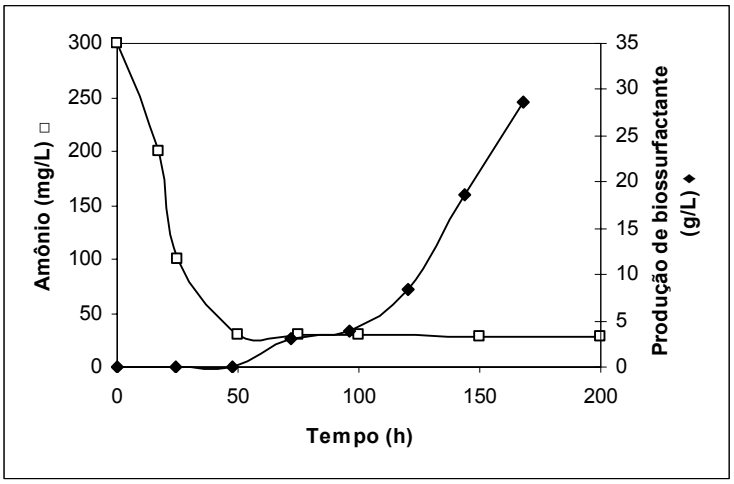


Figura 3.17. Cultivo de *Candida antarctica*, mostrando o consumo de nitrogênio (amônio) e o início da produção do biossurfactante MEL-SY16

Um parâmetro bastante estudado pelos pesquisadores é a relação quantitativa entre as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas para a produção de biossurfactante. Foi estudado o efeito de diferentes relações C/N na produção do bioemulsificante produzido por *Rhodotorula glutinis*, utilizando diferentes hidrocarbonetos. A atividade de emulsificação aumentou com o aumento da relação C/N na maioria dos casos, sendo esse aumento observado em condições limitantes de nitrogênio (ANDRADE *et al*., 2006). Observações similares foram obtidas com *C. tropicalis (*SINGH *et al*., 1990).

A Tabela 3.8 resume alguns dados da produção de biossurfactantes por leveduras, apresentando as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio de cultivo. Coeficientes de rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,012 a 0,675 g/g e valores de produtividade volumétrica (Q_P) entre 0,021 e 1,76 g/L.h têm sido relatados na produção de biossurfactantes por levedura.

3.4.4. Forma de condução do processo

Após a otimização do meio de cultivo, diferentes formas de condução de processos para obtenção de biossurfactantes, têm sido descritas na literatura de maneira a incrementar a produção dos mesmos.

De uma forma geral, um processo pode ser operado das seguintes formas (SILDAKT e WAGNER, 1987):

- Descontínuo (com um inóculo por tanque; com ou sem recirculação de células);

- Semicontínuo (batelada alimentada - com ou sem recirculação de células);

- Contínuo (conduzido em um ou em vários reatores; com ou sem recirculação de células).

Entre as opções supracitadas, as fermentações por batelada simples e batelada alimentada são as mais utilizadas para estudos de produção de biossurfactante por leveduras (Tabela 3.8).

Tabela 3.8. Dados de estudos da produção de biossurfactantes produzidos por leveduras registrados na literatura

Cepa	Fonte C (g/L)	Fonte N (g/L)	PB[a]	T[b] (h)	Modo de condução	$Y_{P/S}$ (g/g)	X[c] (g/L)	[d]$Y_{P/X}$ (g/g)	Qp (g/L.h)	Referência
T. bombicola ATCC22214	Glicose(500) Óleo de açafrão (1000)	Extrato levedura (5)	18 (g/L)	48	Batelada	0,012	12,4	1,45	0,375	COOPER & PADDOCK., 1984
C. bombicola ATCC22214	Glicose(100) Gordura animal (100)	[e]CSL (4) Ureia (1,5)	120 (g/L)	68	Batelada	0,6	30	4	1,76	DESPHANDE & DANIELS., 1995
C. tropicalis ATCC20336	Hexadecano (10)	Ext.levedura(0,3) Peptona (0,5)	0,81 U	72	Batelada	ND	ND	ND	ND	SINGH E DESAI., 1989
D.polymorphus ATCC20499	Hexadecano (10)	Ext.levedura(0,3) Peptona (0,5)	0,11 U	72	Batelada	ND	ND	ND	ND	SINGH E DESAI., 1989
Candida sp. SY 16	* Glicose(15) Óleo de soja (15)	Peptona (1)	95 (g/L)	200	Batelada alimentada	0,475	15,0	6,33	0,475	KIM *et al*., 2006
Candida bombicola	Glicose(100) Óleo de girassol (100)	Extrato levedura (1)	120 (g/L)	192	Batelada "Resting cell"	0,6	23,0	5,21	0,625	CASAS & OCHOA., 1999
C. antarctica ATCC20509	Óleo de soja (80)	Extrato levedura (1)	46 (g/L)	144	Batelada	0,57	28,4	1,61	0,32	ADAMCZAK & BEDNARSKI., 2000
C. antarctica ATCC20509	"Soapstock" (100)	Extrato levedura (1) $NaNO_3$ (2)	15,9 (g/L)	85	Batelada alimentada	0,636	1,8	8,83	0,1870	BEDNARSKI *et al*., 2004
C. antarctica T-34	Óleo de amêndoa (80)	Extrato levedura (1)	47 (g/L)	144	Batelada "Resting cell"	0,587	24	1,95	0,326	KITAMOTO *et al*., 1992
C. antarctica T-34	n- octadecano (60)	Extrato levedura (1) $NaNO_3$ (2)	40,5 (g/L)	144	Batelada "Resting cell"	0,675	16	2,53	0,281	KITAMOTO *et al*., 2001
Wickerhamiella Domercqiae Y_{2A}	Glicose(50) Óleo de canola (20)	Extrato levedura (2)	ND	ND	Batelada	ND	ND	ND	ND	JING *et al*., 2006
C. ingens CB-216	Óleo de milho (20)	Extrato levedura (2)	5,6 (g/L)	168	Batelada	0,28	23,9	0,234	0,033	VEGA *et al* ., 2007
C. lipolítica ATCC 8662	Hexadecano (10)	Extrato levedura (6)	1,3 U/mL	130	Batelada	ND	ND	ND	ND	CIRIGLIANO & CARMAN., 1984
Y. lipolítica NCIM3589	Hexadecano (10)	$(NH_4)_2SO_4$ (5)	3,0 U/mL	144	Batelada	ND	3	ND	ND	ZINJARDE & PANT., 2002
C. lipolítica IA 1055	Óleo de babaçu (50)	Ureia (0,25)	0,66 U/mL	60	Batelada alimentada	ND	6 UFC/ mL	ND	ND	HARROP *et al*., 2003
C. lipolítica IA 1055	Óleo de milho (50)	Ureia (0,1)	0,235 U/mL	168	Batelada	ND	3,5 UFC / mL	ND	ND	HARROP *et al*., 1999
Y. lipolítica IMUFRJ 50682	Glicose (20)	Peptona (6,4) Extrato levedura (10)	2,0 U/mL	170	Batelada	ND	ND	ND	ND	AMARAL *et al*., 2006
C. lipolítica UCP0988	Glicose(100) Óleo de canola (100)	Extrato levedura (2)	8 (g/L)	48	Batelada	0,04	ND	ND	0,166	FARIAS *et al*., 2006
K. marxianus FII 510700	Lactose (40)	Extrato levedura (2) $(NH_4)_2SO_4$ (5)	ND	ND	Batelada	ND	ND	ND	ND	LUKONDEH et al., 2003
C. apicola ATCC 20509	"Soapstock" (100)	Extrato levedura (1) $NaNO_3$ (2)	10,3 (g/L)	144	Batelada	0,103	6,5	9,70	0,071	BEDNARSKI *et al*., 2004
C. glabrata UCP 1002	Glicose(50) Óleo de semente de algodão (75)	Extrato levedura (3) NH_4NO_3 (1)	10 (g/L)	144	Batelada	0,08	18 cél/mL	ND	0,069	SARUBBO *et al*., 2006
Candida. ishiwadae	Óleo de soja queimado (40)	Extrato levedura (0,5) NH_4NO_3 (3)	0,25 µg	168	Batelada	ND	ND	ND	ND	THANOMSUB et al., 2004
C. sphaerica UCP 995	Resíduo de óleo vegetal (50)	Milhocina (25)	3,116 (g/L)	144	Batelada	0,06	2,264	1,37	0,021	Sobrinho et al., 2006

[a]PB: produção de biossurfactantes; [b]T: tempo de produção do biosurfactante; [c]X: concentração de células produzidas; [d]$Y_{P/X}$: coeficiente de rendimento de biosurfactante em relação a concentração celular; [e]CSL: corn steep liquor;; [f]ND: não determinado

O cultivo por batelada e batelada alimentada são modos de condução de bioprocessos, cujas características tornam suas aplicações atrativas para uma grande gama de processos fermentativos, por exigir menos em termos de equipamentos e manutenção. São também mais seguros em relação as condições de assepsia, pois ao final de cada batelada o reator é esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo, com todos os controles necessários, a fim de assegurar a presença única do microorganismo responsável pelo processo (HISS, 2001).

No decorrer do processo por batelada simples nada é adicionado, exceto oxigênio no caso de processos aeróbicos, anti-espumante e ácido ou base para controle do pH. Entretanto durante a batelada alimentada os nutrientes, ou parte deles, são adicionados ao biorreator por uma corrente de alimentação, que por não existir descarga, provoca um contínuo incremento do volume ocupado no reator. Normalmente, esta forma de condução de bioprocessos é utilizada em sistemas nos quais o agente microbiano é fortemente sensível a fenômenos de inibição por substrato, ou repressão catabólica, tipicamente manifestados em sistemas que apresentem cinética de formação de produto não associado ao crescimento (HISS, 2001).

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

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

Outros modos de condução de processo também foram avaliados. KIM *et al* (1999) estudaram a produção de biossurfactante pela levedura *T. bombicola*, via processo contínuo, com o objetivo de investigar os efeitos da glicose e do óleo de soja no crescimento celular e na produção de biossurfactante.

Deste modo, a escolha adequada da forma de condução do processo é um passo importante uma vez que pode alterar a produtividade do produto desejado.

3.4.5. Temperatura, pH, aeração e agitação

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

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

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

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

Aeração e agitação são dois fatores importantes que influenciam na produção de biossurfactante, uma vez que facilitam a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa (SCHMIDELL, 2001). ADAMCZAK e BEDNARSKI (2000) avaliaram a influência da aeração na síntese de biossurfactante por *C. antarctica*. A maior produção de biossurfactante (45,5 g/L) foi alcançada quando a levedura foi cultivada com uma taxa de aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) e a concentração de oxigênio dissolvido controlada em 50% do valor da saturação. Entretanto quando se alterou a aeração para 2 vvm, houve uma produção intensa de espuma e a produção de biossurfactante decaiu 84%. A formação de espuma não é um fator desejado na produção, uma vez que retira do meio reacional parte do biossurfactante, biomassa e lipídeos.

GUILMANOV *et al.* (2002), investigaram o efeito da aeração, por meio de experimentos em frascos agitados, na produção de soforolipídeos por *C. bombicola*. O maior rendimento foi obtido com a taxa de aeração entre 50 e 80 mM O_2/L.h.

Com o objetivo de ampliar o processo de produção do bioemulsificante por *C. lipolytica*, da escala de frascos para a escala de biorreator, ALBUQUERQUE *et al*. (2006) estudaram os efeitos da agitação e da temperatura na produção de biossurfactante frente a diferentes óleos. Verificou-se que o aumento da temperatura exerceu um efeito negativo significativo sobre as atividades de emulsificação para as emulsões água em hexadecano e água em óleo de milho e que o aumento da velocidade de agitação produziu um efeito positivo sobre a atividade de emulsificação de água em óleo de canola. As melhores condições de operação para a produção do biosurfactante foram temperatura de 28ºC e agitação de 300 rpm.

A atividade de emulsificação do biossurfactante produzido pelas leveduras *Candida tropicalis* e *Debaryomyces polymorphus* não foi alterada, em uma faixa de pH entre 4 e 11 (SINGH *et al*., 1989) Já a produção do bioemulsificante produzido pela levedura *Rhodotorula glutinis* durante fermentação em batelada alimentada foi significativamente influenciada tanto pela temperatura como pelo pH, sendo as condições ótimas obtidas para a produção, temperatura de 30º C e pH 4 (JOHNSON *et al*., 1992).

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

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

A acidez do meio de produção foi um parâmetro correlacionado com a eficiência da síntese de glicolipídeos por *C. antarctica* e *C. apicola*. Mantendo o pH em 5,5 obteve-se maior produção de glicolipídeos. Contudo, quando não se ajustou o pH no meio de cultura, obteve-se um efeito negativo na eficiência de

síntese (BEDNARSKI *et al*., 2004). Um efeito similar foi observado na produção de glicolipídeos por *C. antarctica,* através de batelada alimentada. O melhor rendimento da produção foi com controle do pH, mantendo-se em 4, sendo significativamente melhorada quando comparada com a fermentação sem o controle do pH (LUNA *et al*., 2005).

.

4. MATERIAIS E METÓDOS

4.1. Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: peptona e extrato de lêvedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), glicose (*Reagen* – R.J., Brasil), agar-agar, uréia, sulfato de amônio e glicerol (Vetec – R.J., Brasil), hexadecano (*Sigma-Aldrich CO* (MO, USA)).

O óleo de oliva (azeite extravirgem) utilizado foi da marca "Andorinha" (Elaborado por Simão e Cia, Comércio e Indústria S.A., Alferrarede, Portugal) com 0,5% de acidez máxima.

Os *kits* enzimáticos para dosagem de glicose e glicerol foram fornecidos pela Merck e Laborlab, respectivamente.

O suco de caju clarificado, a glicerina bruta e a tratada foram gentilmente cedidos pela professora Luciana Rocha Barros Gonçalves da Universidade Federal do Ceará. O suco de caju foi processado na Embrapa Agroindústria Tropical (Ceará). A glicerina bruta foi obtida de uma planta piloto do NUTEC - Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará - da empresa TECBIO.

Foram utilizadas membranas em éster de celulose 0,45 µm (*Millipore*, S.P., Brasil).

4.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Centrífuga *Fanem* modelo *204-NR*;
2) Centrífuga *Sigma 2K 15*;
3) Espectrofotômetro *Hach DR/4000 UV*;
4) Capela de fluxo laminar equipada com luz UV – *Labconco*;
5) Incubador com agitação (*shaker*) *Certomat BS-1*;
6) Vortex (Tecnal)
7) Microscópio ótico *Olympus*, modelo BX51;

8) Tensiômetro NIMA DST 9005 (*NIMA Technology*, Ltd);
9) Viscosímetro Cannon-Fenske, capilar nº 75 (*Schott*)

4.3. Microrganismo

A levedura empregada no presente trabalho é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 IMUFRJ 50682 (Figura 4.1) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

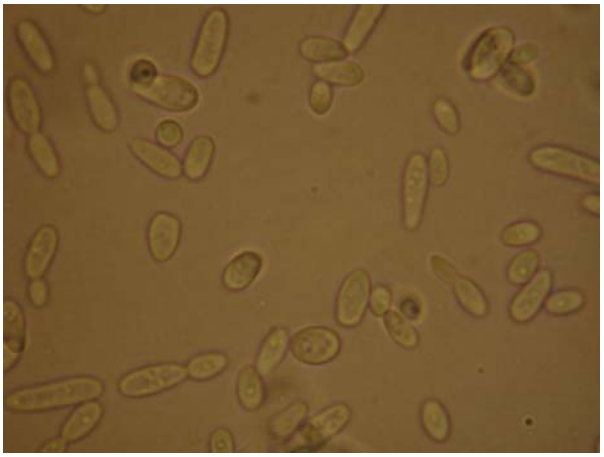


Figura 4.1. Morfologia microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 1000x).

4.4. Manutenção da cultura

As células foram conservadas a 4ºC após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD ("***Y**east **E**xtract*, ***P**eptone*, ***D**extrose*") contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e agar 2%.

4.5. Obtenção do inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 4.4) inoculava-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Após cerca de 70 horas em um incubador rotatório a 28ºC, 160 rpm, a absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo era determinada e, em seguida as células eram centrifugadas de forma estéril a 3.000 *g* por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo servindo de inóculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, 1,0 ± 0,1 mg p.s. cel/mL nos meios de cultivo, esta concentração inicial foi utilizada em todos os experimentos

4.6. Efeito da velocidade de agitação e aeração

A influência da aeração foi avaliada pela variação da razão entre volume de meio sobre o volume do frasco (Vm/Vf). Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 1000 mL com 250 e 500 mL de meio líquido YPD (1% de extrato de lêvedo, 0,64% de peptona, 2% de glicose, p/v), a 28ºC em incubador rotatório (shaker) em duas velocidades de agitação diferentes: 160 e 250 rpm. A Tabela 4.1 resume os experimentos realizados. Tais velocidades de agitação foram utilizadas a fim de se verificar a influência da dispersão do oxigênio nas variáveis de cultivo estudadas (crescimento celular, consumo de substrato e produção de biossurfactante). Esses experimentos foram realizados por 96 horas com amostragem diária para medida de crescimento celular, índice de emulsificação, tensão superficial e método “oil spreading”.

Tabela 4.1. Experimentos realizados para avaliar o efeito da velocidade de agitação e aeração

Experimento	Razão Vm/Vf	Agitação (rpm)
1	0,3	160
2	0,3	250
3	0,5	250
4	0,5	160

4.7. Otimização da fonte de nitrogênio

Para selecionar as melhores fontes de nitrogênio para a produção de biossurfactante, foi aplicado o método do planejamento fatorial 2^4 completo, com o uso do programa de computação Statistica 7.0. Os parâmetros fixados e adotados como variáveis independentes foram uréia, sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona (Tabela 4.2), cujos valores mostrados representam os limites para cada parâmetro estudado. A fonte de carbono utilizada foi glicose 2% (p/v). Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio de cultivo, a 28ºC em incubador rotatório (*shaker*) a 250 rpm por 96 horas.

As variáveis de resposta utilizadas para a seleção das melhores condições foram: máxima variação da tensão superficial, índice de emulsificação e “oil spreading”.

A Tabela 4.3 mostra os experimentos a serem realizados no planejamento experimental. Os experimentos foram realizados aleatoriamente.

Tabela 4.2. Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2^4

Variáveis independentes	Nível - 1	0	+ 1
Uréia (g/L)	0	0,1	0,2
$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	0	5	10
Extrato de levedura(g/L)	5	10	15
Peptona (g/L)	0	6,4	12,8

Tabela 4.3. Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0

Nº Exper.	Uréia	$(NH_4)_2SO_4$	Extrato de levedura	Peptona
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	+1
3	-1	-1	+1	-1
4	-1	-1	+1	+1
5	-1	+1	-1	-1
6	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1
8	-1	+1	+1	+1
9	+1	-1	-1	-1
10	+1	-1	-1	+1
11	+1	-1	+1	-1
12	+1	-1	+1	+1
13	+1	+1	-1	-1
14	+1	+1	-1	+1
15	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

4.8. Estudo da influência da fonte de carbono

Após a seleção da melhor fonte de nitrogênio, foi feita a otimização da fonte de carbono, através de um planejamento fatorial 2^4 completo. As variáveis de resposta utilizadas para a seleção das melhores condições foram: máxima variação da tensão superficial e índice de emulsificação. Os parâmetros fixados e adotados como variáveis independentes foram: glicose, glicerol, hexadecano e óleo de oliva, como apresentado na Tabela 4.4, cujos valores mostrados representam os limites para cada parâmetro estudado. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio de cultivo, a 28ºC em incubador rotatório (*shaker*) a 250 rpm por 96 horas.

Tabela 4.4. Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2^4

Variáveis independentes	Nível		
	- 1	0	+ 1
Glicose (% p/v)	0	2	4
Hexadecano (% v/v)	0	1	2
Óleo de oliva (% v/v)	0	2	4
Glicerol (% v/v)	0	1	2

4.9. Estudo da influência do pH inicial na produção de biossurfactante

Para se avaliar o efeito do pH inicial na produção de biossurfactante, variou-se o pH inicial do meio de cultivo, entre 5,0 e 9,0, utilizando NaOH ou HCl 1M, para ajuste do valor de pH desejado.

Para este fim, utilizou-se como fonte de carbono glicose 4% p/v e glicerol 2% p/v e como fonte de nitrogênio sulfato de amônio 10 $g.L^{-1}$ e extrato de lêvedo 0,5 $g.L^{-1}$. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio de cultivo, a 28ºC em incubador rotatório (*shaker*) a 250 rpm por 96 horas.

A produção foi avaliada através da medida de tensão superficial e do índice de emulsificação.

4.10. Produção de biossurfactante utilizando fontes de carbono de origens renováveis

4.10.1. Suco de caju clarificado

O suco de caju clarificado (CAJC) foi utilizado para a produção de biossurfactantes por *Y.lipolytica*. A composição do CAJC é apresentada na Tabela 4.6, segundo ROCHA (2007).

A Tabela 4.5 resume os meios de cultivo utilizados. No 1º experimento o suco de caju foi diluído em 1:1 com água destilada, e com suplementação da fonte de nitrogênio com 0,26 g/L de sulfato de amônio. Essas proporções foram utilizadas para manter a relação ótima de C/N (11,65) obtida nos experimentos de otimização da fonte de carbono. A suplementação de nitrogênio se fez necessária uma vez que o suco de caju clarificado apresenta baixa

concentração de proteínas solúveis e totais, as quais servem como fonte de nitrogênio (Tabela 4.6).

No 2º experimento o suco de caju foi diluído 1:1, porém sem adição da fonte de nitrogênio. No 3º experimento o suco de caju foi diluído 1:10, segundo Rocha (2007). No 4 º experimento estudou-se a suplementação da fonte de carbono (glicerol 2%) no suco de caju diluído 1:10.

O pH inicial dos meios de cultivo foram ajustados para 7,0 com NaOH 1M. Posteriormente, esterilizou-se o meio por filtração utilizando membrana com poro de diâmetro de 0,45 µm. A fermentação foi conduzida a 28º C, em incubador rotatório (shaker) a 250 rpm. Em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para medidas do crescimento celular, pH, tensão superficial, índice de emulsificação do meio de cultivo e determinação da concentração de açúcares e glicerol, quando presentes. Antes de analisadas, as amostras eram primeiramente filtradas em membrana de diâmetro de 0,45 µm para a remoção de células.

Tabela 4.5. Meios de cultivo utilizados para produção de biossurfactante por *Y.lipolytica*

Meio de cultivo	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio
1	CAJC 1:1	---
2	CAJC 1:1	2,44 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$
3	CAJC 1:10	---
4	CAJC 1:10	10 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$

Tabela 4.6. Composição do suco de caju clarificado

Parâmetro	Concentração
Glicose ($g.L^{-1}$)	43,67 ± 0,3
Frutose ($g.L^{-1}$)	42,43 ± 0,1
Proteínas solúveis ($mg.mL^{-1}$)	0,10 ± 0,0
Proteínas Totais ($mg.mL^{-1}$)	5,19 ± 0,0
Fósforo ($g.L^{-1}$)	1,21 ± 0,0
Potássio ($g.L^{-1}$)	13,13 ± 0.9
Cálcio ($g.L^{-1}$)	< DL
Magnésio ($g.L^{-1}$)	1,17 ± 0,1
Sódio ($g.L^{-1}$)	0,09 ± 0,0
Enxofre ($g.L^{-1}$)	0,81 ± 0,0
Cobre ($mg.L^{-1}$)	< DL
Ferro ($mg.L^{-1}$)	6,97 ± 2,7
Zinco ($mg.L^{-1}$)	11,20 ± 4,3
Manganês ($mg.L^{-1}$)	6,40 ± 0,4

pH = 4,32 ± 0,0. (ROCHA, 2007)

4.10.2. Subproduto do biodiesel

A fase glicerinosa resultante da transesterificação do óleo de mamona foi utilizada para produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*. Foram utilizadas para os experimentos a glicerina bruta (pré-tratada) e a glicerina tratada, ver procedimento no item 4.10.2.1 e 4.10.2.2.

A glicerina bruta e a tratada foram caracterizadas quanto a concentração de glicerol (item 4.13.5), quantidade de carbono total (item 4.13.6) e nitrogênio total (item 4.13.7)

Para avaliação do crescimento celular de *Y.lipolytica* e da produção de biossurfactante foram utilizadas glicerina bruta e tratada na concentração de 3% v/v cada, com adição de 10 $g.L^{-1}$ de sulfato de amônio e 0,5 $g.L^{-1}$ de extrato de lêvedo como fontes de nitrogênio, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata. As fermentações foram conduzidas em Erlenmeyers de 1000 mL com 500 mL de meio líquido, a 28ºC em incubador rotatório (shaker) a 250 rpm por 96 horas, e a cada 24 horas duas alíquotas eram retiradas, de acordo com o item 4.12.

4.10.2.1. Glicerina bruta

Pré-tratamento Glicerina Bruta:

O pH da fase glicerinosa foi corrigido com H_2SO_4 (N) a fim de eliminar a alcalinidade livre. Em seguida, foi submetida a aquecimento sob agitação, para eliminação do metanol, até 120ºC durante ±1 hora, ou até cessar a formação de espuma. O sulfato resultante da neutralização foi separado por decantação em funil de separação.

