UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Naíra Menezes Ramos

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE BIOSSURFACTANTES POR *Yarrowia lipolytica* EMPREGANDO MATÉRIAS-PRIMAS RENOVÁVEIS PARA APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

RIO DE JANEIRO

2017

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE BIOSSURFACTANTES POR *Yarrowia lipolytica* EMPREGANDO MATÉRIAS-PRIMAS RENOVÁVEIS PARA APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

Naíra Menezes Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Profº Bernardo Dias Ribeiro, D. Sc.

Profª Gizele Cardoso Sant'Ana Fontes, D. Sc.

Rio de Janeiro

Agosto/2017

Ramos, Naíra Menezes.

Produção e caracterização parcial de biossurfactantes por *Yarrowia lipolytica* empregando matérias-primas renováveis para aplicação em formulações cosméticas. Naíra Menezes Ramos. Rio de Janeiro, 2017.
xv, 88p.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, 2017.

Orientadores: Bernardo Dias Ribeiro e Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana
1. Biossurfactante. 2. Emulsão. 3. Valorização de resíduos. 4. Dissertação (Mestrado – UFRJ/EQ). 5. Título

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE BIOSSURFACTANTES POR *Yarrowia lipolytica* EMPREGANDO MATÉRIAS-PRIMAS RENOVÁVEIS PARA APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

Naíra Menezes Ramos

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa 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.

Aprovado por:

Orientadores

_____

Prof° Bernardo Dias Ribeiro, D. Sc.

_____

Profª Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana, D. Sc.

Banca Examinadora

_____

Profª Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

_____

Profº Daniel Weingart Barreto, D. Sc.

_____

Profª Kelly Alencar Silva, D. Sc.

_____

Profº Ivaldo Itabaiana Jr., D. Sc.

_____

Profª Marta Antunes Pereira Langone, D. Sc.

Rio de Janeiro
Agosto de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela grande oportunidade que recebi, de ter feito o curso que escolhi na área que escolhi e pela conclusão dessa dissertação.

Agradeço à minha mãe, Angela, que está sempre presente quando eu preciso e que me ajudou de todas as fomas que pôde para a conclusão dessa etapa importante de minha vida.

Ao meu pai, Sergio, por toda força, compreensão, participação, conversas, almoços, motivação e apoio, de todas as formas.

À minha irmã, Day, com quem eu mais pude contar nos momentos de desespero extremo e que sempre me abençoou com a sua companhia tranquila.

À minha tia Kátia, por estar tornando este processo possível e por alegrar meu dia com a sua comidinha maravilhosa.

À minha avó Nelza, pelo incentivo, pelas palavras de fé, amor e carinho que ela me manda todos os dias.

Agradeço, principalmente, aos meus orientadores, Bernardo e Gi, que tiveram fé em mim e acreditaram que eu seria capaz de cumprir essa tarefa; por toda paciência, empenho e esforços para me ajudarem no desenvolvimento e na conclusão deste trabalho, e por todo o aprendizado.

Agradeço à professora Maria Alice, que me acolheu no BIOSE quando eu era só uma menina perdida pela EQ, pelos ensinamentos, pela paciência que tem tido comigo todos esses anos e pelas polpas de cupuaçu.

Agradeço a todo o grupo BIOSE, em especial, à Ari, ao Felipe e ao Julio, por toda ajuda nesta reta final e que foi de grande valia para mim.

Ao Profº Márcio Nele, por disponibilizar os equipamentos do Laboratório Engepol e aos técnicos Alessandro, Larissa e Nathalie, que tornaram as minhas análises possíveis.

Agradeço à banca, pela disponibilidade de tempo e boa vontade em fazer parte deste trabalho.

À CNPQ por um ano de bolsa de mestrado.

Aos demais amigos que tornam meus dias felizes e com cujo apoio eu sempre posso contar e por todos os demais que tornaram a conclusão deste trabalho possível.

“A força não provém de uma capacidade física,
provém de uma vontade indomável.”
Mahatma Ghandi

RESUMO

RAMOS, Naíra Menezes. **Produção e caracterização de biossurfactantes por Y*arrowia lipolytica* empregando matérias-primas renováveis para aplicação em formulações cosméticas.** Orientadores: Bernardo Dias Ribeiro e Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana. Tese (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Rio de Janeiro, 2017.