4.10.2.2. Glicerina tratada

Hidrólise ácida da Glicerina Bruta:

Inicialmente determinou-se a alcalinidade total da glicerina (livre+combinada). Em seguida, obteve-se o volume de H_2SO_4 concentrado que deve ser adicionado à fase glicerinosa contida em funil de separação, de acordo com a equação, descrita abaixo.

$$V_{H2SO4} = \frac{AT \times m(g)}{36} \times 1{,}33 \qquad (4.1)$$

onde: AT – alcalinidade total

m – massa de fase glicerinosa

36 – normalidade do H_2SO_4 concentrado

33% (em relação ao volume de H_2SO_4)

À fase glicerinosa, além de adicionar o ácido, adiciona-se um volume de água equivalente a 1/3 do volume de ácido determinado. Em seguida, a massa reacional permanece em repouso até que as duas fases, ácido graxo e glicerina, separem-se. Este procedimento foi realizado em capela.

O tratamento foi realizado no Departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, pela aluna Juliana Rabelo de Sousa.

4.11. Esterilização dos meios de cultura

Todos os meios sintéticos, assim como os instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo, foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 15 minutos. O suco de caju clarificado (CAJC) foi esterilizado por filtração em membrana (éster de celulose - Millipore) estéril com diâmetro de poros de 0,45 µm.

4.12. Amostragem

Em todos os experimentos foram retiradas alíquotas, por dia de fermentação (a cada 24 h). O procedimento consistia em retirar duas amostras do meio fermentado: uma era diluída para leitura em espectrofotômetro e obtenção da concentração celular, e a outra alíquota (50 mL) era centrifugada, sendo ambas retiradas com o auxílio de pipetas estéreis e de forma asséptica em câmara de fluxo laminar. A amostra era centrifugada a 3000 g durante 5 minutos e filtrada em membrana de celulose com uma porosidade de 0,45 µm, para remoção de possíveis resíduos celulares, sendo o sobrenadante congelado (-4ºC) para posterior análise da produção de biossurfactante (tensão

superficial, índice de emulsificação, “oil spreading” e viscosidade) e dosagens de glicose, açúcares redutores totais e glicerol, quando presentes no meio de cultivo. Em todos os procedimentos de amostragem foi observado o máximo rigor asséptico.

4.13. Determinação da produção de biossurfactante

Quatro métodos foram utilizados para acompanhar a produção do biossurfactante: tensão superficial, índice de emulsificação técnica “oil spreading” e viscosidade.

4.13.1 Tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada utilizando o tensiômetro K100 Krüss (Figura 4.2), segundo o método da placa e anel De Nöuy. Para cada amostra analisada foram necessários 30 mL de sobrenadante livre de células, mantido a 30°C. O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura.

As análises foram realizadas no laboratório de Sistemas Particulados, sob responsabilidade do professor Márcio Nele de Souza.

Figura 4.2. Tensiômetro K100 Krüss

4.13.2. Índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi realizado, segundo Cooper e Goldenberg (1987), com algumas modificações. Este procedimento consistiu em colocar 1 mL do meio de cultura fermentado (livre de células) em tubo de ensaio, adicionando o mesmo volume de hexadecano, seguidos por agitação em alta velocidade em vórtex durante 2 minutos. Após 24 horas calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e altura total (Equação 4.2). O teste do índice de emulsificação foi realizado em duplicata. A Figura 4.3 mostra o procedimento da medida.

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} * 100 \qquad (4.2)$$

sendo H_{EL} a altura da região emulsificada e H_S a altura total.

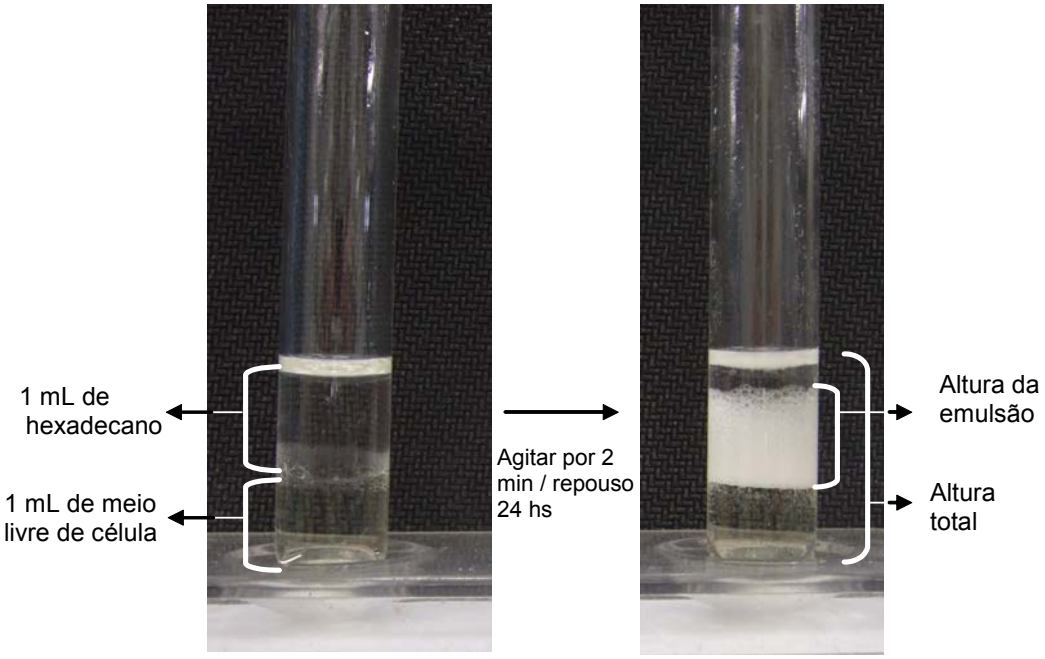


Figura 4.3. Procedimento de medida do índice de emulsificação

4.13.3. Método "Oil spreading"

O método "Oil spreading" foi realizado segundo YOUSSEF *et al.* (2004), com algumas modificações. Neste método, a produção de biossurfactante é medida pelo espalhamento (cm) do óleo cru, que se encontra em cima da água, pela adição de meio de cultivo livre de células. A medida consiste na adição de 50 mL de água destilada em uma placa de petri, adição de 40 µL de óleo cru na superfície da água (Figura 4.4. A) e posteriormente adição de 10 µL de meio de cultura livre de células na superfície do óleo cru, levando a formação de uma zona clara (Figura 4.4.B). O diâmetro da zona clara formada na superfície do óleo é medida com auxílio de um paquímetro. O diâmetro de cada amostra é determinado em triplicata.

O óleo cru empregado neste trabalho foi o Petróleo Marlin gentilmente cedido pela Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS), tendo como principais características: 18,93 ºAPI (petróleo pesado); asfaltenos = 3,1%; relação resinas / asfaltenos = 8,1; relação saturados / aromáticos = 1,6; 2,66% de N, S e O.

Para validar a metodologia "oil spreading" construiu-se uma curva padrão com concentrações crescentes de pectina (Figura 4.5), onde se observou o aumento do diâmetro da zona clara com aumento da concentração de pectina.

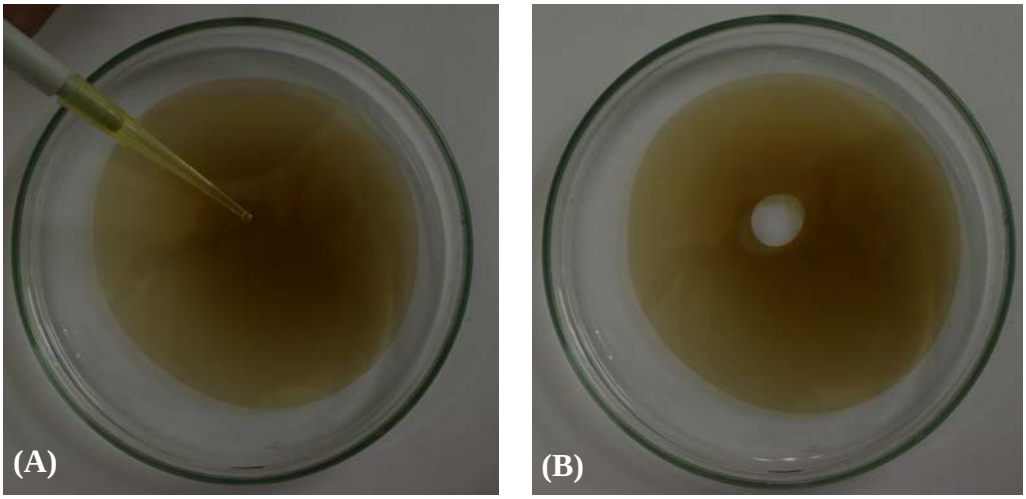


Figura 4.4. Técnica "oil spreading". Adição de 40 µL de óleo cru na superfície da água destilada em placa de Petri (A) e posterior adição de 10 µL de meio de cultura livre de células na superfície do óleo cru, levando a formação de uma zona clara (B).(Foto: Etel Kameda)

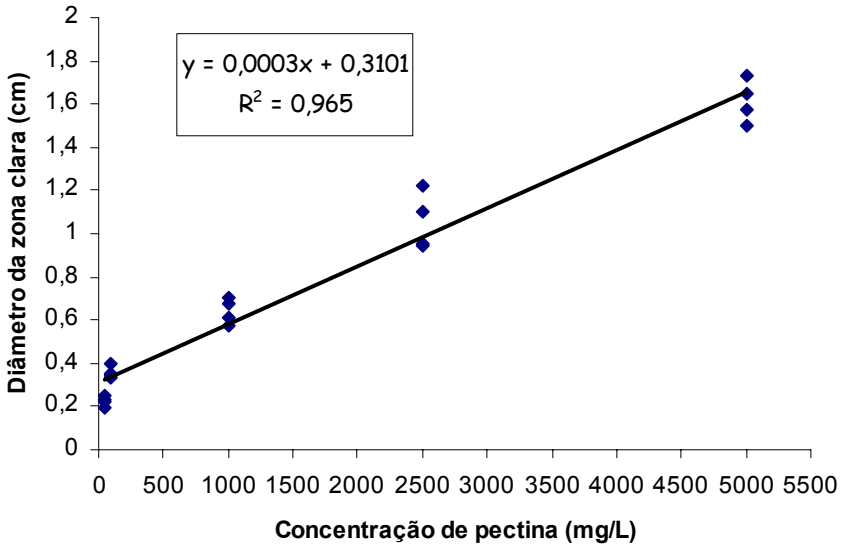


Figura 4.5. Curva padrão "oil spreading". Concentração de pectina (mg/L) versus diâmetro da zona clara (cm).

4.13.4. Viscosidade

A presença de alguns bioemulsificantes, como a goma xantana e outros polissacarídeos, aumentam a viscosidade do meio de cultivo durante a sua produção por microrganismo (DIAZ *et al*. 2004), portanto, este parâmetro foi utilizado para acompanhar a produção de biossurfactante/bioemulsificante por *Y.lipolytica.* As medidas de viscosidade do meio livre de célula foram realizadas no viscosímetro de Oswald (Cannon-Fenske), com o capilar nº 75 (Schott), em banho térmico Koehler KV 3000, sendo calculado a viscosidade cinemática pela equação (4.3). Para cada amostra analisada foram necessários 10 mL de sobrenadante livre de células, mantidas a 30ºC. As análises foram realizadas no Laboratório de Modelagem, Simulação e Controle de Processos, sob responsabilidade do Professor Márcio Nele.

$$V = K (t - v) \qquad (4.3)$$

onde:

V: viscosidade cinemática

K: constante de viscosidade

t: tempo de escoamento do meio

v: fator de correção

4.14. Métodos Analíticos

4.14.1. Quantificação do Crescimento Celular

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000 a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg p.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco, que é apresentada na Figura 4.6. A curva de peso seco *versus* absorvância é obtida usando-se uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) NaCl). Desta suspensão, retira-se uma amostra (10 mL), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 μm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas e então o valor de absorvância para cada concentração é obtida em espectrofotômetro a 570 nm.

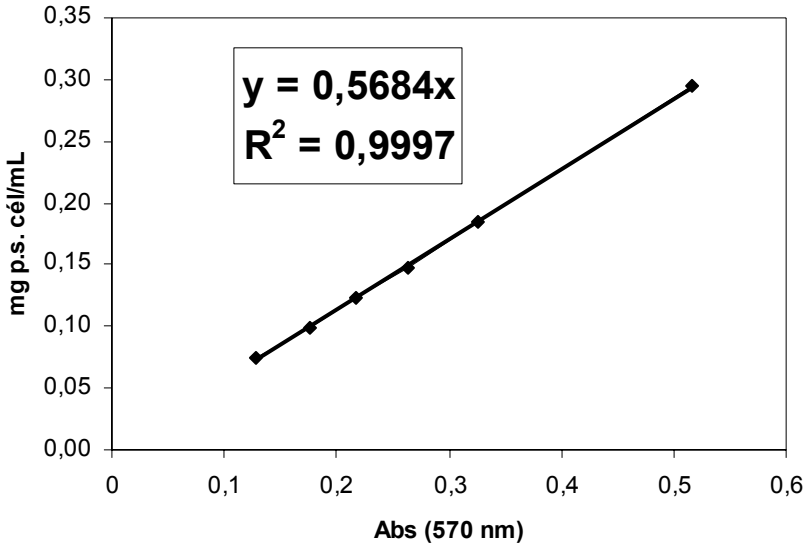


Figura 4.6. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000.

4.14.2. Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose presente do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase utilizando um *kit* enzimático para análise colorimétrica de glicose (*HUMAN GmbH - Germany*).

Nesse método, a absorvância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 500 nm, contra o branco de reação, que é composto apenas pelo Reagente Enzimático. Tomam-se alíquotas de 15 µL de amostra e completa-se com 1500 µL de Reagente Enzimático. Após a homogeneização, incuba-se por 10 min a 37°C, sendo a absorbância da amostra e do padrão mensuradas em no máximo 60 minutos.

O padrão de glicose pertencente ao *kit* enzimático possui uma concentração de 100 mg.dL^{-1} e o Reagente Enzimático contém: tampão fosfato (pH 7,5) 100 mmol.L^{-1}; 4-aminofenazona 0,25 mmol.L^{-1}; Fenol 0,75 mmol.L^{-1}; Glicose oxidase 15000 U.L^{-1}; Peroxidase 1500 U.L^{-1}; Mutarotase 2000 U.L^{-1}.

O cálculo de concentração de glicose é realizado através da Eq. (4.4):

$$C = 100 \times \left(\frac{Aa}{Ap} \right) \qquad (4.4)$$

onde:

Aa = Absorvância da amostra;

Ap = Absorvância do padrão;

C = concentração de glicose na amostra (mg.dL^{-1})

4.14.3. pH do meio de cultivo

O pH do meio de cultivo livre de células foi determinado utilizando-se um potenciômetro da marca Tecnal, modelo Tec-3MP, na temperatura ambiente (27°C).

4.14.4. Determinação da concentração de Açúcares Totais

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS), segundo MILLER (1959). A análise baseia-se na redução, em solução alcalina, do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

O procedimento experimental para a determinação dos açúcares redutores consistiu em diluir as amostras, até 40 vezes. Adicionar 1 mL de DNS a 1 mL da amostra devidamente diluída em um tubo de ensaio, após a homogeneização aqueceu-se por 10 minutos em Banho Maria (100°C). A seguir, resfriou-se as amostras e adicionou-se 10 mL de água destilada, homogeneizando. Fez-se então a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva padrão foi construída previamente utilizando soluções padrões de glicose e frutose entre 0,0 e 1,0 $g.L^{-1}$ (Figura 4.7).

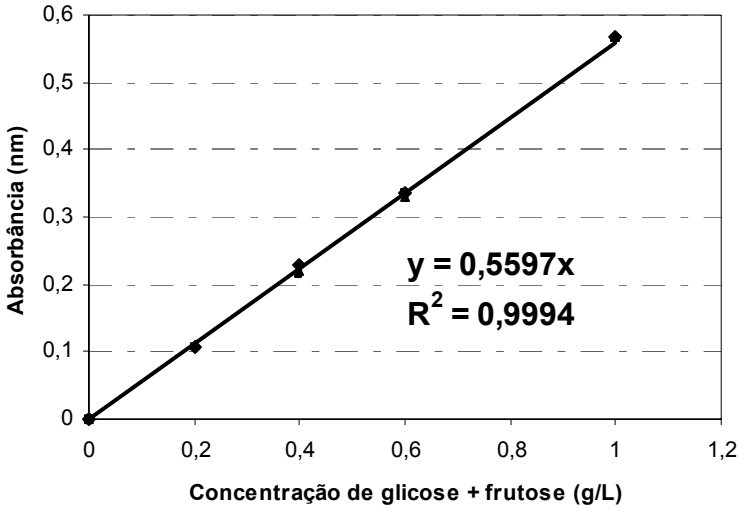


Figura 4.7. Curva padrão de DNS (glicose + frutose) para quantificação de açúcares redutores presentes no meio de cultivo.

4.14.5. Determinação da concentração de glicerol

O glicerol foi quantificado por método enzimático-colorimétrico para quantificação de triglicerídeos (Kit LABORLAB para triglicerídeos).

A amostra do meio de cultivo foi previamente centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos e diluída em até 30 vezes, com água destilada. A quantificação foi realizada a partir de 10 μL da amostra diluída e 500 μL do reativo de trabalho, o qual era composto de: reativo enzimático (lipase 5000 U/L; glicerol quinase 200 U/L; glicerol fosfato oxidase 1500 U/L; peroxidase 900 U/L; ATP 2 mmol/L; 3-5 HDCBS 2 mmol/L; 4-aminofenazona 1 mmol/L) e 30 mL de reativo de tampão (50 mmol/L tris, pH 7,6). Após homogeneização, procedeu-se a incubação em banho-maria a 37º por 10 minutos, seguidos de resfriamento e adição de 1 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm.

Um branco foi preparado nas condições já descritas, substituindo-se o volume de amostra por água. Paralelamente a quantificação da amostra foi preparada uma curva padrão com solução de glicerol nas concentrações de 0,0 a 1,0 $g.L^{-1}$(Figura 4.8).

Os resultados obtidos foram calculados com base na equação 4.4, descrita a seguir e expresso em g/L.

$$[Glicerol] = \frac{DO_{am}}{fc} \times fd \qquad (4.5)$$

onde:

DO_{am} = Densidade óptica da amostra

f_c = fator de correção

f_d = fator de diluição

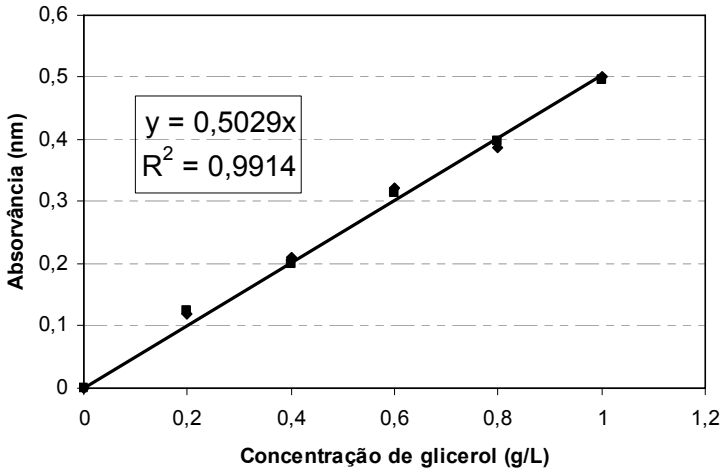


Figura 4.8. Curva padrão glicerol

4.14.6. Quantificação de carbono total

A quantificação de carbono total das amostras de glicerol bruto e tratado foram realizadas em um analisador Shimadzu (TOC-V CPH/CPN), que utiliza a técnica de oxidação catalítica à alta temperatura. A amostra é aspirada e injetada direto no catalisador, este por sua vez a 680ºC transforma todo o carbono da amostra em CO_2. O CO_2 é quantificado por infravermelho não dispersivo.

As análises foram realizadas pelo técnico Leandro dos Santos Miranda do Laboratório de Tecnologia Ambiental sob responsabilidade da Professora Magali Christe Cammarota (Escola de Química/UFRJ).

4.14.7. Quantificação de nitrogênio total

Para a determinação do nitrogênio total das amostras de glicerina bruta e tratada, as amostras foram digeridas com persulfato de potássio em meio alcalino, onde todas as formas de nitrogênio são oxidadas à nitrato, que foi determinado por redução em coluna de Cd-Cu seguido de diazotação (GRASSHOFF *et al*., 1999), tendo sido analisado por injeção em fluxo.

As análises foram realizadas pelo Professor Rodolfo Paranhos do Laboratório de Hidrobiologia do Departamento de Biologia Marinha/Instituto de Biologia da UFRJ.

.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Influência da aeração e velocidade de agitação

Dados na literatura indicam que o crescimento celular da *Y.lipolytica* e a produção de biossurfactante podem ser influenciados pela aeração e velocidade de agitação do sistema de cultivo (ALBUQUERQUE, 2006), como foi mencionado na revisão bibliográfica. Portanto, estudou-se o efeito da aeração e agitação no crescimento celular e na produção de surfactante pela *Y.lipolytica*, nas condições descritas no item 4.6 (Materiais e Métodos).

5.1.1. Os perfis de crescimento celular

Primeiramente podemos observar na Figura 5.1, a qual apresenta os perfis de crescimento celular para os experimentos realizados sob diferentes velocidades de agitação e aeração (Vm/Vf), que os experimentos realizados em uma menor agitação (160 rpm) e/ou maior razão Vm/Vf (0,5) apresentaram um perfil de crescimento semelhante. Entretanto o experimento conduzido a 250 rpm e Vm/Vf de 0,5 apresentou uma variação de biomassa (ΔX) maior, assim como um crescimento mais acelerado. Nos três experimentos (1,3,4) houve a formação de espuma após 24 horas de fermentação, sendo que as células se deslocaram do meio reacional para a espuma, o que explica o pouco crescimento celular de 24 hs pra 48 hs.

No experimento conduzido a 250 rpm e Vm/Vf de 0,3 obteve-se uma taxa de crescimento maior quando comparado com os demais experimentos, nas primeiras 24 h. Após este período houve a formação intensa de espuma e detectou-se o fenômeno de desaparecimento das células da fase aquosa, no qual uma grande parte das células aderiu à espuma. É possível constatar desta forma que a aeração e velocidade de agitação tiveram influência no crescimento da *Y.lipolytica*.

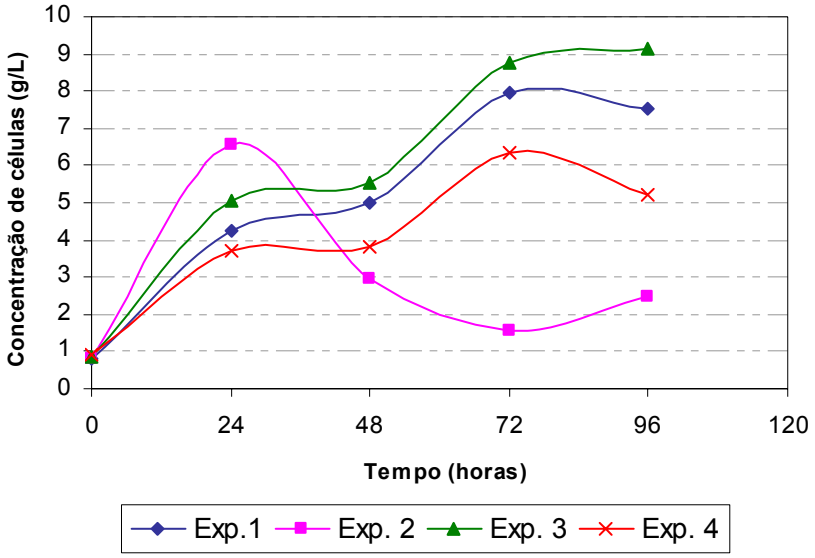


Figura 5.1. Perfil de crescimento de *Y.lipolytica* sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf): Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5)

5.1.2. A produção de biossurfactante

A produção de biossurfactante por *Y.lipolytica* foi influenciada pela razão Vm/Vf e velocidade de agitação. Os resultados mostram (Figura 5.2, 5.3 e 5.4) que com o aumento da velocidade de agitação de 160 rpm para 250 rpm, há uma tendência de aumento da produção de biossurfactante nos três métodos utilizados para a medida da atividade de biossurfactante. Esse resultado é semelhante ao encontrado por AMARAL (2007), YEH *et al* (2006), e SPENCER (1979), os quais mencionaram que a produção de biossurfactante aumentou com o aumento da velocidade de agitação. A maior velocidade de agitação promove uma melhor transferência de oxigênio, o que aumenta a taxa específica de crescimento celular de *Y. lipolytica* devido ao seu metabolismo estritamente aeróbio.

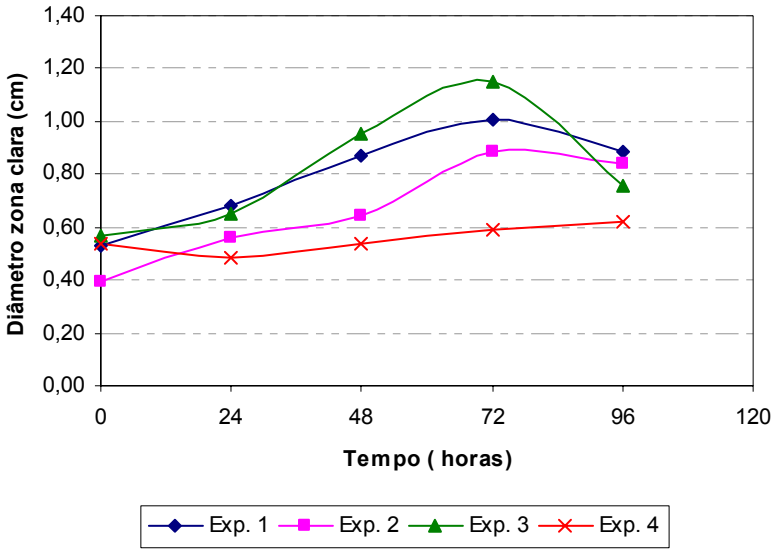


Figura 5.2. Diâmetro da zona clara do sobrenadante do cultivo de *Y.lipolytica* sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf) : Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5). Desvio padrão médio das análises é de 0,27 cm.

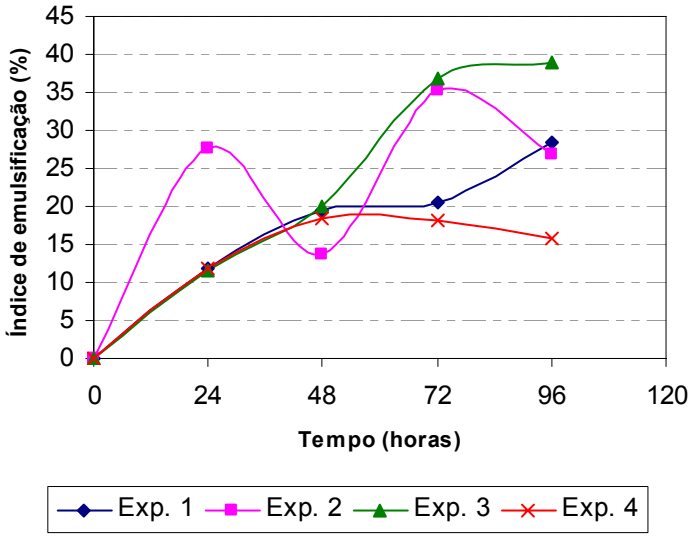


Figura 5.3. Índice de emulsificação do meio de cultivo livre de células sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf) : Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5). Desvio padrão médio das análises é de 0,63 %.

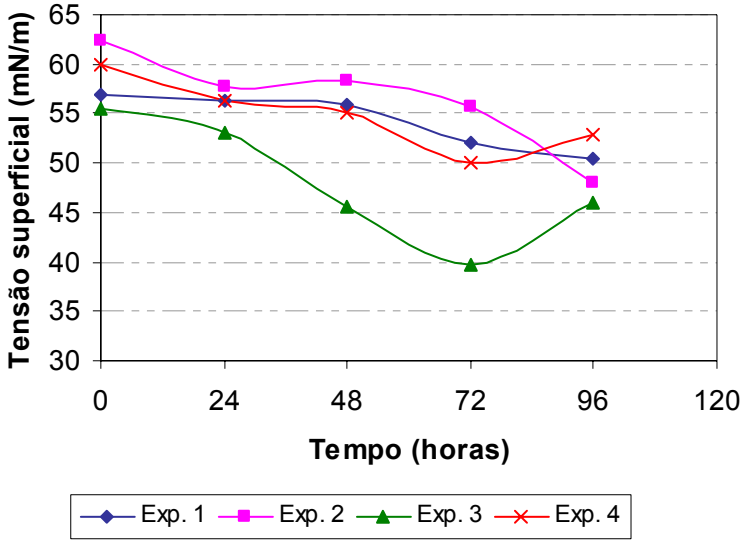


Figura 5.4. Variação da tensão superficial do meio de cultivo livre de células sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf) : Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5). Desvio padrão médio das análises é de 0,09 mN/m.

Os maiores valores de atividade emulsionante detectados para os cultivos agitados em maior velocidade podem estar ligados à função fisiológica dos emulsionantes microbianos. Tem sido sugerido que a produção de bioemulsionantes pode aumentar a solubilização de substratos insolúveis em água e, conseqüentemente, facilitar o transporte de nutrientes para os microrganismos. Portanto, um maior estresse cisalhante pode induzir maior excreção de biossurfactantes já que o tempo de contato das gotas da fase orgânica, dispersas em água, com os microrganismos se torna mais difícil (AMARAL, 2007).

Ao contrário acontece com alguns microrganismos: o aumento da velocidade de agitação diminui o rendimento da produção do biossurfactante devido ao efeito cisalhante causar estresse mecânico nas células (MOUSSA *et al*. 2006).

No caso de leveduras como *Y.lipolytica* um aumento na velocidade de agitação possivelmente favorece a liberação dos surfactantes preso à parede celular aumentando a quantidade de surfactante livres no meio reacional. DESAI e BANAT (1997), em sua revisão, mencionaram que no caso de leveduras a produção de biossurfactante geralmente aumenta com maiores velocidades de agitação e aeração, corroborando com os estudos realizados neste trabalho.

Verifica-se (Figura 5.2, 5.3 e 5.4) que, na maioria dos casos, os picos de produção foram detectados entre 48 e 96 h de cultivo, aproximadamente, ou seja, ainda na fase de desaceleração do crescimento celular.

A influência da razão Vm/Vf foi concomitantemente avaliado com a velocidade de agitação. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.2, 5.3, 5.4 para as três metodologias de análise empregadas, e mostram que um aumento na razão Vm/Vf de 0,3 para 0,5 promoveu aumento na produção de biossurfactante. Este resultado pode ser atribuído à formação intensa de espuma quando a razão Vm/Vf é menor (0,3) e a velocidade de agitação é de 250 rpm. A formação intensa de espuma diminui a eficiência do transporte de oxigênio no meio líquido e retira as células (como discutido no item 5.1) e o biossurfactante da fase aquosa, diminuindo o rendimento dos metabólitos, não sendo a formação de espuma desejável em bioprocessos.

Portanto o maior valor do índice de emulsificação (38,91%), da variação da tensão superficial (14,39 mN/m) e maior diâmetro da zona clara (1,15 cm), foram obtidos em uma agitação de 250 rpm e com uma razão Vm/Vf igual a 0,5.

Como mostra a Figura 5.5, a viscosidade do meio de cultivo nos 4 experimentos realizados não foi alterada com o tempo de fermentação. A viscosidade variou de 1,05 a 0,96 $mm^2.s^{-1}$, estando essa variação dentro do erro experimental, o que denota que a viscosidade não é um bom parâmetro a ser utilizado para detecção de biossurfactante produzido por *Y. lipolytica*.

O resultado pode ser atribuído ao tipo de estrutura molecular e concentração do bioemulsificante produzido por *Y.lipolytica* nas condições estudadas. Esses dois parâmetros são os que mais interferem na viscosidade do meio de cultivo, segundo reporta a literatura. A viscosidade do meio de fermentação de um bioemulsificante está diretamente relacionada com a rigidez de sua molécula que, por sua vez, depende da sua estrutura, principalmente primária e secundária, a qual está diretamente relacionada ao microorganismo utilizado e às condições operacionais do processo (BRADSHAW *et al*. 1983). A viscosidade é elevada com aumento da concentração do polímero. Este comportamento pode ser atribuído às interações intermoleculares e entrelaçamento, devido ao acréscimo efetivo nas dimensões da macromolécula e no peso molecular (GARCIA-OCHOA *et al*. 2000)

Muitos trabalhos mostram que há mudanças na viscosidade aparente do meio de cultivo na produção de bioemulsificantes, sendo este parâmetro

bastante utilizado para avaliar o índice de qualidade de biopolímeros (DIAZ *et al*. 2004). NITSCHKE e THOMAS (1995) selecionando novas linhagens de *Xanthomonas campestris* para produção de goma xantana, utilizaram como parâmetro a viscosidade do meio de cultivo, e observaram que a viscosidade do caldo de fermentação aumentou com o tempo de cultivo, mostrando que as propriedades reológicas são importantes parâmetros para seleção de novos microorganismos produtores de bioemulsificantes. Resultados similares foram encontrados por SCAMPARINI (1991) e GARCIA-CRUZ (2000).

De acordo com os resultados obtidos, a viscosidade do meio de cultivo não foi utilizada como parâmetro de inferência da atividade emulsificante nos próximos experimentos realizados neste trabalho.

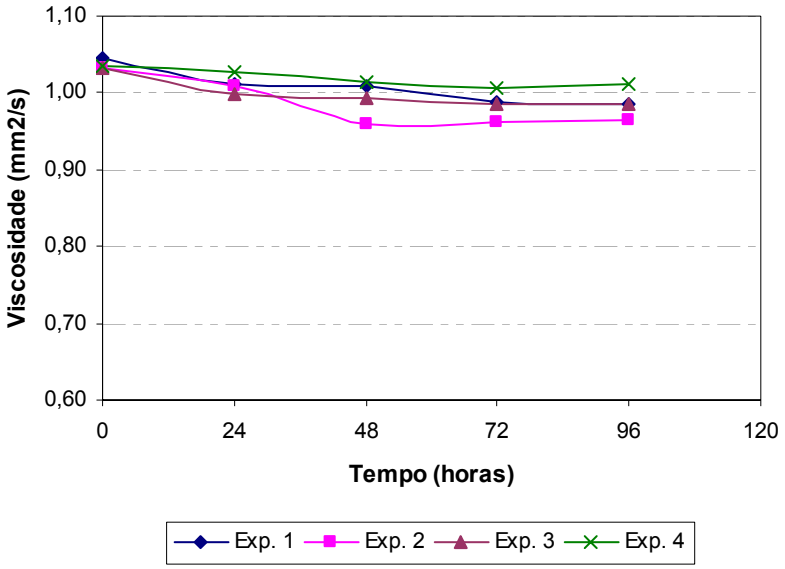


Figura 5.5. Variação da viscosidade do meio de cultivo livre de células em relação ao tempo de fermentação sob diferentes condições de agitação e aeração (Vm/Vf) : Exp.1 (160 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 2 (250 rpm e Vm/Vf 0,3); Exp. 3 (250 rpm e Vm/Vf 0,5): Exp. 4 (160 rpm e Vm/Vf 0,5). Desvio padrão médio das análises é de 0,09 mm^2/s.

5.2. Influência da fonte de nitrogênio

Depois de ter sido estudado o efeito da aeração e velocidade de agitação na produção de biossurfactante em meio de cultivo padronizado por AMARAL *et al* (2006) e de terem sido obtidas as condições que permitiram maior produção de biossurfactante (velocidade de agitação de 250 rpm e razão Vm/Vf de 0,5), procurou-se investigar a influência de várias fontes de nitrogênio, tais como sulfato de amônio, peptona, uréia e extrato de levedura, e as respectivas interações entre esses compostos por meio de planejamento fatorial completo 2^4, descrito no item 4.5.2.

Os resultados obtidos na realização do planejamento fatorial completo 2^4 são apresentados na Tabela 5.1, junto com as condições para cada um dos experimentos. Cabe lembrar que a produção de biossurfactante foi acompanhada diariamente (com amostragens de 24h) e a máxima variação do índice de emulsificação (IE), tensão superficial (ΔTS) e "oil spreading" (OS) foram os parâmetros utilizados como variável de resposta.

Os dados apresentados na Tabela 5.1 indicam que ΔTS, IE e OS variam de 4,01 a 22,04 mN/m, 1,05 a 60,45% e 0,08 a 0,56 cm, respectivamente, com diferentes níveis dos componentes do meio. É possível observar que as maiores produções de biossurfactante, aquelas acima de 40% de IE, valores acima de 15 mN/m para ΔTS e 0,32 cm no OS foram obtidas quando a maior concentração de sulfato de amônio (10g/L) foi utilizada (experimentos 5,6,7,8,13,14,15 e 16).

A magnitude dos efeitos estimados de cada variável é apresentada nos diagramas de Pareto (Figura 5.6), fornecendo o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possui sobre a concentração final de biossurfactante, e estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do grau de confiança estabelecido para a análise (95%).

Table 5.1. Planejamento experimental e respectivos resultados para a otimização da fonte de nitrogênio

Exp.	Peptona (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	Sulfato de amônio (g/L)	Uréia (g/L)	ΔST [a]	EI [b]	OS[c]
1	0	5	0	0	6,5	37,33	0,09
2	12,8	5	0	0	14,52	26,12	0,11
3	0	15	0	0	5,1	27,02	0,17
4	12,8	15	0	0	4,01	1,05	0,08
5	0	5	10	0	16,65	45,3	0,49
6	12,8	5	10	0	22,04	52,26	0,48
7	0	15	10	0	19,56	40,60	0,56
8	12,8	15	10	0	13,03	50,03	0,32
9	0	5	0	0,2	7,5	35,74	0,21
10	12,8	5	0	0,2	6,03	30,66	0,22
11	0	15	0	0,2	9,33	13,04	0,18
12	12,8	15	0	0,2	4,6	6,21	0,22
13	0	5	10	0,2	15,21	40,33	0,35
14	12,8	5	10	0,2	16,36	50,11	0,35
15	0	15	10	0,2	21,14	60,45	0,44
16	12,8	15	10	0,2	9,44	43,22	0,39
17	6,4	10	5	0,1	13,01	26,01	0,18
18	6,4	10	5	0,1	11,42	24,02	0,48
19	6,4	10	5	0,1	11,03	25,48	0,29

[a] Variação na tensão superficial (mN/m), [b] Índice de emulsificação (%) e [c] "oil spreading" (cm)

Com os resultados da análise estatística confirmou-se então que a variável com maior efeito sobre a produção de biossurfactante foi a concentração de sulfato de amônio, com um efeito de magnitude de 2,69 (IE) e 4,07 (ΔTS) vezes maior ao correspondente para a concentração de extrato de levedura, sendo ambas as fonte estatisticamente significativas para a ΔTS e o IE. Entretanto o efeito da concentração de sulfato de amônio é positivo, indicando que níveis maiores levariam à obtenção de concentrações de biossurfactante mais altas, enquanto a contração de extrato de levedura apresentou um efeito negativo, ou seja, uma diminuição da concentração deste levaria a um aumento da produção de biossurfactante. A peptona foi apenas estatisticamente significativa para o IE.

A uréia não influenciou estatisticamente a ΔTS e o IE, dentro das condições estudadas. Este resultado está de acordo com trabalhos descritos na literatura (Cooper e Paddock, 1984; Lukondeh et al, 2003). Zinjard e Pant (2002), ao estudarem a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de biossurfactante por *Y.lipolytica*, mostraram que sulfato de amônio

e cloreto de amônio foram as substâncias que propiciaram maior atividade de emulsificação enquanto que esta atividade foi reduzida à metade quando se utilizou uréia.

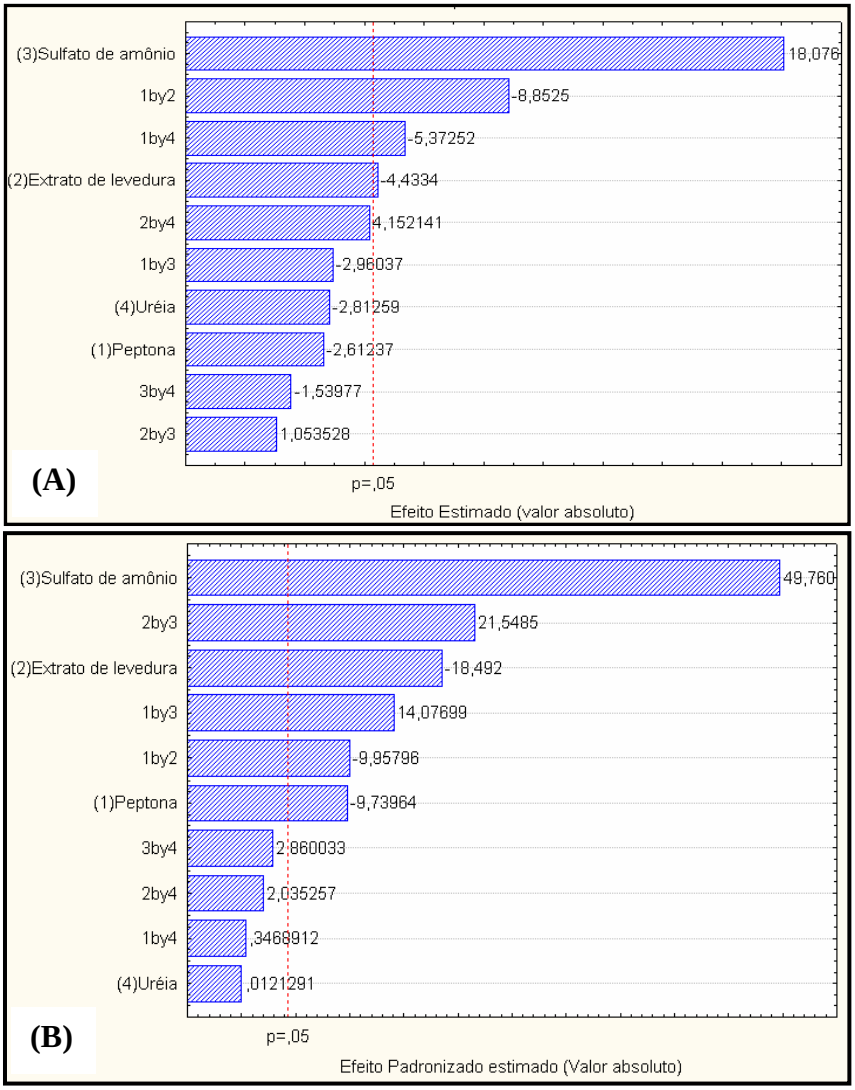


Figura 5.6. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial completo 2^4. Variável dependente: variação na tensão superficial (A) e índice de emulsificação (B).

Como podemos observar na Figura 5.7, nenhuma das variáveis dependentes utilizadas no planejamento foi estatisticamente significativa frente a variável de resposta "oil spreading". Este resultado pode ser atribuído à metodologia utilizada, pois como mostra a Tabela 5.1, houve uma variação significativa no valor do "oil spreading" para as condições do ponto central, onde se estuda a reprodutibilidade do experimento (Δ = 0,3). Como a medida "oil spreading" é qualitativa, indireta e de difícil medição, optou-se por não

utilizar este como parâmetro de avaliação da produção do biossurfactante nos experimentos seguintes.

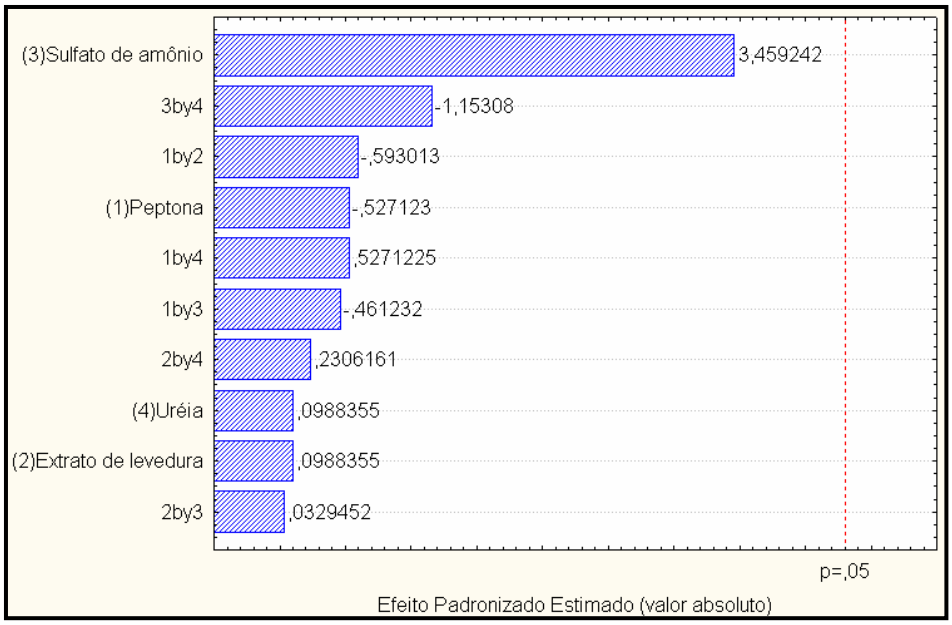


Figura 5.7. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial completo 2^4. A variável dependente é a metodologia "Oil spreading"

A Tabela 5.2 apresenta a análise de variância, no qual mostra que o modelo para ambas as variáveis de resposta são altamente significativos, como foi evidenciado pelo teste F. Desta forma pode-se gerar superfícies de resposta.

Tabela 5.2. ANOVA para ΔTS e IE

Fontes de variações	Soma de Quadrados		Graus de liberdade		Quadrado mèdio		F_{calc}	
	ΔTS	IE	ΔTS	IE	ΔTS	IE	ΔTS	IE
Regressão	499,266	3.836,48	4	6	124,816	639,41	25,40	117,10
Resíduos	68,784	65,52	14	12	4,913	5,46		
Falta de ajuste	66,782	60,396	12	10	5,565	6,03		
Erro puro	2,002	2,12	2	2	1,001	1,06		
Total	568,051	4.508,88	18	18				

ΔTS: $F_{0,05;\,4;\,14}$ = 3,11; Coeficiente de correlação: R^2 = 87%; p-valor < 0,005
IE: $F_{0,05;\,6,12}$ = 3,0 ; Coeficiente de correlação: R^2 = 86%; p-valor < 0,005

Os melhores valores de ΔTS e IE (21,14mN/m e 60,45%) foram obtidos em meio composto por 10g/L de sulfato de amônio e 5g/L de extrato de levedura.

Com o objetivo de interpretar com maior clareza o comportamento da produção de biossurfactante (IE e ΔTS) dentro das possíveis condições de processo, superfícies de resposta são apresentadas na Figura 5.8 e 5.9. As concentrações de peptona e uréia foram fixadas no nível mínimo.

Inicialmente na Figura 5.8, é apresentado o perfil da variação da tensão superficial em função das duas variáveis que possuem maior efeito no processo, as concentrações de sulfato de amônio e de extrato de levedura. Nesta Figura pode-se observar uma maior inclinação da superfície quando varia a concentração de sulfato de amônio, e como a interação entre as duas variáveis se faz mais importante quando são avaliadas condições elevadas da concentração de sulfato de amônio. Observa-se que a influência da concentração de extrato de levedura é menor, sendo a concentração de sulfato de amônio o fator mais representativo do processo.

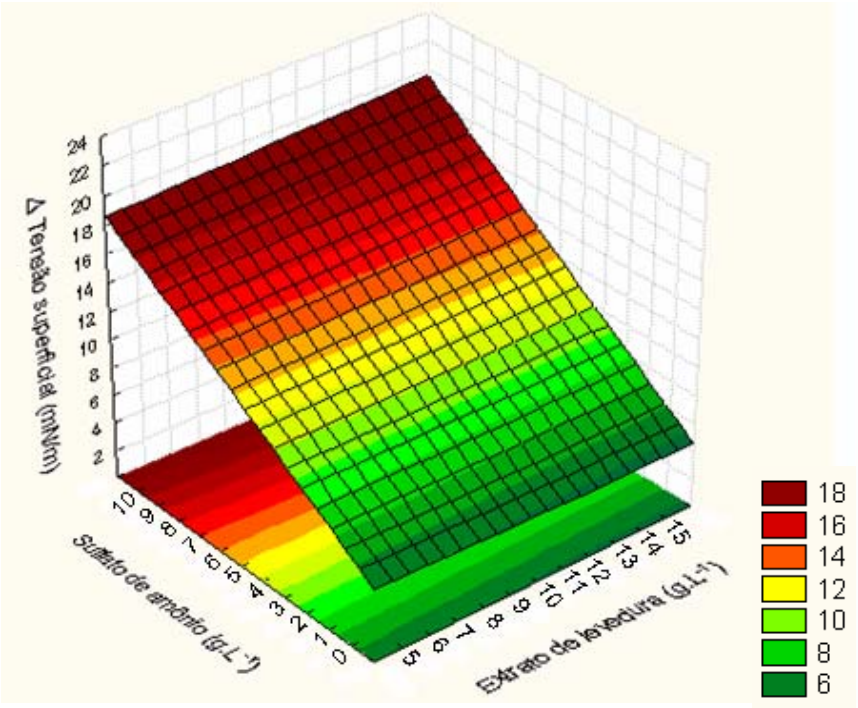


Figura 5.8 – Superfície de resposta da variação máxima da tensão superficial em relação à concentração de sulfato de amônio e de extrato de levedura.

Um comportamento análogo ao descrito anteriormente foi obtido quando representado o comportamento da variável de resposta índice de emulsificação em relação às concentrações de sulfato de amônio e de extrato de levedura (Figura 5.9).