Biossurfactantes são biomoléculas anfipáticas com grande potencial de aplicação industrial, cujo uso é limitado pelo alto custo de produção. Visando diminuir esse custo, neste trabalho foram escolhidas duas matérias-primas renováveis: o glicerol bruto e a polpa de cupuaçu, para produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. A levedura foi inoculada em meio YPD e os experimentos foram conduzidos em incubador rotatório por 96 horas. A caracterização parcial dos biossurfactantes, bem como a sua capacidade de estabilizar emulsões cosméticas, são objetivos deste trabalho. O biossurfactante parcialmente purificado foi caracterizado quanto à: quantidade de proteína, quantidade de açúcares totais, variação da tensão superficial, índice de emulsificação e concentração micelar crítica. Os biossurfactantes produzidos foram aplicados na estabilização de emulsões cosméticas, que foi acompanhada por análise de diâmetro médio de micelas em Zetasizer, após uma semana de produção. A formulação cosmética mais estável foi obtida por planejamentos de experimentos e a análise dos parâmetros que contribuíram para a estabilidade das emulsões foi realizada através de diagrama de Pareto, ANOVA e análises estatísticas. Por fim, uma análise comparativa entre os biossurfactantes produzidos foi realizada. Para tal, 3 emulsões diferentes foram preparadas: uma contendo o biossurfactante a partir de glicerol bruto; outra com o biossurfactante a partir de cupuaçu; e uma padrão, sem biossurfactante. A estabilidade das emulsões foi novamente acompanhada por análise de diâmetro médio de micela (Zetasizer), durante 4 semanas após a produção das emulsões. Os resultados indicaram que a emulsão produzida a partir de biossurfactante utilizando glicerol bruto foi capaz de manter a sua estabilidade pelas 3 primeiras semanas após a produção, mostrando que este biossurfactante apresenta potencial para ser aplicado em emulsões cosméticas, porém, novos estudos de estabilidade de emulsão necessitam ser realizados.

Palavras-chave: 1. Biossurfactante 2. Emulsão 3. *Y. lipolítica* 4. Estabilidade

ABSTRACT

RAMOS, Naíra Menezes. **Production and characterization of biosurfactants by *Yarrowia lipolytica* employing renewable sources to application in cosmetics formulations.** Supervisors: Bernardo Dias Ribeiro and Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana. Thesis (Masters in Chemical and Biochemical Processes Technology). Rio de Janeiro, 2017.

Biosurfactants are amphipathic molecules produced by microorganisms. Although they have several applications, their use is limited by the high cost of production. In order to reduce this cost, in this work it were chosen two renewable carbon sources: crude glycerol and cupuaçu pulp, for the production of biosurfactant by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. The yeast was inoculated in YPD medium and the experiments were conducted in rotatory incubation systems (28ºC, 250 rpm) for 96 hours. The partial characterization of the biosurfactants, as well as their ability to cosmetic emulsions, are objectives of this work. The partially purified biosurfactant was characterized for: the amount of sugars, the amount of protein, surface tension variation, emulsification Index and critical micelar concentration. The produced biosurfactants were applied in the stabilization of cosmetic emulsions, which was monitored by mean diameter of the micelles analysis (Zetasizer), after one week of the production. The most stable cosmetic formulation was obtained by experiments planning and the analyzes of the parameters which have contributed to the stability of the emulsions was made through Pareto diagram, ANOVA and statistical analyzes. Lastly, a comparative analyzes between the produced biosurfactants was performed. For such purpose, 3 different emulsions were prepared: one containing the biosurfactant from crude glycerol; another with the biosurfactant from cupuaçu; and a standard, without any biosurfactant. The stability of the emulsions was again monitored by mean diameter analysis (Zetasizer), during 4 weeks after production. The results indicated that the emulsion produced with the biosurfactant by crude glycerol as carbon source was capable of maintaining its stability for 3 weeks after production, showing that this biosurfactant has potential to be applied in cosmetic emulsions, although new emulsions stability analyzes must be done.