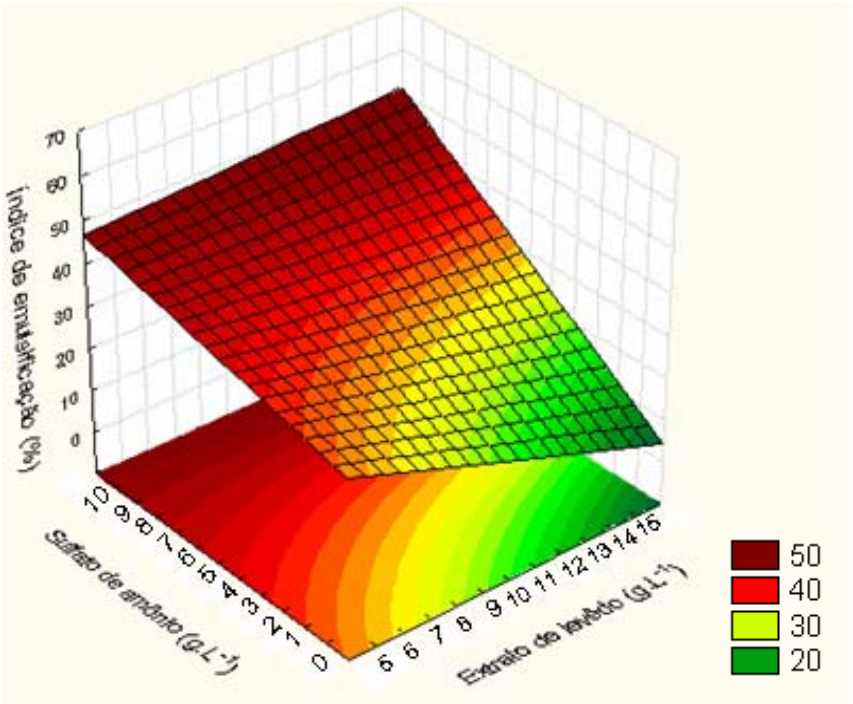


Figura 5.9 – Superfície de resposta do índice de emulsificação em relação à concentração de sulfato de amônio e de extrato de levedura.

Com o objetivo de investigar o efeito negativo da concentração de extrato de levedura na produção de biossurfactante, quatro experimentos foram realizados em diferentes concentrações de extrato de levedura (0,5; 1,0; 2,5 e 5 g/L). A concentração de sulfato de amônio foi mantida a 10g/L em todos os experimentos. Como se pode verificar na Figura 5.10, quando a concentração de extrato de levedura é baixa, a produção de biossurfactante é favorecida, mas diminui bastante quando não se adiciona extrato de levedura. Essa diminuição na produção de biossurfactante atribuído ao aumento da concentração de extrato de levedura pode ser devido ao fato de ocorrer desvio da fonte de carbono para o crescimento celular. Resultados similares foram encontrados por Casas e Garcia (1999). Os resultados mostraram que 0,5 g/L de extrato de levedura foi a melhor concentração, atingindo 20,9 mN/m de ΔTS e 73,18 % de IE.

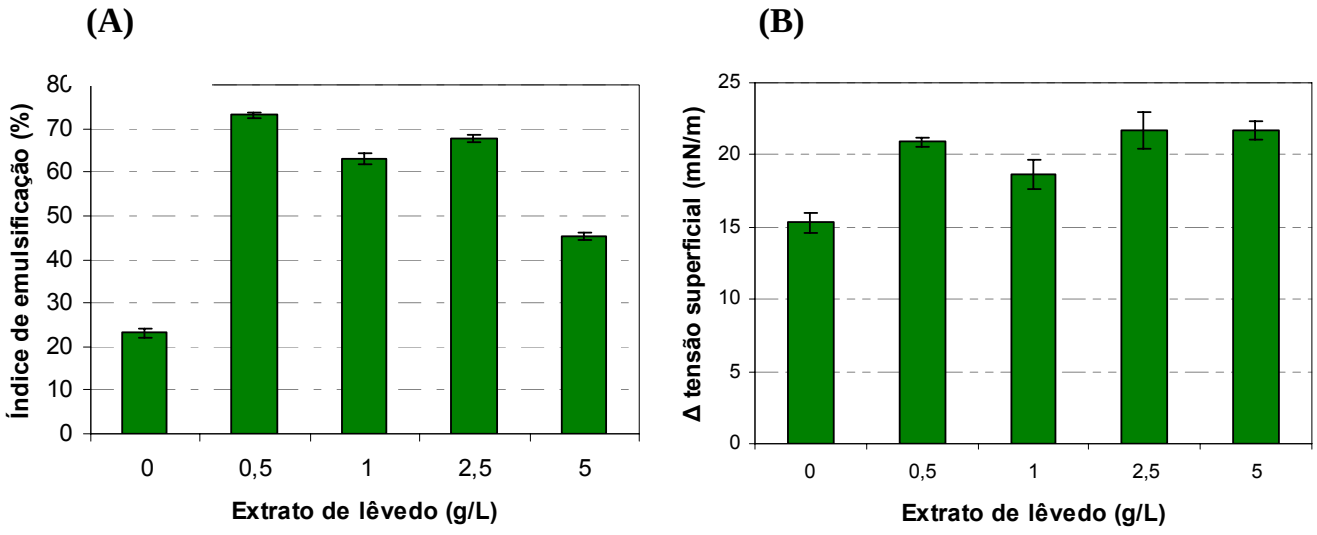


Figura 5.10. Resultado experimental da produção de biossurfactante em diferentes concentrações de extrato de levedura. Máxima variação do Índice de emulsificação (A) e tensão superficial (B).

Fazendo uma avaliação econômica das fontes de nitrogênio utilizadas, o resultado foi bastante satisfatório, uma vez que o reagente sulfato de amônio é um dos compostos mais baratos. A Tabela 5.3, apresenta os custos das matérias-primas utilizadas no estudo.

O extrato de lêvedo é o mais caro das substâncias avaliadas, porém a concentração otimizada foi de apenas 0,5 g/L, concentração inferior àquelas normalmente reportadas na literatura e 40 vezes menor do que a concentração de extrato de lêvedo utilizada por AMARAL (2007) para produção de biossurfactante por *Y.lipolytica*. Desta forma, os resultados do planejamento experimental possibilitaram a redução dos custos de produção.

Tabela 5.3. Custos das fontes de nitrogênio utilizadas no planejamento experimental.

Fonte de nitrogênio	Preço (R$)/kg[e]
Extrato de Lêvedo[a]	940,00
Peptona[b]	740,00
Sulfato de amônio[c]	50,00
Uréia[d]	56,00

[a] Extrato de lêvedo - *Oxoid* (Hampshire, UK). [b] Peptona - *Reagen* (R.J., Brasil).
[c] Sulfato de amônio - *Oxoid* (Hampshire, UK). [d] Uréia - *Oxoid* (Hampshire, UK).
[e] Preço em reais (R$) fornecido pela empresa *Termo-Rio Científica Ltda* (RJ, Brasil) no dia 21 de fevereiro 2008.

5.3. Influência da fonte de carbono

Como indica a literatura, a fonte de carbono tem um papel importante na produção de biossurfactantes, assim como em suas características finais. Após o estudo das condições de aeração, agitação e da obtenção das concentrações ótimas de nitrogênio (sulfato de amônio 10 g/L e extrato de levedo 0,5 g/L) estudou-se a influência da fonte de carbono.

A literatura apresenta uma ampla diversidade entre as fontes de carbono, como mostrado na revisão bibliográfica desta dissertação. Portanto, em busca de obter-se um extrato fermentativo rico em biossurfactante, foram realizados experimentos com substratos hidrofílicos e hidrofóbicos no presente trabalho. Estudou-se primeiramente por meio de um planejamento fatorial 2^4 completo, descrito no item 4.8 (Materiais e Métodos), o efeito da concentração de glicose, hexadecano, glicerol e óleo de oliva na produção de biossurfactante pela levedura *Y.lipolytica*. Posteriormente, um planejamento fatorial 2^2 foi realizado para avaliar os efeitos e as interações entre as concentrações de glicose e glicerol no meio de cultivo.

5.3.1. Planejamento fatorial completo 2^4 para otimização da fonte de carbono

A Tabela 5.4 mostra os resultados do planejamento fatorial completo 2^4, assim como os valores de concentração das fontes de carbono utilizadas em cada experimento.

Os valores das variáveis respostas IE e ΔST variaram de 6,94 a 82,97% e 2,01 a 27,89 mN/m, nas condições estudadas, para os 19 experimentos. É valido ressaltar que a diferença entre estes pontos de máximo e mínimo é bem maior do que a variação do valor do IE e ΔST para as condições do ponto central, onde se estuda a reprodutibilidade dos experimentos (Δ = 1,68), indicando que as variações observadas nos valores do IE e ΔST são decorrentes das formulações dos meios de cultivo estudados

Tabela 5.4. Matriz do planejamento fatorial com os valores reais e os resultados experimentais.

Exp.	Glicerol (% v/v)	Óleo de oliva (% v/v)	Hexadecano (% v/v)	Glicose (% p/v)	Δ TS (mN/m)	IE (%)
1	0	0	0	0	9,04	6,947
2	2	0	0	0	19,56	62,37
3	0	4	0	0	2,06	11,66
4	2	4	0	0	11,05	25,52
5	0	0	2	0	2,6	12,80
6	2	0	2	0	10,74	70,23
7	0	4	2	0	2,01	27,52
8	2	4	2	0	9,98	39,38
9	0	0	0	4	27,89	56,21
10	2	0	0	4	20,23	82,97
11	0	4	0	4	14,4	48,82
12	2	4	0	4	14,8	40,07
13	0	0	2	4	14,98	47,37
14	2	0	2	4	12,6	76,89
15	0	4	2	4	14,47	38,99
16	2	4	2	4	13,09	26,05
17	1	2	1	2	10,95	42,31
18	1	2	1	2	9,8	43,11
19	1	2	1	2	11,2	43,99

O maior índice de emulsificação (82,97 %) e ΔST (27,89 mN/m) foram encontrados nos ensaios 10 e 9, respectivamente, quando se realizou o experimento com maior concentração de glicose e sem a presença de óleo de oliva e hexadecano. Além disso, os ensaios que foram realizados utilizando maiores níveis da concentração de óleo de oliva e hexadecano, resultaram em um menor índice de emulsificação.

As Figuras 5.11 e 5.12 apresentam os diagramas de Pareto do planejamento experimental, calculados considerando diferentes tipos de interação entre as variáveis. Analisando-se o diagrama para o índice de emulsificação (Figura 5.11), observou-se que a variável concentração de glicerol foi a que apresentou um maior efeito significativo sobre a variável de resposta (α = 95%), seguido pela concentração de glicose, sendo que um aumento nas concentrações de glicerol e de glicose mostrou um efeito positivo. Por outro lado, um aumento nas concentrações de óleo de oliva e as interações glicose/glicerol, glicose/hexadecano e óleo de oliva/glicose apresentaram um efeito estatisticamente negativo sobre o IE. Além disso, o hexadecano e as

interações óleo de oliva/hexadecano, glicerol/óleo de oliva não influenciaram significativamente o valor do IE na faixa de concentração estudada.

Ao analisar o diagrama de Pareto para a máxima variação na tensão superficial (Figura 5.12), observou-se que a glicose foi a variável que apresentou maior efeito significativo, com uma magnitude de 2,7 vezes maior que aquela observada para a concentração de glicerol, ambas com um efeito positivo, similarmente ao observado no IE. No entanto, o hexadecano e o óleo de oliva apresentaram um efeito negativo sobre a variável de resposta ΔTS.

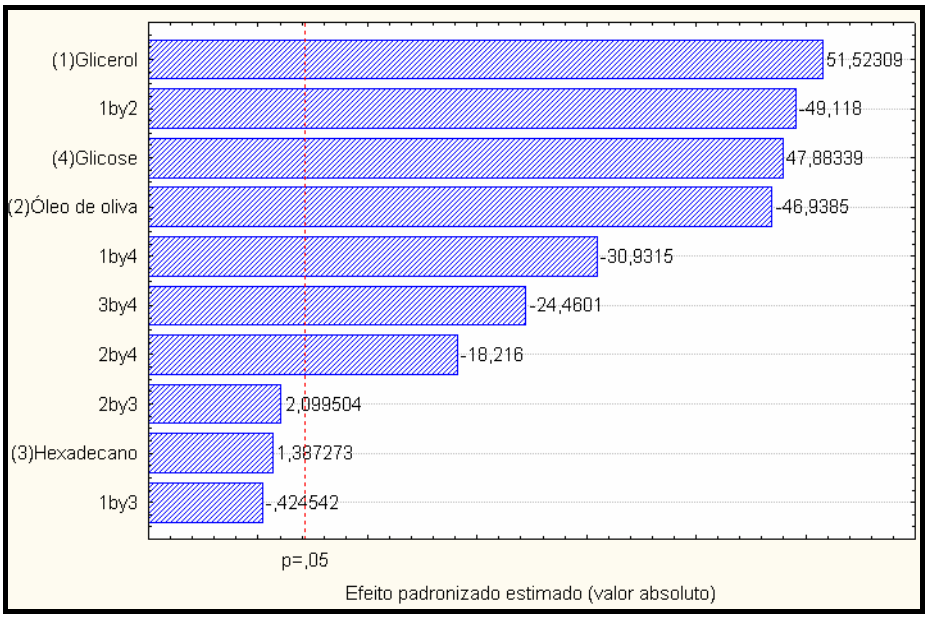


Figura 5.11. Diagrama de Pareto para o índice de emulsificação.

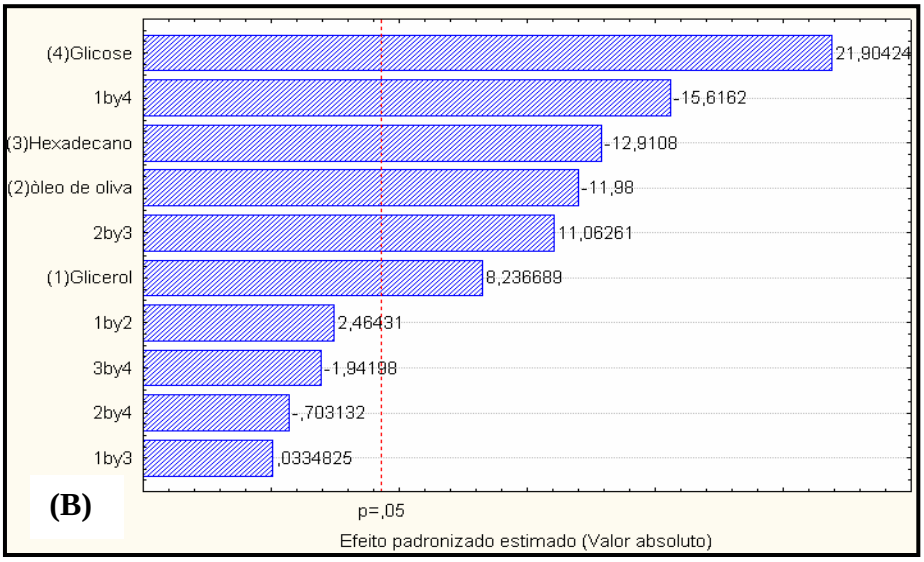


Figura 5.12. Diagrama de Pareto para variação na tensão superficial.

Vários trabalhos na literatura reportam o efeito positivo da glicose e glicerol, assim como demais fontes de carbono hidrofílicas na produção de biossurfactantes por microorganismos (CAMERON *et al*.1988; MORITA *et al*. 2007; LUKONDEH *et al*. 2003, CIAPINA *et al* 2007.) Em 2001, Sarubbo *et al*. produziram biossurfactante utilizando glicose como fonte de carbono a partir da levedura *C. lipolytica* IA 1055, o qual apresentou uma alta atividade de emulsificação. Estes autores mostraram que não é necessária presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de surfactante, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

Os resultados mostraram que quando *Y.lipolytica* foi cultivada com substratos hidrofóbicos (hexadecano e óleo de oliva) como fonte de carbono, a produção de biossurfactante não foi favorecida. Este resultado pode ser atribuído a associação do surfactante produzido à parede celular da levedura. De acordo com LANG e PHILP (1998) apenas uma pequena porção do surfactante produzido é liberado quando substratos hidrofóbicos são utilizados como fonte de carbono para produção de biossurfactante por microorganismos.

Um fenômeno observado durante os experimentos com óleo de oliva e hexadecano foi que células da levedura *Y.lipolytica* migraram em grande quantidade para a fase oleosa, resultando em um baixo crescimento celular na fase aquosa. De fato, depois da inoculação dos sistemas, e minutos após a agitação em *shaker*, a fase aquosa, de onde foram feitas todas as análises, ficou límpida, sem a presença de células.

Trabalhos na literatura mostram a afinidade de leveduras à substratos hidrofóbicos. AMARAL (2007) estudando a superfície celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizada neste trabalho, mostrou que a superfície das células é caracterizada como hidrofílica, apresentando, no entanto, alta afinidade com superfícies, líquidos ou moléculas hidrofóbicas quando imersas em água. Observou-se também que as interações entre as células e as superfícies ou compostos hidrofóbicos é mediado por proteínas ou glicoproteínas da parede celular. Além disso, as interações observadas entre as células e solventes apolares estão ligadas a interações apolares ou do tipo *Lifshitz-van der Waals*.

AGUEDO *et al.* (2004) fizeram observações em microscópio mostrando a adesão de gotas de metil ricionelato (substrato hidrofóbico) na superfície das células de *Y. lipolytica*. A área de contato entre o microrganismo e o substrato inclui tanto as grandes gotas de substrato, onde o microrganismo se adere, como as pequenas gotas que são adsorvidas na superfície celular (GUTIERREZ e ERICKSON, 1977).

Fisiologicamente, a produção de biossurfactantes é associada com o mecanismo de assimilação de substratos hidrofóbicos. Esse mecanismo pode ocorrer através do contato direto da superfície celular com grandes gotas de óleo, com pouca ou nenhuma emulsão, ou através do contato com uma pequena gota de óleo, culminando em emulsificação. No primeiro caso, o biossurfactante é retido na parede celular, facilitando o ataque e subseqüente transporte dos compostos hidrofóbicos para o interior da célula. No segundo caso, o biossurfactante livre, liberado no meio de cultivo, formará um complexo surfactante-hidrocarboneto que pseudo-solubiliza o substrato, aumentando a disponibilidade destes para a célula.

A adesão do surfactante na superfície celular não é interessante, uma vez que diminui a concentração deste na solução aquosa, diminuindo a produção. Existem metodologias na literatura que descrevem a recuperação dos surfactantes aderidos à parede celular, porém encarece ainda mais o processo de produção, não os tornando economicamente viáveis.

Os resultados mostraram que o glicerol e a glicose foram as melhores fontes de carbono para a produção do biossurfactante permitindo a liberação deste para o meio reacional, atingindo um IE de 82,97% e ΔTS de 27,52 mN/m.

Na análise de variância (Tabela 5.4) nota-se que o modelo estatístico apresentou um ajuste adequado aos resultados experimentais, para IE e ΔTS, podendo dessa forma representar as superfícies de resposta.

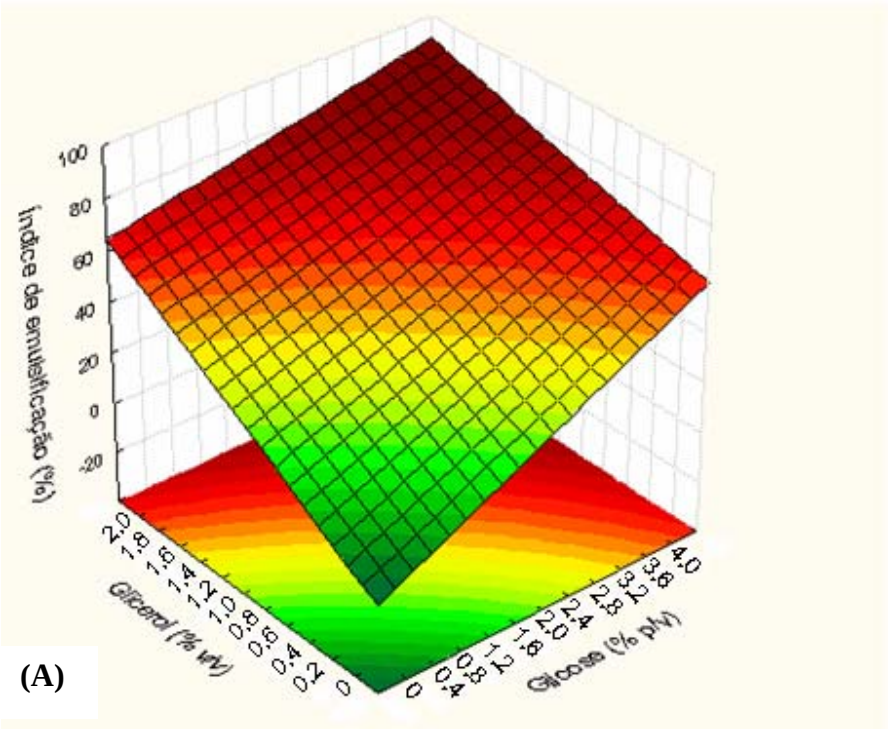
Tabela 5.4. ANOVA para ΔTS e IE

Fontes de variações	Soma de Quadrados		Graus de liberdade		Quadrado mèdio		F_{calc}	
	ΔTS	IE	ΔTS	IE	ΔTS	IE	ΔTS	IE
Regressão	682,43	8.085,31	6	7	113,73	1.155,04	40,95	208,49
Resíduos	33,32	60,94	12	11	2,77	5,54,		
Falta de ajuste	32,21	59,53	10	9	3,22	9,36		
Erro puro	1,11	1,41	2	2	0,55	0,70		
Total	715,75	8.146,26	18	18				

ΔTS: $F_{0,05;\ 6;\ 12}$ = 3,00; Coeficiente de correlação: R^2 = 95,34%; p-valor < 0,005
IE: $F_{0,05;\ 10,2}$ = 3,01 ; Coeficiente de correlação: R^2 = 99,25%; p-valor < 0,005

Com o objetivo de analisar a influência da concentração de glicose *versus* a de glicerol na produção do biossurfactante, as Figuras 5.13A e 5.13B

apresentam as superfícies de resposta. Fixou-se a concentração de óleo de oliva e de hexadecano no nível mínimo estudado.



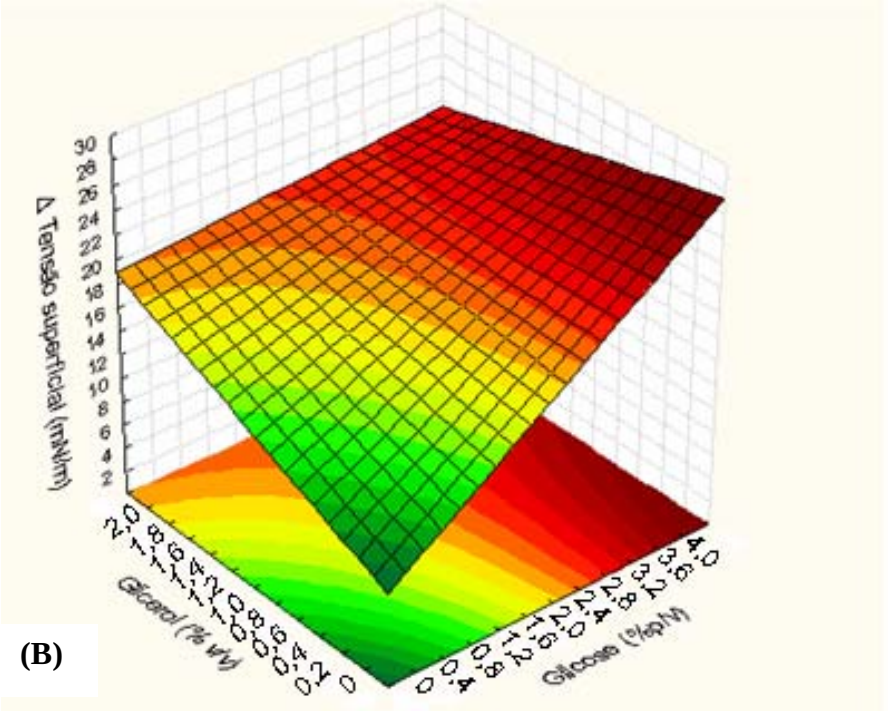


Figura 5.13 – Superfície de resposta das variáveis dependentes índice de emulsificação (A) e variação da tensão superficial (B) em relação à concentração de glicerol e de glicose.

Observa-se na superfície de resposta, Figura 5.13A, que com o aumento na concentração de glicerol e glicose obtiveram-se valores máximos do IE. Porém, ao analisar a superfície de resposta apresentada na Figura 5.13B, observou-se que valores abaixo daqueles empregados no ponto central para a concentração de glicerol favorecem o aumento na produção de biossurfactante, enquanto o efeito observado em relação à concentração de glicose foi similar ao mostrado para o IE. As superfícies não apresentaram um máximo absoluto, portanto, um estudo mais detalhado da influência da concentração de glicose e glicerol foi realizado através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2.

5.3.2. Delineamento composto central rotacional 2^2

Um planejamento experimental completo DCCR 2^2 foi realizado para analisar as interações entre o glicerol e a glicose e também avaliar a razão carbono/nitrogênio (C/N). A concentração de nitrogênio utilizada em todos os ensaios foi fixada em 10g/L de sulfato de amônio e 0,5 g/L de extrato de levedura.