Keywords: 1. Biosurfactant 2. Emulsion 3. *Y. lipolítica* 4. Stability

ÍNDICE

Agradecimentos iv

Introdução 1

Objetivos 4

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica 5

1.1. Biossurfactantes 5

1.1.1. Definição e propriedades 5

1.1.2. Classificações dos Biossurfactantes 7

1.1.3. Produção dos Biossurfactantes 10

1.1.4. Função Fisiológica Dos Biossurfactantes 11

1.1.5. Aplicações 11

1.1.6. Biossurfactantes em Cosméticos 13

1.2. Tensão Superficial 14

1.2.1. Definição e Propriedades 14

1.2.2. Concentração Micelar Crítica (CMC) 15

1.2.3. Micelas 16

1.2.4. Mecanismo de Ação do Biossurfactante 17

1.3. Emulsões 18

1.3.1. Definição e Propriedades 18

1.3.2. Mecanismo de Formação de Emulsão 19

1.3.3. Estabilidade de Emulsões 20

1.3.4. Desestabilização de Emulsão 22

1.3.5. Aplicações 24

1.4. *Yarrowia lipolytica* 25

1.4.1. *Habitat* 25

1.4.2. Metabolismo 26

1.4.3. Dimorfismo 27

1.4.4. Gênero *Yarrowia* 28

1.4.5. Potenciais de aplicação 28

1.4.6. *Y. lipolytica* como produtora de Biossurfactante 28
1.5. Fontes de Carbono de Origem Renovável 29
1.5.1. Glicerol Bruto como Fonte de Carbono 29
1.5.2. Suco de Cupuaçu como Fonte de Carbono 35
Capítulo 2: Metodologia Experimental 40
2.1 Materiais e Métodos 40
2.2 Condições de Microorganismo e Inóculo 41
2.2.1. Manutenção do Meio de Cultura 41
2.2.2. Obtenção do Inóculo 41
2.3 Produção do Biossurfactante 41
2.3.1. Meio de Cultivo A Partir De Glicerina Bruta 41
2.3.2. Meio de Cultivo A Partir De Suco De Cupuaçu Clarificado 42
2.4 Extração e Purificação Parcial do Biossurfactante 42
2.5 Determinação da Produção do Biossurfactante 43
2.5.1. Tensão Superficial 43
2.5.2. Índice de Emulsificação (IE) 44
2.6. Métodos Analíticos 44
2.6.1. Quantificação do Crescimento Celular 44
2.6.2. pH do Meio de Cultivo 45
2.6.3. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores 45
2.6.4. Determinação da Concentração de Glicerol 46
2.7. Métodos para a Caracterização do Biossurfactante 47
2.7.1. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) 47
2.7.2. Determinação do Conteúdo Protéico 47
2.7.3. Determinação de Açúcares Totais 48
2.8. Emulsões utilizando o Biossurfactante proveniente da Glicerina Bruta 49
2.8.1. Preparo das Emulsões Cosméticas 49
2.8.2. Planejamentos de Experimento 49
2.9. Análise Comparativa da Estabilidade de Emulsões 51
2.9.1. Preparo das Emulsões Cosméticas utilizando Biossurfactante proveniente da Polpa do Cupuaçu 51