A faixa estudada das concentrações de glicose e glicerol é apresentada na Tabela 5.5. Os níveis foram escolhidos de acordo com os resultados do planejamento fatorial completo 2^4, descrito no item 5.3.1. Os valores do ponto central (2% de glicerol e 4% de glicose) foram escolhidos de acordo com o experimento n° 10 do planejamento fatorial 2^4, onde se observou um IE de 82 % e uma ΔTS de 20,23 mN/m.

Tabela 5.5. Faixa de valores estudados no DCCR 2^2

	Nível ($g.L^{-1}$)				
Variáveis independentes.	**-1,41**	**-1**	**0**	**1**	**+1,41**
Glicerol	0,59	1	2	3	3,41
Glicose	1,17	2	4	6	6,83

Os resultados do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 5.6 assim como os valores da razão C/N utilizada em cada experimento. Os maiores valores de IE e ΔTS foram encontrados nas

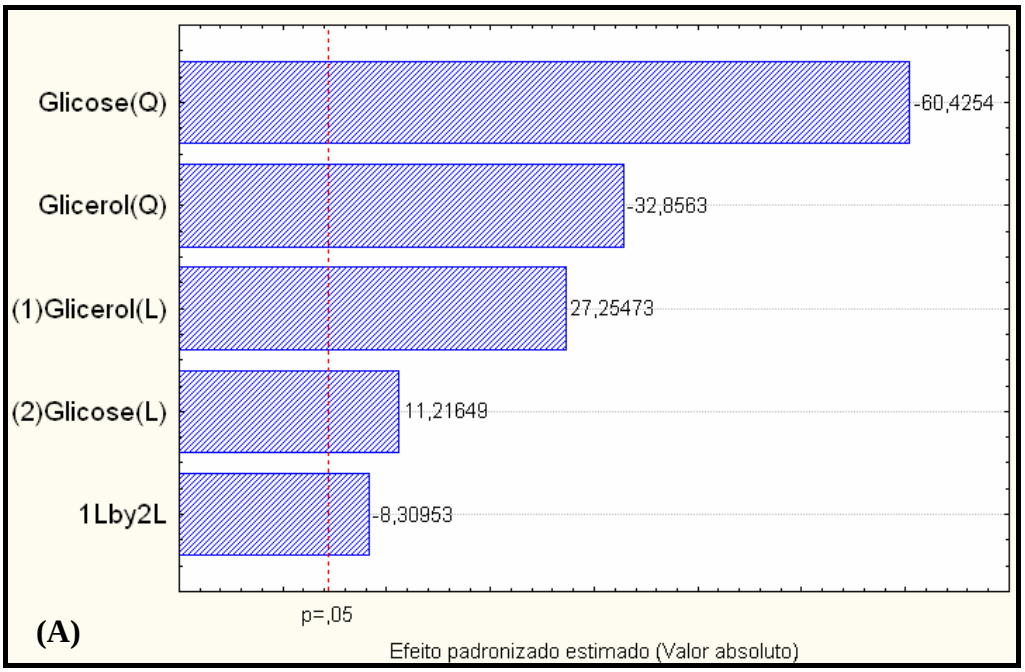
condições do ponto central (experimentos nº 9, 10 e 11). A média dos valores do IE e da ΔTS encontrados no ponto central foram 81,13% e 19,55 mN/m, respectivamente, sendo 2,13 e 2,03 vezes maiores do que àqueles inicialmente obtidos no processo de produção de biossurfactante, que apresentaram valores de IE de 38,16% e 9,63 mN/m de ΔTS.

Tabela 5.6. Matriz do planejamento experimental DCCR 2^2, com os valores codificados e reais em parêntese e os resultados experimentais.

Nº Exper.	Glicerol (% v/v)	Glicose (% p/v)	Razão C/N	Índice de emulsificação (%)	Δ tensão superficial (mN/m)
1	-1 (1)	-1(2)	5,95	51,42	11,84
2	+1 (3)	-1(2)	10,49	66,20	13,66
3	-1 (1)	+1 (6)	13,32	60,87	12,99
4	+1 (3)	+1 (6)	17,86	67,32	16,03
5	-1,41 (0,59)	0 (4)	8,71	54,11	12,10
6	+1,41 (3,41)	0 (4)	15,11	57,88	15,00
7	0 (2)	-1,41 (1,17)	6,69	61,47	12,47
8	0 (2)	+1,41 (6,83)	17,12	73,78	16,22
9	0 (2)	0 (4)	11,91	81,87	19,51
10	0 (2)	0 (4)	11,91	81,14	19,04
11	0 (2)	0 (4)	11,91	80,91	20,11

O efeito da razão C/N também foi avaliado. Como indica na Tabela 5.6, a razão C/N onde ocorreu a maior produção de biossurfactante foi de 11,91, encontrados no ponto central. Quando a razão de C/N foi abaixo ou acima deste valor a produção de biossurfactante não foi favorecida.

Os diagramas de Pareto (Figura 5.14) mostram que os fatores correspondentes ao efeito quadrático da concentração de glicerol e glicose para ambas as variáveis de resposta apresentaram maior efeito sobre a produção de bissurfactante. Porém este efeito é negativo, ou seja, excessos nas concentrações de glicose e glicerol levam a uma diminuição da produção de biossurfactante. Por outro lado, os fatores correspondentes ao efeito linear apresentaram um efeito positivo.



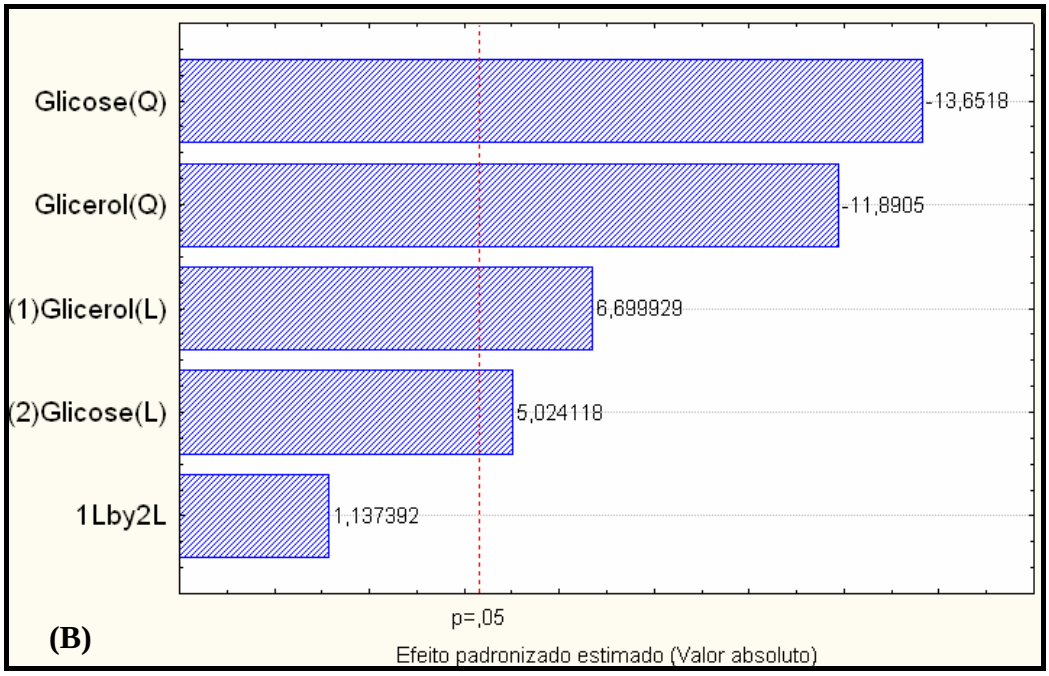


Figura 5.14. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento experimental DCCR 2^2. Variável dependente: índice de emulsificação (A) e variação máxima da tensão superficial (B). (L) linear e (Q) quadrático.

Para verificação de um modelo quadrático para a produção de biossurfactante por *Y.lipolytica*, considerando as concentrações de glicose e glicerol, foram calculados os coeficientes de regressão e realizada a análise de variância.

Tabela 5.7. ANOVA para ΔTS e IE

Fontes de variações	Soma de Quadrados		Graus de liberdade		Quadrado mèdio		F_{calc}	
	ΔTS	IE	ΔTS	IE	ΔTS	IE	ΔTS	IE
Regressão	93,30	1.215,46	3	4	31,10	303,86	179,76	303,25
Resíduos	1,21	6,013	7	6	0,17	1,00		
Falta de ajuste	0,64	5,51	4	3	0,16	1,83		
Erro puro	0,57	0,50	2	2	0,28	0,25		
Total	94,52	1.221,47	10	10				

ΔTS: $F_{0,05;\,3;\,4}$ = 6,59; Coeficiente de correlação: R^2 = 98,71%; p-valor < 0,005

IE: $F_{0,05;\,4,6}$ = 4,53 ; Coeficiente de correlação: R^2 = 99,50%; p-valor < 0,005

Pelos resultados mostrados na Tabela 5.7, observa-se que o valor do teste f calculado foi cerca de 27 (ΔTS) e 67 (IE) vezes maior do que o valor tabelado, indicando que o modelo de 2ª ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo para a variável estudada. Dessa forma, o índice de emulsificação e a variação máxima da tensão superficial podem ser preditos em função da concentração de glicose e glicerol através das equações 5.3 e 5.4.

$$IE = 81{,}30 + 4{,}82\, x_1 - 6{,}93\, x_1^2 + 1{,}98\, x_2 - 12{,}74\, x_2^2 - 2{,}08\, x_1 * x_2 \qquad (5.3)$$

$$\Delta TS = 19{,}55 + 1{,}27\, x_1 - 2{,}68\, x_1^2 + 0{,}95\, x_2 - 3{,}08\, x_2^2 \qquad (5.4)$$

onde:

x_1: Glicerol

x_2 : Glicose

A variação explicada (R^2) pelo modelo foi muito boa, cerca de 98% para ΔTS e 99% para IE, o que mostra que os modelos obtidos são adequados para explicar o processo estudado. A partir do valor da máxima variação explicável, que foi de 99,39% ΔTS e 99,95% para IE, pode-se notar que o erro puro do processo foi bem pequeno, em torno de 0,6% e 0,05%, respectivamente.

A partir do modelo obtido foi então possível obter as curvas de contorno para analisar as melhores condições da concentração de glicose e glicerol, que

levam aos maiores valores de produção do biossurfactante. As curvas de contorno obtidas estão apresentadas nas Figuras 5.15 e 5.16. É possível verificar que tanto para a concentração de glicose quanto para a de glicerol, uma faixa restrita localizada no ponto central proporcionou um incremento na produção de biossurfactante. Observa-se que foi alcançada uma condição ótima para a produção de biossurfactante com concentração de glicerol a 2% e glicose a 4%, atingindo um índice de emulsificação de 81% e uma variação máxima na tensão superficial de 19,55 mN/m.

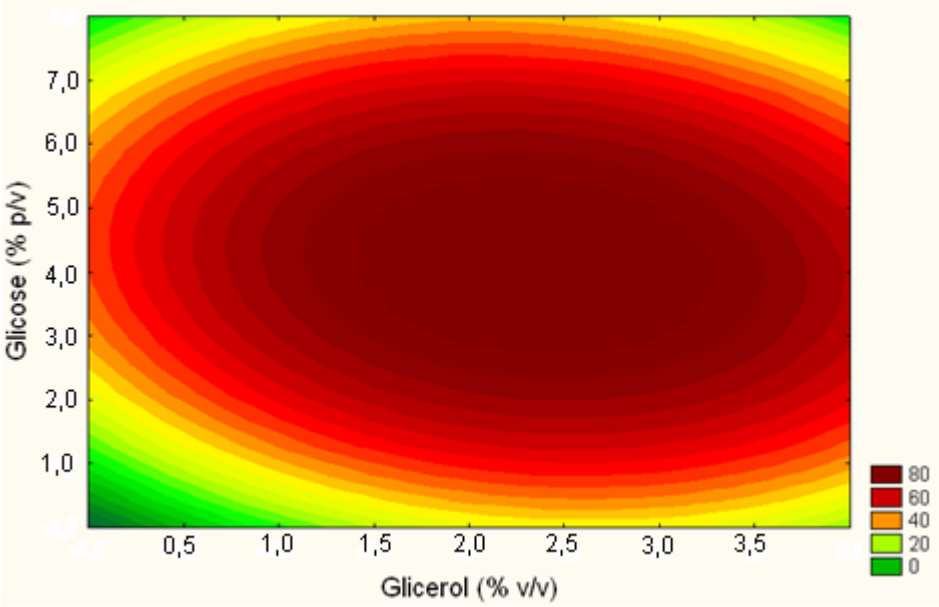


Figura 5.15. Curvas de contorno do índice de emulsificação em relação às concentrações de glicerol e de glicose.

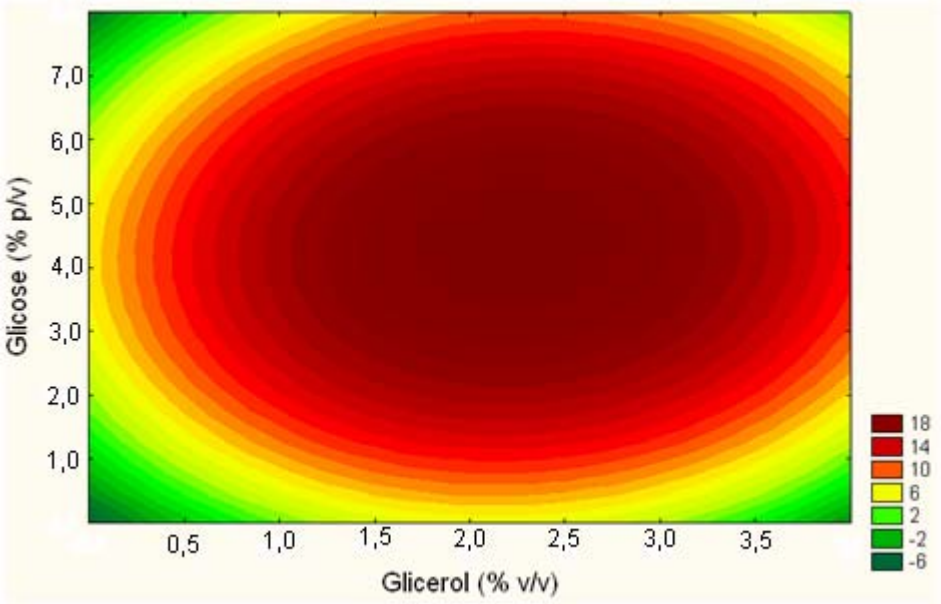


Figura 5.16. Curvas de contorno da variação da tensão superficial em relação às concentrações de glicerol e de glicose.

Com intuito de avaliar o crescimento de *Y.lipolytica*, o consumo de substrato, e a produção de biossurfactante durante o período da fermentação obtidos nas condições do ponto central do planejamento experimental DCCR 2^2, as Figuras 5.17 e 5.18 apresentam, as cinéticas de fermentação, baseadas em experimentos conduzidos em triplicata.

A Figura 5.17 apresenta a cinética de crescimento e a evolução do consumo de glicerol e de glicose por *Y. lipolytica*. Como mostra a figura, verifica-se que a levedura consumiu preferencialmente a glicose presente no meio e posteriormente o glicerol, apresentando desta forma um crescimento diauxico, no qual se observa um pequeno período lag, entre 48 e 72 h, período no qual possivelmente a levedura sintetiza as enzimas responsáveis pela degradação do glicerol. A glicose foi praticamente consumida com 48 h de fermentação, sendo após este período o glicerol consumido até sua completa exaustão em 96 h de fermentação. Crescimento diauxico é um tipo de crescimento microbiano observado quando se utilizam duas fontes de carbono no meio de cultivo. Os nutrientes mais comumente utilizados pela célula, como por exemplo a glicose, são preferencialmente consumidos, uma vez que a célula não precisa gastar energia para sintetizar enzimas responsáveis pelo catabolismo de tais nutrientes. Após a exaustão da fonte de carbono mais facilmente assimilável, a levedura cessa o crescimento momentaneamente, pois dirige seu metabolismo para a produção de enzimas que possibilitem o consumo da próxima fonte de carbono.

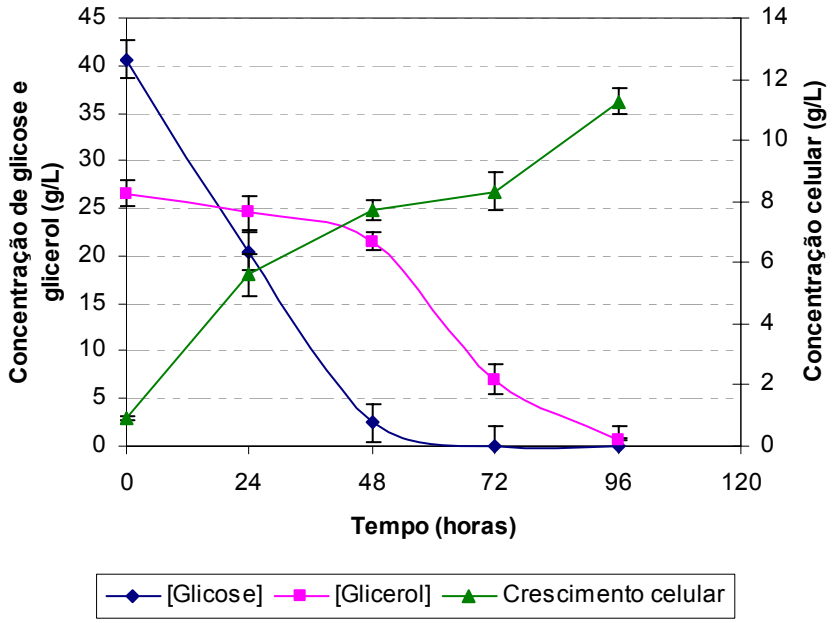


Figura 5.17. Perfil de crescimento e consumo de substrato pela *Y.lipolytica* , nas condições realizadas no ponto central do planejamento DCCR 2^2

A Figura 5.18 apresenta a evolução do índice de emulsificação e da tensão superficial durante a fermentação. Pode-se observar que o maior valor de IE (81%) e ΔTS (20 mN/m) foram encontrados em 72 horas de fermentação. Apesar da maior produção ocorrer em 72 h de fermentação, uma produção de IE (58%) significativa foi observada durante o crescimento exponencial da levedura, com 24 h de fermentação, i.e. crescendo com glicose.

A maioria dos biossurfactantes reportados na literatura é, geralmente, produzida quando as culturas alcançam o estágio estacionário de crescimento. Porém algumas espécies podem apresentar produção durante a fase exponencial de crescimento. Vários biossurfactantes, tais como: produzidos pela levedura *C. lipolytica* IA 1055 (SARUBBO *et al*., 2001) e biotensoativos de *Candida tropicalis* IIP-4, glicolipídeos de *Nocardia* sp. SFC-D e biossufactantes insolúveis em água de *Torulopsis apicola*, são produzidos principalmente na fase estacionária de crescimento, sendo considerados metabólitos secundários. Outros, como alguns ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* sp., glicoproteínas de *P. fluorescens* 378, agentes com atividade superficial de *B. cereus* IAF 346 e biodispersan de *Bacillus* sp. IAF-343 são considerados associados ao crescimento, desta forma um metabólito primário (DESAI e BANAT, 1987).

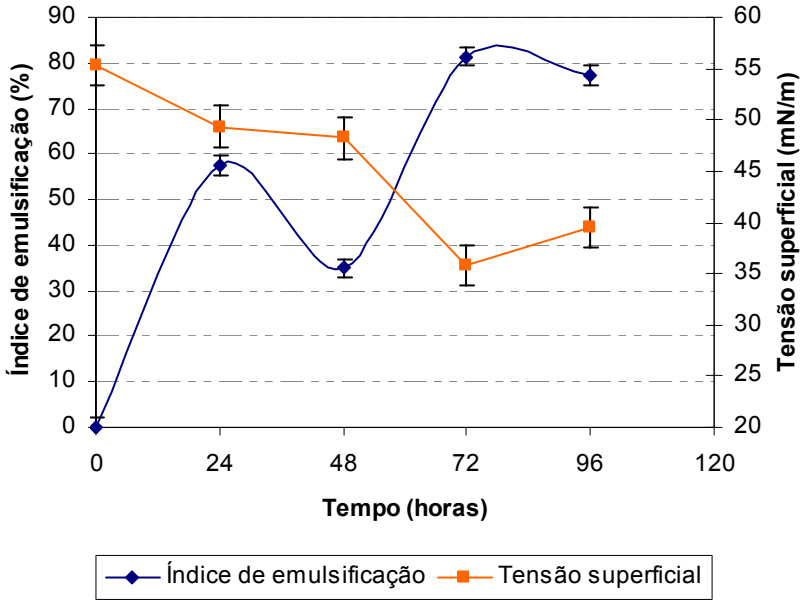


Figura 5.18. Evolução da tensão superficial (■) e do índice de emulsificação (♦) durante a fermentação nas condições do ponto central do DCCR 2^2, baseado em triplicata.

Um fenômeno observado foi a presença de um “vale”, ou seja, uma diminuição do IE de emulsificação em 48 h de fermentação. O valor da tensão superficial neste período permaneceu constante Este comportamento pode ser atribuído à presença de proteases produzidas pela levedura, que segundo GRANGEMARD *et al*. (1999) atuariam sobre a porção peptídica do surfactante, gerando um lipopeptídeo de cadeia aberta, diminuindo desta forma a eficiência destes. Uma outra possibilidade é que a levedura durante este período utilize o biossurfactante formado como fonte de carbono. AMARAL (2007) também observou este fenômeno ao estudar pela primeira vez a produção do Yansan por *Y.lipolytica*, mesma linhagem utilizada neste trabalho.

5.4. Influência do pH inicial na produção de biossurfactante e crescimento celular

Como mostra a literatura, o pH é um importante parâmetro a ser estudado, pois afeta a produção e a qualidade dos surfactantes produzidos por microorganismos. Segundo KOSARIC *et al.* (1987), o pH é um fator de grande importância na síntese de biossurfactantes, podendo este variar grandemente devido às necessidades de cada microorganismo: a modificação de pH do meio para níveis que facilitem a atividade de emulsificação são estratégias utilizadas pelos microorganismos para aumentar a produção dos biossurfactantes.

Para avaliar a influência do pH inicial na produção do biossurfactante por *Y.lipolytica*, o meio de cultivo otimizado (2% de glicerol, 4% de glicose, 10g/L de sulfato de amônio e 0,5 g/L de extrato de levedura) foi utilizado, variando-se o pH inicial de 5,0; 6,2; 7,0; 8,0 e 9, 0, sendo 6,2 o pH natural do meio, i.e. sem ajuste.

A Figura 5.19 apresenta a evolução do pH durante a fermentação. Pode-se observar que em todos os sistemas, em 24 horas de fermentação o pH atingiu valores muitos ácidos (em torno de 2,5), mantendo-se constante após este período, apenas o meio de pH inicial 9,0 apresentou pH 4,0 em 24 horas de fermentação. Essa brusca diminuição no pH pode ter ocorrido devido à liberação de produtos do metabolismo da levedura, como os ácidos orgânicos (FICKERS *et al*., 2005) e também devido à fonte de nitrogênio utilizada, o sulfato de amônio. ROCHA (2007) observou que ao utilizar sulfato de amônio para a produção de biossurfactante o pH diminui para valores ácidos quando se comparado com meio utilizando como fonte de nitrogênio $NaNO_3$.

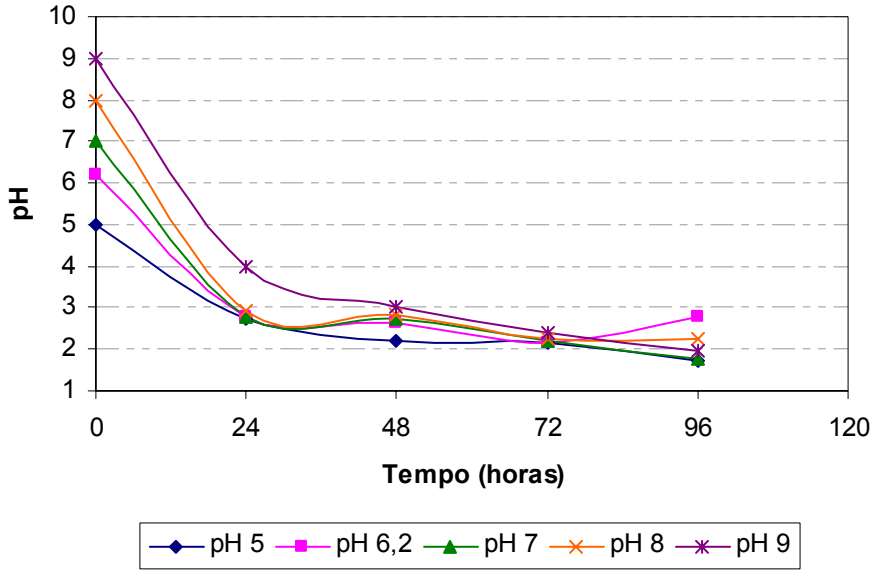


Figura 5.19. Evolução do pH nos diferentes sistemas de cultivo durante fermentação

A Figura 5.20 mostra o perfil cinético de crescimento celular. Observou-se que em todos os meios o crescimento de *Y.lipolytica* foi semelhante, mostrando que ser o mesmo independe do pH inicial na faixa estudada (de 5,0 a 9,0), obtendo-se uma massa celular final de aproximadamente 11 g/L.

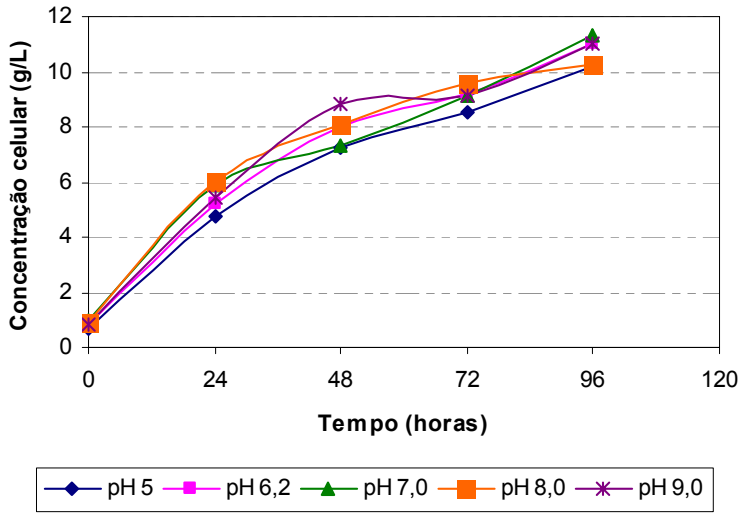


Figura 5.20. Perfil cinético do crescimento celular em sistemas de cultivo com diferentes pH's iniciais.

As Figuras 5.21 e 5.22 apresentam os perfis do índice de emulsificação e da variação da tensão superficial durante a fermentação, respectivamente.

Em ambas as metodologias o perfil de produção do biossurfactante foi semelhante para todos os meios. Análogo aos resultados obtidos nos experimentos do ponto central do planejamento DCCR 2^2, o máximo do IE (82%) foi obtido com 72 horas de fermentação assim como a máxima variação na tensão superficial, aproximadamente 20 mN/m. Os resultados mostram que para a produção de biossurfactante por *Y.lipolytica* não é necessário o ajuste do pH inicial, uma vez que estes foram produzidos de uma forma similar nos meios com pH inicial entre 5,0 e 9,0.

MORIKAWA *et al*. (2000) verificaram aumento da atividade biossurfactante com o aumento do pH, e relataram que a atividade superficial depende do pH devido à presença de duas cadeias carboxílicas na porção peptídica da molécula.

O efeito do pH em relação à produção de biossurfactante por *C. antarctica* foi estudado utilizando tampão fosfato em diferentes pH's (4-8). Todos os tampões utilizados resultaram em uma diminuição do rendimento da produção do biossurfactante, quando comparados com a água destilada (KITAMOTO *et al*. 2001). ZINJARDE e PANT (2002) estudaram a influência do pH inicial na produção do biossurfactante por *Y. lipolytica*. Estes observaram que a maior produção foi obtida em pH inicial igual a 8,0, que corresponde ao pH natural da água do mar.

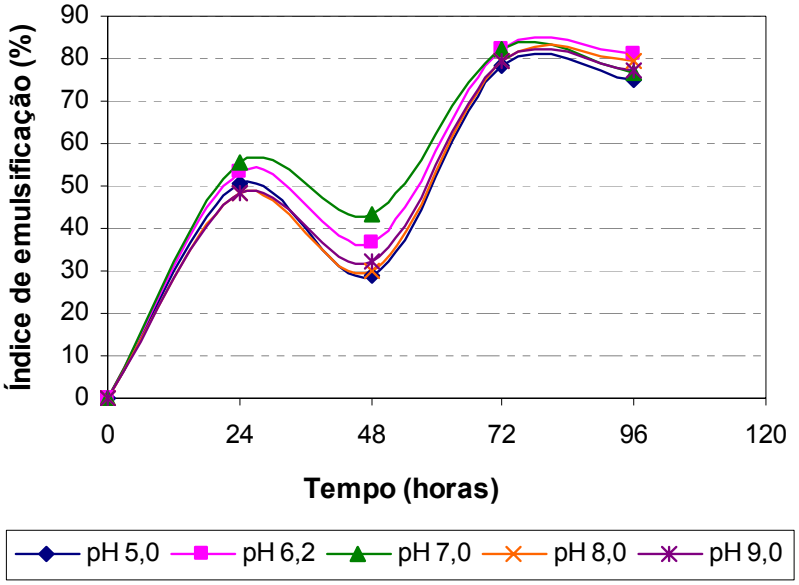


Figura 5.21. Variação do índice de emulsificação durante a fermentação em sistemas com diferentes pH's iniciais

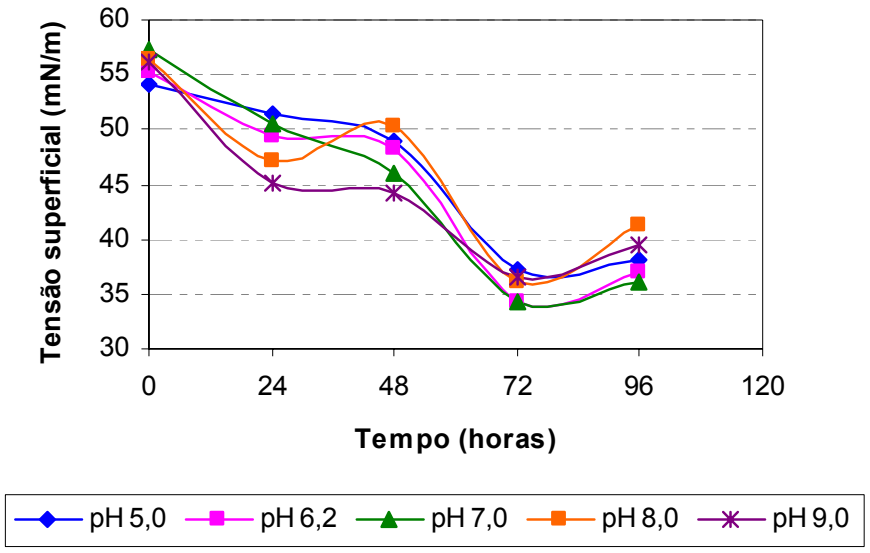


Figura 5.22. Variação da tensão superficial durante a fermentação em sistemas com diferentes pH's iniciais

5.5. Produção de biossurfactante utilizando como substrato o suco de caju clarificado

Estudou-se o crescimento e a produção de biossurfactante por *Y.lipolytica* utilizando suco de caju como substrato. Primeiramente se avaliou a produção com suco de caju clarificado diluído (1:1) sem adição de fonte de nitrogênio (exp. 1) e com adição de sulfato de amônio (0,244% p/v) (exp. 2) para manter a relação C/N de 11,65 a qual proporcionou maiores concentrações de biossurfactante. Diversos parâmetros do processo foram monitorados durante o curso do ensaio e os resultados estão apresentados nas Figuras 5.23 e 5.24.

A Figura 5.23 apresenta a cinética de crescimento de *Y.lipolytica* e de consumo dos açúcares redutores presentes no suco de caju.

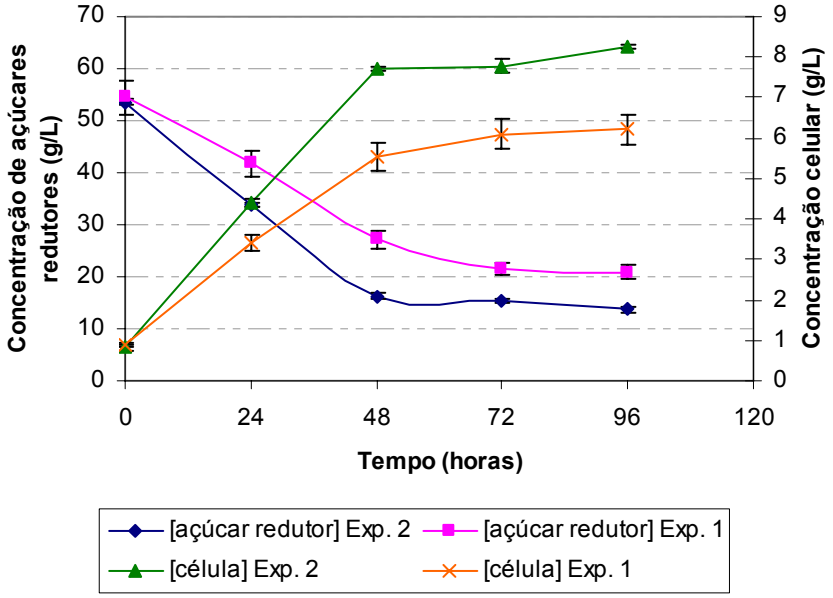


Figura 5.23. Perfil de crescimento celular e consumo de açúcares redutores pela *Y.lipolytica* em meio contendo suco de caju diluído 1:1 sem fonte de nitrogênio adicional (exp.1) e em meio de suco de caju diluído 1:1 com adição de sulfato de amônio (0,224% p/v) (exp.2)

Pode-se observar que a variação da concentração de biomassa nos dois ensaios apresentou uma curva típica de crescimento microbiano. O mesmo comportamento foi observado por diversos autores com diferentes microorganismos (NITSCHKE e PASTORE, 2002; LOBATO LIMA *et al*., 2002; SANTANNA *et al*., 2001; ROCHA, 2007).

Observou-se também que no meio com suco de caju suplementado com sulfato de amônio a taxa de crescimento foi bem maior, atingindo 8,27 $g.L^{-1}$ de biomassa, enquanto que no meio sem a adição da fonte de nitrogênio a produção de biomassa foi de 6,21 $g.L^{-1}$. Resultados similares foram encontrados por SOUZA *et al*. (2005) e ROCHA (2007) que ao avaliar o suco de caju como substrato para o cultivo submerso de *Pseudomonas aeruginosa* observaram um maior crescimento com a suplementação de fonte de nitrogênio, uma vez que o suco apresenta baixa concentração de proteínas solúveis e totais, as quais servem de fonte de nitrogênio.

Quanto ao consumo dos açúcares redutores presentes no suco de caju, *Y.lipolytica* foi capaz de consumir, com uma taxa maior no exp. 2, devido ao seu maior crescimento celular. O açúcar redutor não foi totalmente consumido durante a fermentação restando aproximadamente 13 $g.L^{-1}$ (exp. 2) e 20 $g.L^{-1}$ (exp.1) ao final de 96 horas de cultivo.

Observou-se ainda que o pH do meio de cultivo de ambos os experimentos foi diminuindo lentamente até atingir valor de 3,2 a 3,8 em 48 horas de fermentação, permanecendo posteriormente praticamente constante

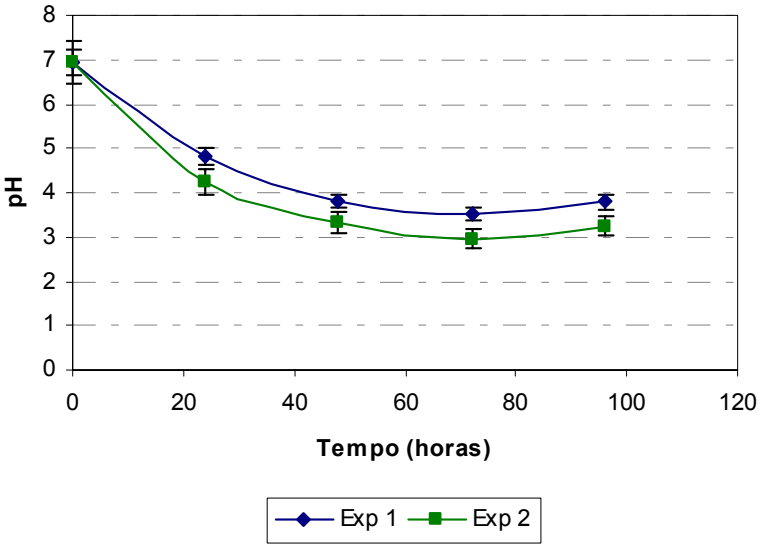


Figura 5.24. Evolução do pH durante a fementação utilizando suco de caju clarificado diluído1:1, sem adição de fonte de nitrogênio (exp.1) e com adição de sulfato de amônio 0,244 % p/v (exp.2).

Portanto, de acordo com os resultados, o suco de caju pode ser utilizado como um meio de cultivo para crescimento de *Y.lipolytica*.

A evolução da tensão superficial e do índice de emulsificação ao longo dos experimentos é apresentada nas Figuras 5.25 e 5.26. Nestes verifica-se que *Y.lipolytica* foi capaz de produzir biossurfactante em meio contendo suco de caju como substrato. A maior produção do biossurfactante se deu no meio suplementado com sulfato de amônio, atingindo um IE de 53,18% e um ΔTS de 18,28 mN/m.

Embora a maior produção de biossurfactante tenha ocorrido em 72 horas de fermentação (já na fase estacionária do crescimento), uma quantidade significativa foi produzida com 24 horas de cultivo, na fase exponencial de crescimento, ou seja, de forma associada ao crescimento.

Pode-se ainda observar que o meio sem a adição da fonte de nitrogênio, não propiciou uma redução significativa na tensão superficial do sistema, obtendo-se apenas uma variação de 11,68 mN/m e o máximo índice de emulsificação obtido foi de 40,10%.

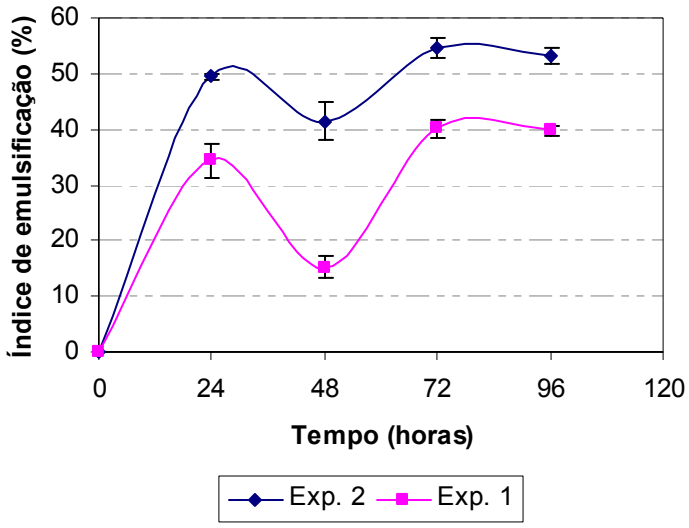


Figura 5.25. Evolução do Índice de emulsificação durante cultivo com suco de caju clarificado diluído 1:1 com a adição da fonte de nitrogênio (exp.1) e sem a adição de nitrogênio (exp.2)

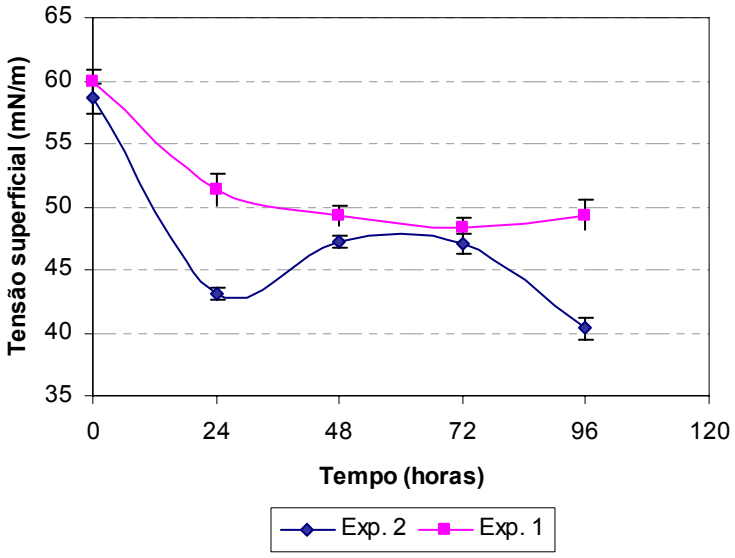


Figura 5.26. Variação da tensão superficial durante cultivo com suco de caju clarificado diluído 1:1 sem a adição de nitrogênio (exp.1) e com a adição da fonte de nitrogênio (exp.2)

Segundo SOUZA *et al*. (2005) e ROCHA *et al*. (2006) a diluição do suco de caju que propiciou maior produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi de 1:10 com água destilada, suplementado com fonte de nitrogênio.

Com o objetivo de avaliar e comparar o desempenho de *Y. lipolytica* nestas condições, foram realizados dois ensaios, com duplicata cada, com suco de caju diluído de 1:10 sem adição de fonte de nitrogênio (exp. 3) e com de sulfato de amônio 1% (exp. 4).

A Figura 5.27 apresenta o perfil de crescimento celular e o consumo dos açúcares redutores totais. Em ambos os ensaios o perfil de crescimento celular foi semelhante ao obtido nos experimentos com suco de caju diluído 1:1, porém em 48 horas de fermentação as células ainda estavam na fase exponencial de crescimento, entrando na fase estacionária apenas após 72 horas de fermentação. Ao contrário, ROCHA (2007) e SOUZA *et al*. (2005), observaram que as células de *P. aeruginosas* entraram na fase estacionária com 30 e 25 horas de fermentação, respectivamente. A concentração máxima de biomassa obtida foi de 6 $g.L^{-1}$ para o experimento sem fonte de nitrogênio (exp 3) e 7 $g.L^{-1}$ para o experimento com adição de fonte de nitrogênio (exp 4).

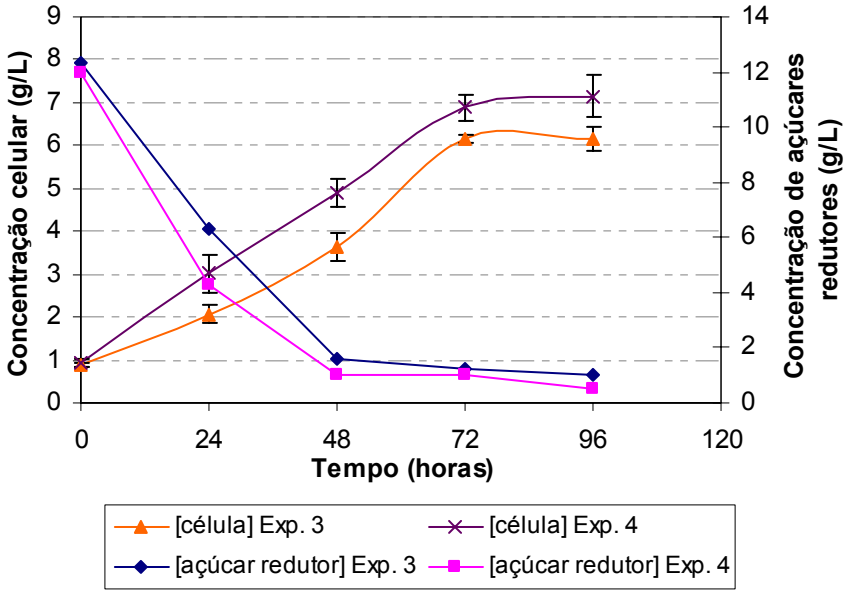


Figura 5.27. Perfil de crescimento celular e consumo de açúcares redutores pela *Y.lipolytica*, cultivado em meio contedo suco de caju diluído 1:10 sem fonte de nitrogênio (exp.3) e com a adição de sulfato de amônio 1%(exp.4)

Quanto ao consumo de açúcares redutores, com 48 horas de fermentação os açúcares foram praticamente consumidos, em ambos os ensaios. O consumo dos açúcares redutores por *P. aeruginosa* foi lento, sendo que ao final de 70 horas de fermentação a concentração de glicose foi de $4g.L^{-1}$ e a de frutose de $3g.L^{-1}$ (ROCHA, 2007), mostrando a lenta assimilação dos açúcares por esse microorganismo quando se comparado com *Y.lipolytica*.

A Figura 5.28 apresenta os resultados da produção de biossurfactante por *Y.lipolytica*. Ambos os meios de cultivo avaliados favoreceram a produção extracelular do biossurfactante, que foi estimada pelo IE e a redução da tensão

superficial. A maior redução na tensão superficial (24,33 mN/m) e maior IE (65%) foram obtidos no experimento 4, no qual adicionou-se sulfato de amônio 1%. A variação máxima da tensão superficial obtida (23,44 mN/m) ocorreu após 48 horas de fermentação.

O meio de cultivo sem a adição da fonte de nitrogênio não propiciou uma redução significativa na tensão superficial (12,55 mN/m) e também não apresentou um bom valor para o IE (40,11%). Segundo WILLUMSEN e KARLSON (1996), um biossurfactante com boas propriedades emulsificantes apresenta um IE acima de 50%. Os resultados mostram desta forma a importância da suplementação da fonte de nitrogênio no meio de cultivo com suco de caju para produção de biossurfactante. Embora a maioria dos microorganismos produza biossurfactante em condições limitantes de nitrogênio (KIM *et al.*, 2006), tem-se a necessidade de uma quantidade inicial suficiente requerida pelo microorganismo, sendo que o tipo e a quantidade deste variam de acordo com o microorganismo empregado.

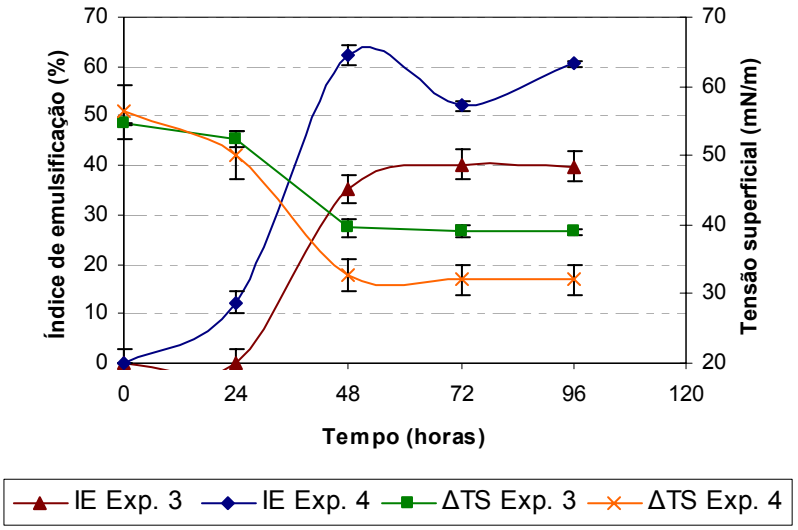


Figura 5.28. Evolução da tensão superficial e do índice de emulsificação do meio livre de células durante cultivo em meio contendo suco de caju diluído 1:10 sem fonte de nitrogênio (exp.3) e com a adição de sulfato de amônio 1%(exp.4)

Segundo ROCHA (2007), *P.aeruginosa* foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio contendo suco de caju diluído 1:10, de 50 para 29,5 mN/m, utilizando como fonte de nitrogênio peptona (5 $g.L^{-1}$). Quando os autores utilizaram sulfato de amônio (5 $g.L^{-1}$) e $NaNO_3$ (5 $g.L^{-1}$) a produção de biossurfactante foi desfavorecida.

A produção de biossurfactante pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, utilizando suco de caju natural e um meio mineral complexo foi avaliado por ROCHA *et al*. (2006). Os autores observaram que o valor máximo alcançado do IE foi 58,8%, valor inferior ao obtido neste trabalho. Não houve uma diminuição significativa da tensão superficial do meio durante os ensaios, diminuindo de 70,0 para 63 mN/m. Contrariamente ao observado neste trabalho, a produção de biossurfactante ocorreu apenas durante a fase estacionária, tendo um comportamento típico de um metabólito secundário.

O suco de caju diluído não foi um substrato adequado para o crescimento da cepa *Bacillus subtilis*, pois não houve crescimento quando cultivado neste meio, tampouco se observou consumo de açúcares e produção de biossurfactante através da medida da redução da tensão superficial do meio. Porém quando se adicionou sulfato de amônio um aumento no crescimento celular foi observado, mas com uma redução não significativa da tensão superficial de 64,5 para 56,8 mN/m, (ROCHA, 2007), variação essa bem inferior a obtida neste trabalho que foi de 24,33 mN/m.

De acordo com os resultados o suco de caju diluído 1:10 suplementado com sulfato de amônio (1%) proporcionou maior produção de biossurfactante (65% IE e 24,33 mN/m ΔTS), em relação ao suco de caju diluído 1:1 suplementado com 0,244% de sulfato de amônio.

Desta forma, os resultados obtidos para o suco de caju diluído 1:10 e suplementado com sulfato de amônio permitem obter um meio de cultura alternativo capaz de suportar o crescimento microbiano e a biossíntese do surfactante. Os carboidratos foram utilizados como fonte de carbono e a concentração de nitrogênio parece ser adequada ao crescimento celular e a produção de biossurfactante.

5.6. Produção de biossurfactante utilizando como substrato a fase glicerinosa, subproduto da produção de biodiesel.

Primeiramente foi realizada a caracterização das amostras de glicerina bruta e tratada, frente à concentração de glicerol, carbono total, nitrogênio total e pH.

A composição da fase glicerinosa oriunda da produção do biodiesel varia largamente em função, do processo de transesterificação e da eficiência da separação do biodiesel. Desta forma, neste trabalho, caracterizaram-se todas as amostras utilizadas. Além disso, os microrganismos têm necessidades nutricionais que precisam ser satisfeitas pelo meio de cultivo utilizado. Portanto, esta caracterização indicou também se haveria necessidade de suplementação das amostras com nutrientes essenciais. A Tabela 5.8 apresenta os principais parâmetros avaliados para as amostras de glicerina bruta e tratada.

Tabela 5.8. Composição das amostras de glicerina

Análise	Glicerina Bruta	Glicerina tratada
Concentração de glicerol ($g.L^{-1}$)	729,51 ± 0,3	741,94 ± 0,2
Carbono total ($g.L^{-1}$)	310,3 ± 0,1	292,75 ± 0,1
Nitrogênio total ($g.L^{-1}$)	ND*	ND*

*ND não detectável, pH = 6,0 ± 0,2

Pode-se observar que tanto a glicerina bruta quanto a tratada (Tabela 5.8) possuem uma elevada concentração de glicerol e carbono total, nutriente este essencial para a produção de biossurfactante e crescimento celular. O pH de ambas as amostras após a correção foi de 6,0, sendo que o pH da fase glicerinosa sem a correção é igual a 13,0, valor muito alcalino para condições de fermentação com microorganismos.

Quanto à quantificação de nitrogênio total das duas amostras, este não foi detectado, ou está presente em valores menores que 1,4 µg/L de nitrogênio, segundo metodologia descrita no item 4.13.7 (Matérias e Métodos).

Desta forma, diante da importância da fonte de nitrogênio no crescimento celular e na produção de biossurfactante, estudou-se a utilização da fase glicerinosa como substrato, suplementado com sulfato de amônio 10 $g.L^{-1}$ e extrato de lêvedo 0,5 $g.L^{-1}$. As fases glicerinosa bruta e a tratada foram utilizadas em uma concentração de 3% (v/v) cada, realizado em duplicata. Os resultados foram comparados com os dados obtidos no ensaio número 2 do

planejamento fatorial completo 2^4, utilizado para otimizar a fonte de carbono, descrito no item 5.3.1, no qual se utilizou 2% (v/v) de glicerol PA (puro).

A Figura 5.29 apresenta o perfil cinético de crescimento de *Y.lipolytica* nos diferentes meios testados. A taxa de crescimento de *Y.lipolytica* foi maior quando se utilizou a glicerina bruta como substrato, seguida pela glicerina tratada e posteriormente pela glicerina pura (PA). Tal fato pode ser atribuído à presença de ácidos graxos na fase glicerinosa bruta, como fonte de carbono adicional, fazendo com que a taxa de crescimento seja maior. Segundo ASHBY *et al*. (2005) o subproduto do processo de síntese do biodiesel, a partir de óleo de soja, contém 40% de glicerol, 34% de compostos solúveis em hexano (sendo estes 92% de razão ácido graxo/metil ester de ácido graxo e 6% de MAG/DAG – monoacil glicerol/diacilglicerol) e 26% de água, mostrando que há ácidos graxos presentes.

Ao final de 96 horas de cultivo a produção de biomassa para o meio contendo glicerina bruta, tratada e pura, foi de 12,03; 8,99; 7,54 $g.L^{-1}$, respectivamente.

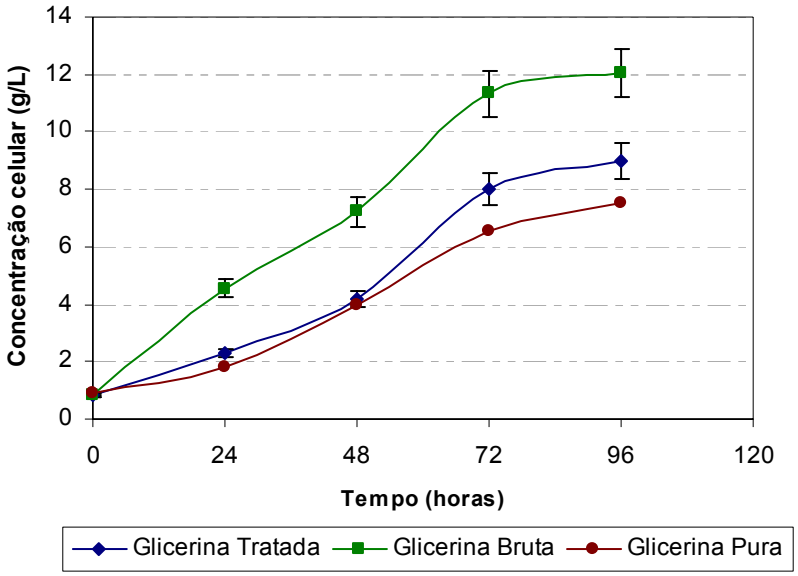


Figura 5.29. Perfil cinético de crescimento de *Y.lipolytica* em meio contendo glicerina bruta (3% v/v), tratada (3% v/v) e pura (2% v/v).

Resultados similares foram obtidos por ASHBY *et al*. (2005) que ao utilizar o subproduto da produção do biodiesel (4%) para o crescimento de *Candida bombicola* obteve uma produção de biomassa de 42,5 $g.L^{-1}$, e ao utilizar glicerol puro (10% v/v) obteve apenas 8,7 $g.L^{-1}$, indicando que

possivelmente altas concentrações de glicerol no meio tem efeito inibitório no crescimento celular causado pelo estresse osmótico.

A Figura 5.30 apresenta o consumo de glicerol por *Y.lipolytica* nos ensaios realizados. Como se pode observar a concentração de glicerol inicial é aproximadamente a mesma nos 3 ensaios. A taxa de consumo foi maior no experimento com a glicerina bruta, seguido pela tratada e posteriormente pelo uso do glicerol puro. Ao final de 96h de cultivo o glicerol foi praticamente consumido nos 3 ensaios.

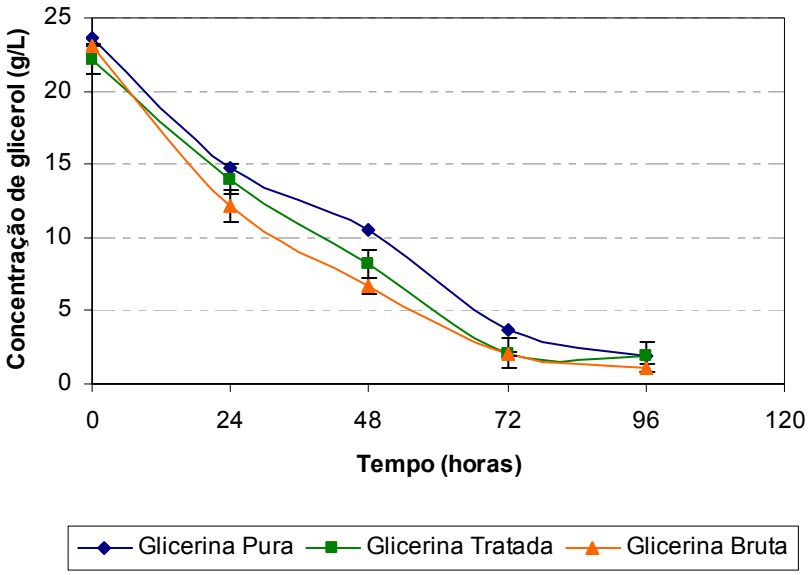


Figura 5.30. Perfil de consumo do glicerol por *Y.lipolytica* em meio contendo glicerina bruta (3%), glicerina tratada (3%) e glicerina pura (2%).

O glicerol é tipicamente consumido pela célula pelo transporte através da membrana celular por difusão facilitada sobre um gradiente de concentração e é sequencialmente convertido em diidroxiacetona fosfato (DHAP), um intermediário comum da via glicolítica, pela ação da glicerol quinase e glicerol fosfato desidrogenase, respectivamente. A DHAP é enzimaticamente transformada em seu isômero gliceraldeído 3-fosfato (G3P), e ambos podem ser convertidos à glicose pela via da gliconeogênse e subsequentemente aos açúcares presentes nos biossurfactantes ou direcionar para o crescimento celular. Alternativamente, G3P pode ser convertido a piruvato para subseqüente conversão a acetil-CoA, principal precursor metabólico para a biossíntese de ácido graxo (LEHNINGER *et al.*, 1995).

As Figuras 5.31 e 5.32 mostram a evolução da tensão superficial e do índice de emulsificação. Pode-se observar que nos dois métodos utilizados para verificar a produção de biossurfactante a maior produção ocorreu no meio contendo a glicerina bruta, atingindo IE de 70,22% e ΔTS de 22 mN/m, em 96 horas de cultivo. Os meios contendo glicerina tratada e pura obteve IE de 54,55 e 62,73 %, respectivamente e ΔTS de 17, 45 e 19, 56, respectivamente.

A maior produção de biossurfactante nos 3 ensaios ocorreu durante a fase estacionária, porém houve produção durante a fase exponencial de crescimento celular, sendo a produção de biossurfactante considerada semi-associada ao crescimento.

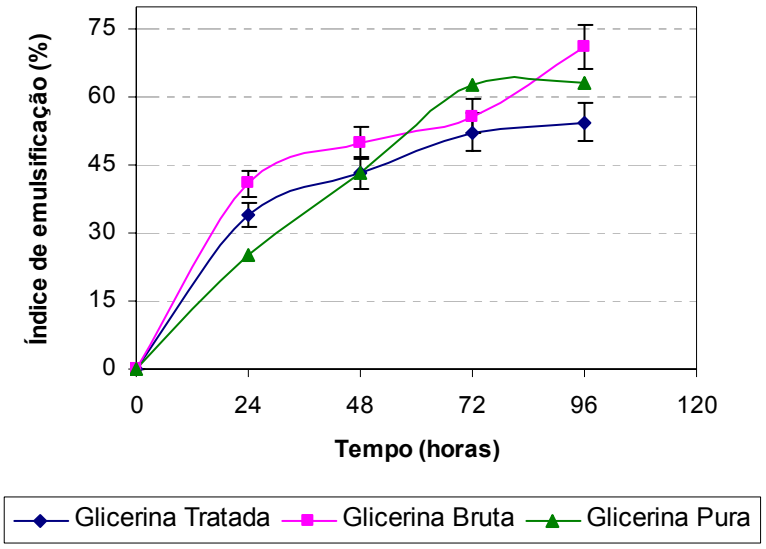


Figura 5.31. Evolução do índice de emulsificação durante a produção de biossurfactante em meio contendo glicerina bruta, tratada e pura.

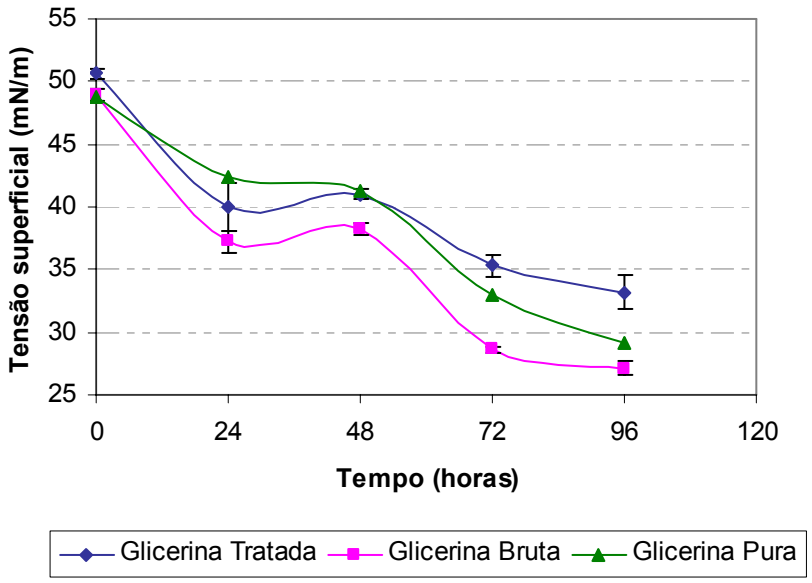


Figura 5.32. Evolução da tensão superficial durante a produção de biossurfactante em meio contendo glicerina bruta, tratada e pura.

O fato da produção de biossurfactantes ser maior no meio contendo glicerina bruta pode ter ocorrido devido à presença de ácidos graxos no meio. Segundo WEBER *et al.*, (1992) as espécies de *Candida* (*Yarrowia*) são capazes de incorporar diretamente ácido graxo para a produção de biossurfactante. Porém utilizam a estratégia de produção de biossurfactante para facilitar a absorção. Enquanto o glicerol é utilizado principalmente para o crescimento celular e para produção da porção hidrofílica da molécula de biossurfactante, os ácidos graxos presentes na glicerina bruta são utilizados pela célula diretamente para a produção dos biossurfactantes. Desta forma, a porção lipídica dos biossurfactantes pode ser influenciada pelo tipo de óleo utilizado na produção do biodiesel.

Cabe ressaltar que durante os experimentos com a glicerina bruta a formação de espuma foi menos intensa quando se comparado com o meio contendo glicerina tratada ou pura.

SOUSA *et al.* (2007) estudaram a produção de biossurfactante pela bactéria *P.aeruginosa* utilizando como fonte de carbono a fase glicerinosa (6%) obtida do processo de produção do biodiesel e $NaNO_3$ como fonte de nitrogênio. Os autores obtiveram IE de 64 % frente ao hexadecano e uma redução da tensão superficial da água de 45,7%. Valores maiores de IE foram obtidos no presente trabalho com *Y.lipolytica* atingindo 71,22 % com a glicerina

bruta, sendo que a redução da tensão superficial foi aproximadamente igual ao valor obtido por SOUSA *et al* (2007).

MORITA *et al.* (2007) avaliaram a conversão microbiana de glicerol em biossurfactante (glicolipídeos) pela levedura *Pseudozyma antarctica* JCM 10317, observando rendimento de glicolipídeos de 16,3 $g.L^{-1}$ em batelada alimentada com glicerol como fonte de carbono.

CIAPINA *et al*. (2007) avaliaram a utilização de glicerol puro como fonte de carbono para produção de biossurfactante pela bactéria *Rhodococcus erythropolis*. Após 51 horas de cultivo, 1,7 $g.L^{-1}$ de biomassa foram obtidos, o biossurfactante produzido apresentou um índice de emulsificação de 67% e valores da tensão superficial e interfacial de 43 e 15 mN/m, respectivamente.

ASHBY *et al*. (2005) comparou a aplicação do glicerol puro e o subproduto da produção do biodiesel como fonte de carbono para produção de soforolipídeos pela levedura *Candida bombicola*. Fermentações com glicerol puro resultaram em baixas sínteses de soforolipídeos (9 $g.L^{-1}$). Entretanto quando utilizaram o subproduto do biodiesel, a produção aumentou para 60 $g.L^{-1}$ de biossurfactante.

5.7. Análise comparativa dos resultados obtidos nas diferentes etapas do processo de otimização

A Tabela 5.9 apresenta um resumo dos resultados obtidos com maior índice de emulsificação (IE) e variação da tensão superficial (ΔTS) nas diferentes etapas de otimização do processo de produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*. Observa-se, nesta Tabela, que estudando os parâmetros de aeração e velocidade de agitação houve um aumento da produção de biossurfactante de 66,16 % (ΔTS) e 35,76%(IE).

Tabela 5.9. Evolução dos resultados do índice de emulsificação e variação da tensão superficial produzido a partir de cultivo de *Y.lipolytica,* nas diferentes etapas do processo de otimização.

Condição experimental	ΔTS (mN/m)	Δ Produção máxima $_{\Delta TS}$ (%)	IE (%)	Δ Produção máxima $_{IE}$ (%)
Yansan [a]	8,66	100,00	28,66	100,00
Aeração/ agitação [b]	14,39	166,16	38,91	135,76
Fonte nitrogênio [c]	20,90	241,33	73,18	255,33
Fonte carbono [d]	20,66	238,56	82,97	289,49
Suco de caju clarif. [e]	24,33	280,94	65,00	226,79
Glicerina bruta [f]	22,00	254,04	70,22	245,01

Condições experimentais:
[a] Yansan: agitação: 250 rpm, Vm/Vf: 0,4, meio de cultivo YPD (extrato de lêvedo 1%, peptona 0,64%, glicose 2%). [b] Aeração e velocidade de agitação: agitação: 250 rpm, Vm/Vf: 0,5. meio de cultivo YPD
[c] Fonte de nitrogênio: agitação: 250 rpm, Vm/Vf: 0,5. Meio de cultivo: glicose 2%, sulfato de amônio (1%) e extrato de lêvedo (0,05%). [d] Fonte de carbono: agitação: 250 rpm, Vm/Vf: 0,5. Meio de cultivo: glicose 2%, glicerol 4%, sulfato de amônio (1%) e extrato de lêvedo (0,05%). [e] Suco de caju clarificado: 250 rpm, Vm/Vf: 0,5. Meio de cultivo: suco de caju diluído 1:10, sulfato de amônio (1%). [f] Glicerina bruta: agitação: 250 rpm, Vm/Vf: 0,5. Meio de cultivo: glicerina bruta (3%), sulfato de amônio (1%) e extrato de lêvedo (0,05%)

Ao estudar os fatores nutricionais principalmente a fonte de carbono e nitrogênio, foram obtidas concentrações bem superiores (2,5 x) do biotensoativo quando comparado com o sistema inicial. O estudo da melhor fonte de nitrogênio para produção de biossurfactante por *Y.lipolytica*, proporcionou um aumento de 141,33% no IE e 155,33% na ΔTS.

Quanto à otimização da fonte de carbono, não houve um aumento significativo na variação da tensão superficial em relação ao estudo da fonte de nitrogênio, porém houve um aumento considerável (189,49%) no IE quando comparado com a produção do Yansan.

Tanto o suco de caju clarificado como a glicerina bruta apresentaram enorme potencial de aplicação como matéria – prima não convencionais. O aumento no índice de emulsificação máximo obtido foi 126,79% e 145,01%, respectivamente e o aumento da variação da tensão superficial obtida foi de 180,94% e 154,04%, quando se comparado com a produção empregando glicose como matéria-prima (Yansan).

A Figura 5.31 apresenta graficamente os resultados do IE (Fig 5.31.A) e da ΔTS (Fig 5.31.B) obtidos durante processo de otimização para as diferentes condições estudadas.

O maior índice de emulsificação, 82,97%, foi obtido em meio contendo glicose (4%) e glicerol (2%) como fonte de carbono. Porém, a máxima variação da tensão superficial (24,33 mN/m) foi obtida no meio contendo suco de caju clarificado. Adicionalmente o comportamento do meio contendo glicose (4%) e glicerol (2%) e o meio empregando glicerina bruta foram similares. Tais fatos podem ser atribuídos à diferença dos componentes presentes no meio de cultivo, principalmente a fonte de carbono, alterando desta forma as características estruturais dos biotensoativos produzidos.

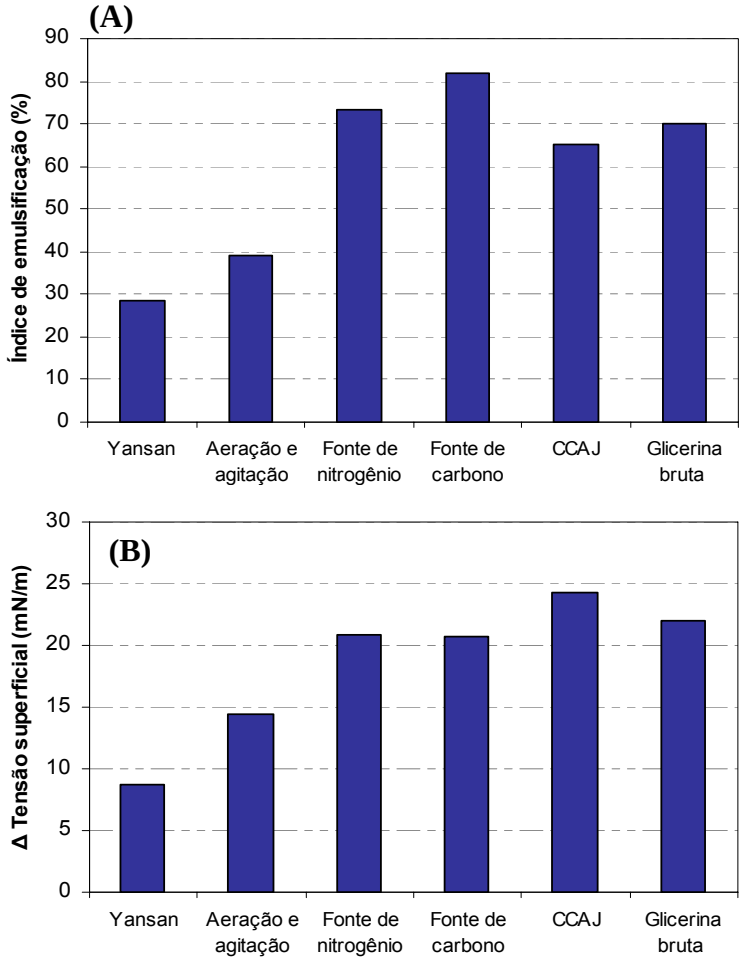


Figura 5.33. Evolução dos resultados do índice de emulsificação (A) e variação da tensão superficial (B) produzido a partir de cultivo de *Y.lipolytica,* nas diferentes etapas do processo de otimização.

O maior índice de emulsificação, 82,97%, foi obtido em meio contendo glicose (4%) e glicerol (2%) como fonte de carbono. Porém, a máxima variação da tensão superficial (24,33 mN/m) foi obtida no meio contendo suco de caju clarificado. Adicionalmente o comportamento do meio contendo glicose (4%) e

glicerol (2%) e o meio empregando glicerina bruta foram similares. Tais fatos podem ser atribuídos à diferença dos componentes presentes no meio de cultivo, principalmente a fonte de carbono, alterando desta forma as características estruturais dos biotensoativos produzidos.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- ✓ A velocidade de agitação e aeração do sistema afetou o crescimento celular de *Y.lipolytica*, assim como a produção do biossurfactante. O aumento da agitação do sistema de 160 para 250 rpm e da razão Vm/Vf de 0,3 para 0,5 conduziu a aumento de produção do biossurfactante pelos três métodos utilizados para a medida da atividade deste composto, com valores máximos para índice de emulsificação (38,91%), variação da tensão superficial (14,39 mN/m) e diâmetro da zona clara (1,15 cm) sendo obtidos sob agitação de 250 rpm e razão Vm/Vf de 0,5.
- ✓ A viscosidade do meio de cultivo livre de células não apresentou alteração durante o processo fermentativo, não sendo desta forma este parâmetro considerado como uma medida da presença de biossurfactante no meio de cultivo.
- ✓ Com o planejamento fatorial completo 2^4, foi possível avaliar os efeitos da fonte de nitrogênio sobre a produção do biossurfactante. O sulfato de amônio foi a variável que apresentou maior influência positiva sobre as variáveis de resposta, seguido pelo extrato de lêvedo, este apresentando influência negativa. A uréia não foi estatisticamente significativa, dentro da faixa de concentração estudada e a peptona foi apenas estatisticamente significativa para o IE. Desta forma, a combinação de nitrogênio orgânico, extrato de lêvedo 0,5 $g.L^{-1}$, e nitrogênio inorgânico, sulfato de amônio 10 $g.L^{-1}$, propiciou maior IE (73,18%) e ΔTS (20,9 mN/m).
- ✓ A variável de resposta “oil spreading” não mostrou ser um bom parâmetro para medida de atividade de biossurfactante, uma vez que houve uma variação significativa nos valores destes para as condições do ponto central, realizados no planejamento fatorial completo 2^4, sendo indicada apenas como uma análise qualitativa.

- ✓ A fonte de carbono utilizada influenciou na produção do biossurfactante. A glicose e o glicerol foram as variáveis que apresentaram maior influência (positiva) sobre o IE e a ΔTS, alcançando IE de 82,97% e ΔTS de 27,52 mN/m.
- ✓ Substratos hidrofóbicos como o óleo de oliva e hexadecano não favoreceram a produção do biossurfactante de *Y.lipolytica* apresentando uma influência negativa, devido a migração das células para a fase hidrofóbica e possível agregação do biossurfactante na parede celular. Portanto, a utilização de glicose e glicerol favorece a liberação dos surfactantes produzidos para o meio de cultivo, além de serem reagentes mais baratos, reduzindo os custos de produção.
- ✓ O delineamento composto central rotacional 2^2 confirmou que concentração de glicose 2% e de glicerol 4% propicia maiores IE (81,13%) e ΔTS (19,55 mN/m), sendo 2,13 e 2,03 vezes maiores do que o processo de produção de biossurfactante inicial proposto por AMARAL (2007), apresentando valores de IE de 38,16% e 9,63 mN/m de ΔTS.
- ✓ A razão C/N onde ocorreu a maior produção de biossurfactante foi de 11,91. Quando a razão de C/N foi abaixo ou acima deste valor a produção de biossurfactante não foi favorecida.
- ✓ A secreção de biossurfactante por *Y.lipolytica* foi similar quando se estudou a variação do pH inicial de 5,0 a 9,0, concluindo que não é necessário o ajuste do pH inicial dos meios de cultivo que se encontram nesta faixa.
- ✓ O suco de caju clarificado pode ser utilizado como substrato para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* atingindo uma biomassa de 8,27 $g.L^{-1}$. A condição que propiciou maior produção de biossurfactante foi em meio contendo suco de caju diluído 1:10 e suplementado com o sulfato de amônio 1%, obtendo redução na tensão superficial de 24,33 mN/m e IE igual a 65%. Além disso, a utilização do suco de caju como meio de cultivo não resultará apenas redução no custo da produção de biossurfactantes, mas também trará uma finalidade a um material que é geralmente descartado nos locais de colheita e contribui à poluição ambiental.
- ✓ A fase glicerinosa, proveniente da produção do biodiesel, suplementada com sulfato de amônio consistiu em um meio de cultura alternativo capaz de suportar o crescimento de *Y.lipolytica* e a biossíntese do

surfactante. A glicerina bruta (3% v/v) foi a que proporcionou maior produção de biossurfactante atingindo valores de IE de 70,22% e ΔTS de 22 mN/m, resultados estes bastantes satisfatórios, que além de reduzir os custos da matéria - prima, diminuem a geração de poluentes e excedentes na produção de biodiesel.

Portanto, o presente trabalho otimizou o processos de produção do biossurfactante por *Y.lipolytica* em frascos agitados, através de modificações na condição de aeração, velocidade de agitação, fonte de nitrogênio e de carbono utilizadas, obtendo um produto biotecnológico bruto com capacidade de aplicação futuras em diversos setores.

Em relação às aplicações de fontes renováveis como matéria-prima, esse estudo apresentou dois exemplos de substratos alternativos, o suco de caju e a fase glicerinosa proveniente da produção do biodiesel, sendo que em ambos os resultados obtidos foram satisfatórios, abrindo um leque de opções para viabilizar economicamente o processo de síntese do biossurfactante.

6.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudar diferentes formas de isolamento e purificação do biossurfactante produzido pela *Y. lipolytica* em meio contendo glicerol 2% e glicose 4%;
- ✓ Fazer uma caracterização físico – química do biossurfactante produzido, assim como avaliar a emulsão formada por estes frente a diferentes hidrocarbonetos;
- ✓ Avaliar o potencial de aplicação desses biossurfactantes na indústria de alimentos, na área biomédica e na biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos;
- ✓ Estudar a atividade antimicrobiana e antivirial do biossurfactante produzido.
- ✓ Aumentar a escala de produção;
- ✓ Estudar estratégias que diminuam a formação de espuma produzida durante a fermentação, como adição de anti-espumante ou através do emprego de biorreatores com sistema de aeração projetado para este fim.
- ✓ Otimizar o meio de cultivo contendo suco de caju clarificado para a obtenção de meio fermentativo rico em biossurfactante..
- ✓ Otimizar o meio de cultivo contendo a fase glicerinosa proveniente da produção do biodiesel.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. Biotechnology letters, v. 22, pp. 313–316, 2000.

AGUEDO, M.; WACHÉ, Y., COSTE, F., HUSSON, F. E BELIN, J.-M. Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricionoleate into γ-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. Journal of molecular catalysis b: enzymatic, v.29, pp. 31-36, 2004.

ALBUQUERQUE, C. D.C.; FILETE, A. M. F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Ampliação de escala e estudo dos efeitos da agitação e da temperatura no processo de produção de bioemulsificante por *Candida lipolytica*. Trabalho completo do X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Goiânia , 2006.

ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. INITIAL Steps of sophoroselipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose Applied .Microbiology Biotechnology, v. 46, pp.67-73, 1996.

ALMEIDA, R. G.; GUSMÃO, C. A. B.; RUFINO, R. D.; FARIAS, C. B. B.;SARUBBO, L. A. planejamento fatorial como ferramenta estatística aplicada à produção de biossurfactante por *Candida tropicalis*. X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006, Goiânia. Livro de Resumos, 2006.

ALMEIDA, F. A. G.; ALMEIDA, F. C. G.; MARTINS JR.; W.; MENESES JR., J.; CARVALHO, P. R. Produtividade potencial de plantas enxertadas de cajueiro anão (*Anacardium accidentale*) em condições de irrigação. Revista Brasileira de Fruticultura,v. 20, pp. 343-352, 1998.

AMARAL, P. F. F. Produção de lipase de Y*arrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Dissertação (Doutorado em Ciências), EQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2007

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

AMÉZCUA - VEGA , C. A.; VARALDO, P. H.M.; GARCÍA. F. .; LEAL E. R.; VÁZQUEZ, R. R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. Bioresource Technology, v. 98, pp. 237–240, 2007.

ANDRADE, R. F. S.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Produção de biossurfactantes por candida lipolytica utilizando manipueira como substrato. Trabalho completo do 1º Workshop Meio Ambiente, Ciência e tecnologia de mãos dadas para o futuro, Pernambuco, 2006.

ASHBY, R. D.; NUÑEZ, A.; SOLAIMAN, D. K.Y., FOGLIA, T. A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. journal of the american oil chemists' society, v. 82, pp. 625–630, 2005.

ASSUNÇÃO, R. B., MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale l.*). Journal of. Food Composition and Analysis., 16, 647-657, 2003.

BANAT, I. M.; MAKKAR. R. S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiol Biotechnology, v. 53, pp. 495 – 508, 2000.

BANAT I. M. The isolation of thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. Biothechnology Letters, n. 15, pp. 591-594, 1993.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. Bioresource Technology, v. 51, pp.1–12, 1995.

BARTH, G.; GAILLARD, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica. FEMS Microbiology Reviews, v. 19, pp. 219-237, 1997.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZK, M.; TOMASIK, J.; PLSZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast, Bioresource Technology, n. 95, pp. 15-18, 2004.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKEB, B. C.; FRANKENBERGER. W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. Microbiological Research, v. 160, pp. 249- 255, 2005.

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

BRADSHAW, I. J.; NISBET, B. A.; KERR M. H.; SUTHERLAND, I. W. Modified xanthan: its preparation and viscosity. Carbohydrate Polymers, Barking, v.3, p.23-38, 1983.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. FEMS Microbiology Letters, v. 244, pp. 229–234, 2005.

CASAS, J.; GARCIA-OCHOA, F. G .Sophorolipid Production by *Candida bombicola*: Medium Composition and Culture Methods. Journal of bioscience and bioengineering, v. 88, n. 5,pp. 488-494, 1999.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The Mannoprotein of Saccharomyces cerevisiae Is an Effective Bioemulsifier. Applied and environmental microbiology, v. 54, n. 6, pp. 1420-1425, 1988.

CAMPOS, D. C. P.; SANTOS, A. S.; WOLKOFF, D. B.; MATTA, V. M.; CABRAL, L.M. C.; COURI, S. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. Desalination., v.148, p. 61–65, 2002.

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

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

CIAPINA, E. M. P., MELO, W. C.; SANTAANNA, L. M. M, SANTOS, A. S., FREIRE D. M. G. PEREIRA, N.J. Biosurfactant production by Rhodococcus erythropolis grown on glycerol as sole carbon source. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 131, n. 1-3, pp. 880-886, 2007.

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

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G M. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from Candida lipolytica. Applied and Environmental Microbiology, v. 50, n. 4, pp. 846-850, 1985.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two Bacilllus Species. Applied and Environmental Microbiology, v. 53, n. 2, pp. 224-229, 1987.

COOPER , D. G.; PADDOCK, D. A. *Torulopsis petrophilum* and Surface Activity. Applied and environmental microbiology, v. 46, n. 6,pp. 1426-1429, 1983.

COOPER , D. G. Biosurfactants. Microbiological Sciences, v. 3, n. 5, pp. 145-149, 1986.

DESAI, J. D. BANAT, I. N. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. Microbiology and molecular biology reviews, v. 61, n. 1, pp. 47–64, 1997.

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

DESPHANDE, S.; SHIAU, B. J.; WADE, D. Surfactants selection for enhancing ex situ soil whashing. Water Resource, v. 33, pp. 351 – 360, 1990.

DIAZ, P. S; VENDRUSCOLO, C. T; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 25, n. 1, p. 15-28, 2004.

DUJON, E.P. Genome evolution in yeast. Nature, v. 430, pp. 35-43, 2004.

FAO - Food and Agricultural Organization. Food and fruitbearing forest species. 3. Examples from Latin America. FAO-Foresty Paper 44/3. Rome, 1986.

FARIAS, C. B. B.; SARUBBO, L. A. Otimização das Condições de Produção de Biossurfactantes por *Candida lipolytica* Utilizando Óleo de Canola e Glicose como Substratos. 3ª Semana de Integração Universidade Sociedade – 3º SIUS e 7ª Jornada de Iniciação Científica, UNICAP, pp. 21-26, 2006.

FICKERS, P.; BENETTI P. H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S. SMIT, M.S.; NICAUD, J. M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research, v. 5, pp. 527–543, 2005.

FLORES, C. L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional Yeasts. FEMS Microbiology Reviews, v. 24, pp. 507-529, 2000.

FRITSCHE, W; HOFRICHTER, M. Aerobic Degradation by Microorganisms. Jena, Germany, 2001 (www.wileyvch.de /books/biotech /pdf /v11b_aero.pdf).

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. Naturwissenschaften, vol. 89, no. 11, p. 483-496, 2002.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASA, A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. Biotechnology Advances, v.18, p.549-579, 2000.

GEORGIOU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. Surface active compounds from microorganisms. Biotechnology, n. 10, pp. 60-65, 2002.

GERIS, R.; DOS SANTOS, N. A. C., AMARAL, B. A., MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. Quimica. Nova, v. 30, n. 5, pp. 1369-1373, 2007.

GÖBBERT, U., LANG, S., WAGNER, F. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulops bombicola*, n. 6, 225 – 230 (1984).

GONÇALVES, V.L.C., PINTO, B.P., MUSGUEIRA, L.C., SILVA, J.C.; MOTA, C.J.A., Biogasolina: Produção de éteres e ésteres da glicerina, Biodiesel, inclusão social, 2006.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M.S.; LIMA, G,M.S.; ARAÚJO, J. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes. Revista Biotecnologia Ciência e desenvolvimento, n. 30, pp. 39-45, 2003.

GRANGEMARD, I.; WALLACH, J.; PEYPOUX, F. Evidence of surfactin hydrolysis by a bacterial endoprotease. Biotechnology Letters, v. 21, p. 241-244, 1999.

GRASSHOFF, K; ERHARDT, M; KREMLING, K. Methods of Seawater Analysis. Verlag-Chemie, Weinhein, 600pp, 1999

GREEK, B. F. Detergent industry ponders for new decade. Chemistry Engineer News, n. 69, pp. 25-52, 1990.

GUILMANOV, V.; BALLISTRERI, A.; IMPALLOMENI, G.; GROSS, R. A. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola.* Biotechnology and bioengineering, v. 77, n. 5, pp. 489-494, 2002.

GUSMÃO, C. A. B.; SARUBBO, L. A. Produção de biossurfactante por *Candida glabrata* cultivada em resíduos de margarina. X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006, Goiânia. Livro de Resumos, 2006.

GUTIERREZ, J.R; ERICKSON, L.E.. Hydrocarbon Uptake in Hydrocarbon Fermentations. Biotechnol. Bioeng., v.19, pp. 1331-1349, 1977.

HISS, A. Cinética de procesos fermentativos. Em: Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica. SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (eds), v. 2, Ed. Edgard Blucher, 2001.

HOMMEL, R.K.; HUSE, K. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. Biotechnology letters, n. 8, 853 – 858, 1993.

HOMMEL, R.K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RIKE, O.; KLEBER, H.P. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. Journal of Biotechnology, n. 15 v. 33, pp. 147-155, 1993.

HONORATO, T.L.; RABELO, M. C.; GONÇALVES, L. R. B.; SAAVEDRA, G. A.; RODRIGUES, S. Fermentation of cashew apple juice to produce high added value products. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 23, pp. 1409-1415, 2007.

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística. Anuário Estatístico do Brasil, Rio de Janeiro, 1996.

ISMAIL, S. A. S.; DEAK, T.; EL-RAHMAN, H. A. ABD.; YASSIEN, M. A. M.; BEUCHAT, L. R. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of Yarrowia lipolytica and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. International Journal of Food Microbiology, v. 64, n. 28 , pp. 13-19, 2001.

JING, C.; XIN, S.; HUI, Z.; YINBO, Q.; Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, pp. 501–506, 2006.

JOHNSON, V., SINGH, M, SAINI, V. S. Bioemulsifier Production by na Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. Biotechnology Letters, v. 14, n. 6, pp. 487-490, 1992.

KAPELI, O.; Finnerty, W. R. Partition of alkane by an extracelular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. Journal of Bacteriology, v. 140, pp. 707-712,1979.

KARINEN, R.S., KRAUSE, A.O.I., New biocomponents from glycerol, Applied Catalisys A: General, v. 306, pp. 128-133, 2006.

KIM, H. S.; JEON, J. W .; KIM, B. H.; AHN, C. Y.; MOCK OH, H.; YOON, B. D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. Applied Microbiol Biotechnology, v. 70, pp. 391-396, 2006.

KIM, T.H.; OH, Y.-S.; KIM, S.J. The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil degrading yeast *Yarrowia lipolytica* 180. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 10, pp. 333–337, 2000.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; CHOUNG, D. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida sp. SY16*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 52, pp. 713-721, 1999.

KIM, S. Y.; OH, D. K.; LEE, K. H.; KIM, J. H. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. Applied Microbiology Biotechnology, v. 48, pp. 23-26, 1997.

KIM, Y. B.; REHM, H. J. Studies on a mixed culture of *Candida parapsilosis* and different bacilli on alkane. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 14, n. 12, pp. 112-119, 1982.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKA.HARA, T. Functions and Potential Applications of Glycolipid Biosurfactants from Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 94, n. 3, pp 187-201, 2002.

KITAMOTO, D.; IKEGAMI, T.; SUZUKI, G. T.; SASAKI, A.; TKEYAMA, Y.; IDEMOTO, Y.; KOURA, Y.; YANAGISHITA, H. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants mannosylerytritol lipids, by *Pseudozyma* (*Candida antarctica*). Biotechnology. Letters, v. 23, pp. 1709-1714, 2001.

KITAMOTO, D.; FUZISHIRO, T.; YANAGISHITA, H.; NAKANE, T.; NAKAHARA, T. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida Antarctica*. Biotechnology Letters, v. 14, n. 4, pp. 305-310, 1992.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Current Opinion in Colloid & Interface Science, v. 7, pp. 12 – 20, 2002.

LANG S.; PHILP J.C. Surface-active lipids in rhodococci. Antonie van Leeuwenhoek, v. 74, pp. 59-70, 1998.

LANG, S.; WULLBRANDT. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potencial. Applied Microbiol Biotechnology, v. 51, pp 22 – 32, 1999.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.L; COX, M. M. Princípios de bioquímica, 2º ed. Editora Sarvier, São Paulo , Brasil, 1995.

LIN, S. C. Biosurfactants: Recent Advances. Journal of Chemistry Technology Biotechnology, n. 66, pp. 109-120, 1996.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J. ROGERS, P. L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 30, pp. 715 – 720, 2003.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; GUSMÃO, C. A. B.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS – TAKAKI, G. M. Produção De Biossurfactantes Por *Candida Glabrata* Utilizando Óleo De Algodão Como Substrato. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005,Recife.Anais,2005.

MADZAK, C.; GAILLARDIN, C.; BECKERICH, J. M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. Journal of Biotechnology, v. 109, pp. 63–81, 2004.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biossurfactante production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. Jounal American Oil Chemistry Society, n. 74, pp. 887-889, 1997.

MAKKAR, R.S. and CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 58, n. 4, pp. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. Journal Science Technolology, ,v. 27, pp.675-683, 2005.

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J.; TORRENS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosas* UG2. Microbiology Research, v. 155, pp. 249-256, 2001.

MENDES, J. S.; ROCHA, M. V. P.; GIRO, M. E. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.Otimização da produção de biosurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju utilizando planejamento fatorial, VI SINAFERM 2007 - XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba, 2007.

MEHER. L. C, SAGAR VIDYA.D, NAIK.S.N - Technical Aspects of production by Transesterification a Review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 10, pp.248-255, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry, v. 31, pp. 426-428, 1959.

MORITA, T.; KONISHI, M. FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Microbial Conversion of Glycerol into Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids, by a Basidiomycete Yeast, Pseudozyma antarctica JCM 10317T. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 104, n. 1, pp. 78-81, 2007.

MOTA, C.J.A., PERES, S., RAMOS, L.P. Relatório de Co-produtos do Biodiesel apresentado no Seminário de Co-produtos do Processo de Produção do Biodiesel, 30-31 Maio, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

MOUSSA, T. A. A; AHMED, G.M; ABDEL-HAMID, S. M. S. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from Nocardia amarae. Journal of Applied Sciences Research, v.2, pp. 844-850, 2006.

MULLIGAN,C. N. Environmental applications for biosurfactants. Environmental Pollution, v. 133, pp. 183–198, 2004.

MULLIGAN,C. N.; WANG, S. Remediation of a heavy metal -contaminated soil by a rhamnolipid foam. Engineering Geology, v. 85, pp. 75–81, 2006.

MYERS, D. Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications, 2º Ed. John Wiley & Sons Inc, 501 pp, 1999.

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

OBERBREMER, A.; MULLER-HURTING, R.; WAGNER, F. Effect of addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. New York: Applied Microbiology and Biotechnology, v. 32, pp. 485-489, 1990.

OLIVEIRA, A. H.S.; ROCHA, M. V. P.; GUIMARÃES, J. A.; CARIOCA, J. O. B.; FILHO, J. J. H.; GONÇALVES, L. R. B. Fermentação do Suco de Caju utilizando Acinectobacter calcoaceticus para a Produção de Biossurfactantes, Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentação; Florianópolis, 2003;

OLIVEIRA, A. H.S.; GUIMARÃES, J. A.; FILHO, J. J. H.; ROCHA, M. V. P.;. LOPES, A. A. S; CARIOCA, J. O. B.; GONÇALVES, L. R. B. Fermentação do Suco de Caju utilizando *Acinectobacter calcoaceticus* para a Produção de Biossurfactantes, Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentação; Florianópolis, 2003;

OLIVEIRA, Adriano H. S.; GUIMARÃES, Juliana Aguilar; HILUY FILHO, João J;.. Produção de biossurfactantes para remediação de ambientes contaminados com

petróleo e derivados. In: II Congresso em P&D em petróleo e gás natural, Rio de Janeiro, 2003.

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

RAU, U.; NGUYEN, L. A.; ROMPER, H.; KOCH, H.; LANG, S. Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidi*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 68, n. 5, 2005.

RIBEIRO, N. m. O processo de transesterificação. 2º Reunião RECOMBIO, Salvador, 2005.

ROCHA, M. V. P. Produção de Biossurfactantes por Fermentação Submersa de Substrato Não Convencional, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

ROCHA, M. V. P.; Oliveira, A. H. S.; Souza, M. C. M.; Gonçalves, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation médium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 22, pp. 1295–1299, 2006.

RODRIGUEZ, G.; PAIS, C. The Influence of Acetic and Other Weak Carboxylic Acids on Growth and Cellular Death of the Yeast *Yarrowia lipolytica*. Food Technology and Biotechnology, v. 38, pp. 27–32, 2000.

RON, E.; ROSENBERG, E. Natural roles biossurfactants. Enviromental Microbiology, v. 3, pp. 229-236, 2001.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied Microbiol Biotechnology , v. 52, pp. 154 – 162, 1999.

ROUSSEFF, D. Biodiesel o Novo combustível do Brasil. Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel, Ministério das Minas e Energia, Brasília, 2004.

SANTANA, W. J.; RUFINO, R. D.; NETO, B.B.; PORTO, A. L.; CAMPOS – TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP065 utilizando o óleo de pequi (Caryocar coriaceum Camb.) proveniente do endocarpo. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos (SP), 2005.

SANTA ANNA, L. M. M. Produção de raminolipídeos e sua aplicação na remediação de solos impactados po óleo. Tese (Doutorado em Ciências), EQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

SANTOS, R. P.; SANTIAGO, A.A.X.; GADELHA, C.A.A.; CAJAZEIRAS, J.B.; CAVADA, B.S.; MARTINS, J.L.; OLIVEIRA, T.M.; BEZERRA, G.A.; SANTOS, R. P.; FREIRE V.N. Production and characterization of the cashew (Anacardium occidentale L.) peduncle bagasse ashes. Journal of Food Engineering, v. 79, pp. 1432–1437, 2007.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. P.; 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, 2001.

SCHMIDELL, W. Em Biotecnologia Industrial; eds.; Edgard blucher LTDA: Brasil 2001, cap 14.

SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils:. a Review. Journal of Brazilian Chemical Society, v.9, p. 199-210, 1998

SHAFI, R., KHANNA, S. "Biosurfactants". Indian Journal of Microbiology, v. 35, pp. 165-184, 1995.

SHAW, D. J. Introdução à Química dos Colóides. Ed. Edgard Bluncher. São Paulo, 184pgs , 1975.

SHEPERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. Journal of Biotechnology , v. 40, pp. 207-217, 1995.

SHIN, K. H.; KIMA, K. W.;AHNB, Y. Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization–biodegradation process. Journal of Hazardous Materials, v. 137, pp. 1831-1837, 2006.

SIMÕES, A.; N.; MENEZES, J. B.; ANDRADE, J. C.; FREITAS, D.F. DA COSTA, F. B.; DE SOUZA, P. A. Caracterização química de pedúnculos de cajuccp-76 em diferentes estádios de desenvolvimento. Caatinga, Mossoró-RN, 14, pp. 75-78, 2001

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends in Biotechnology v. 22, n. 3, pp. 142 – 146, 2004.

SINGH, M.; DESAI, J. D. Hydrocarbon emulsification by *Candida tropicalis* and *Debaryomyces polymorphus*. Indian journal of experimental biology, v. 27, pp. 224-226, 1989.

SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; DESAI, J. D. Production of bioemulsifier by a SCP-producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. Biotechnology Letters, v. 12, pp. 743 – 746, 1990.

SPRINGHAM, D. G. Microbiology methods for the enhancement of oil recovery. Biotechnology Genetic Engineering, n. 1, pp. 187-221, 1984.

SOBRINHO, H, B, S.; GUSMÃO, C. A. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SALGUEIRO, A. A.; SARUBBO, L. A. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* em meio de baixo custo.Trabalho completo do 1º Workshop Meio Ambiente, Ciência e tecnologia de mãos dadas para o futuro, Pernambuco, 2006.

SOUSA, J. R.; MELO, V. M.M.; GONÇALVES, L. R. B. Avaliação de microrganismos quanto à Conversão doGlicerol obtido do Processo de Produção do Biodiesel em Biossurfactantes. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM, Curitiba, 2007.

SOUZA, M. C. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P; GONÇALVES L. R. B. Avaliação de suco de caju como substrato para o cultivo submerso de Pseudomonas aeruginosa. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Campinas, 2005.

SYLDATK, C.; WAGNER, F.; Production of biosurfactant. Em : Biosurfactants and Biotechnology, KOSARIC, N., CAIRNS, W. L., and GARY, N. C. C. (Eds.), Marcel Dekker: New York, 1987, cap. 3.

SZABO, R. Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. Molecular genetics Genomics, v. 265, n. 1, pp. 172-179, 2001.

THANOMSUB, B.; WATCHARACHAIPONG, T.; CHOTELERSAK, K.; ARUNRATTIYAKORN, P.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. Journal of Applied Microbiology,v. 96, pp. 588–592, 2004.

THIMON, L. Effect of lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. FEMS Microbiology Letters, v 128, pp. 101–106, 1995.

THOMPSON, J.C., HE, B.B.. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Applied Engineering in agriculture, v. 22, pp. 261-265, 2006.

TSUGAWA, R., NAKASE, T., KOYABASHI, T., YAMASHITA, K. AND OKUMURA, S. Fermentation of n-para¤ns by yeast. Part III. K-Ketoglutarate productivity of various yeast. Agricultural of Biology and Chemistry, v. 33, pp. 929 - 938, 1969.

VANCE - HARROP, M. H. V.; SARUBBO, L. A.; CARNEIRO DA-CUNHA, M. G.; GUSMÃO, N. B.; TAKAKI, G. M. C. Produção de biossurfactante em meio de cultura de baixo custo suplementado com óleo de milho *Candida lipolytica*. Revista SymposiuM, n. 2, pp. 23-27, 1999.

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

VASDINYEI, R.; DEAK, T. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. International Journal of Food Microbiology, v. 86, pp. 123– 130, 2003.

WEBER, L., DOGE, C., HAUFE, G. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola* . Biocatalysis, v. 5, pp. 267-272, 1992.

WILLUMSEN P.A.; KARLSON U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation, v. 7, n. 5, pp. 415-423, 1996.

YEH M–S, WEI Y-H, CHANG J-S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry, v.41, pp. 1799–1805, 2006.

YOON, S.H.; RHEE, J. S. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 60, pp. 1281–1286, 1983.

YOUSSEF N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal of Microbiological Methods, v. 56, pp. 339– 347, 2004.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. Journal of Basic Microbiology, v. 42, pp. 67–73, 2002.

ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A.; LAZARIDIS, N. K.; GOLYSHIN, P. N. The use of biosurfactants in flotation: application for the removal of metal ions. Minerals Engineering, V. 16, pp. 1231–1236, 2003.