Capítulo 3: Resultados e Discussão 53
3.1. Produção de Biossurfactante 53
3.1.1. Análise do Crescimento Celular e perfil de Consumo de Substrato 53
3.1.2. Comportamento do IE e da Tensão Superficial do meio de cultivo 55
3.2. Caracterização do Biossurfactante 60
3.2.1. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) 60
3.2.2. Determinação da Concentração de Proteínas 62
3.2.3. Determinação da Concentração de Açúcares Totais 62
3.4. Avaliação da Estabilidade de Emulsões 63
3.5. Análise Comparativa De Estabilidade De Emulsões 68
Conclusões 71
Sugestões para Trabalhos Futuros 73
Referências Bibliográficas 74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas de alguns biossurfactantes comuns: (a) Manosil, (b) Surfactina, (c) Éster de trealose, (d) Soforolipídeo, (e) Ramnolipídeo e (f) Emulsan. Fonte: Fakhruddin (2012). 6
Figura 2. Estrutura do ramnolipídeo L-ramnosil-L-ramnosil-β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato. Fonte: Mulligan (2005). 8
Figura 3. Estrutura da surfactina. Fonte: Da Silva *et al.* (2015). 8
Figura 4. Estrutura do fosfolipídeo fosfatidilinositol. Fonte: Garcia (2010). 9
Figura 5. Estrutura do Emulsan. Fonte: Chamanrokh *et al.* (2012). 9
Figura 6. Esquema das forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido. . 14
Figura 7. Estruturas básicas formadas por biossurfactantes a partir da CMC. 16
Figura 8. Esquema de formação de uma micela esférica a partir da CMC. 16
Figura 9 - Esquema didático para tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante. Fonte: Santos *et al.* (2007). 17
Figura 10. Esquema didático para tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante. Fonte: Cara (2009). 18
Figura 11. Esquema representativo de uma emulsão óleo em água (I) e de uma emulsão água em óleo (II). Adaptado de: De Oliveira *et al*. (2004). 19
Figura 12. Microscopia óptica de uma emulsão múltipla (A/O/A). Fonte: Lim *et al.* (2013). 19
Figura 13. Esquema de formação de emulsão. 20
Figura 14. Formas de empacotamento para emulsão monodispersa e polidispersa, respectivamente. Fonte: Azevedo (2016). 22
Figura 15. Processos de quebra de emulsão. Fonte: Azevedo (2016). 24
Figura 16. Morfologia microscópica de *Y. lipolytica*. Fonte: Nunes (2011). 27
Figura 17 - Estrutura molecular do glicerol. 30
Figura 18. Reação de transesterificação de triglicerídeos com álcool. 32
Figura 19. Vias metabólicas do glicerol e seus respectivos bioprodutos. 34
Figura 20. Árvore do cupuaçuzeiro. 36
Figura 21. Fruto do cupuaçu. 37
Figura 22. Sementes do cupuaçu secas e fermentadas. Fonte: Teixeira (2014). 38

Figura 23. Sistema de ultrafiltração BRATS utilizado para concentrar o extrato livre de células. 43
Figura 24. Medição do IE dos meios de cultivo 44
Figura 25. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Y. lipolytica* através de medidas de absorbância em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800). 45
Figura 26. Curva padrão de DNS (glicose + frutose) para quantificação de açúcares redutores presentes no meio de cultivo. 46
Figura 27. Curva padrão glicerol realizada em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu a 505 nm. 47
Figura 28. Curva padrão da concentração da proteína BSA medida em espectrofotômetro. 48
Figura 29. Curva padrão construída para determinação da concentração de açúcares totais. 48
Figura 30. Zetasizer utilizado para medir o diâmetro médio das micelas. 49
Figura 31. Perfil cinético de crescimento de *Y. lipolytica* (■) e de consumo do glicerol (♦) em meio contendo glicerina bruta (3%). 53
Figura 32. Perfil cinético de crescimento de *Y. lipolytica* em meio contendo CCJ, suplementado com sulfato de amônio 10 g^{-1} e extrato de levedo (0,5g^{-1}) (▲) e concentração de açúcares redutores (●). 54
Figura 33. Evolução do IE (■) e da tensão superficial (♦) durante a produção de biossurfactante em meio contendo glicerina. 55
Figura 34. Índice de emulsificação do meio de cultivo contendo suco de cupuaçu clarificado. 55
Figura 35. Decaimento da transmitância para em função das concentrações do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta antes (■) e depois (♦) da interseção das curvas. 60
Figura 36. Decaimento da transmitância para em função das concentrações do biossurfactante produzido a partir de suco de cupuaçu clarificado (■) e depois (♦) da interseção das curvas. 60
Figura 37. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do DCCR 2^4 (1) e ANOVA com modelo ajustado para o diâmetro médio das micelas (2). 65
Figura 38. Superfície de resposta da variável diâmetro médio em relação em relação à concentração de span 80 e álcool cetoestearílico. 65

Figura 39. Diagrama de Pareto para estimar o efeito de cada variável no planejamento de misturas (1), curva de contorno (2) e teste F. 67
Figura 40. Emulsão 9 do planejamento de misturas, avaliada como a emulsão produzida mais estável (D_m = 114,52 nm). 68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes de surfactantes e espécies microbianas produtoras..... 10
Tabela 2. Potenciais aplicações comerciais dos biossurfactantes..... 12
Tabela 3. Surfactantes sintéticos e respectivos valores de tensão superficial. 15
Tabela 4. Algumas propriedades do glicerol. 30
Tabela 5. Composição do glicerol bruto..... 31
Tabela 6. Valor nutricional de 100 g de polpa de cupuaçuzeiro. 37
Tabela 7. Valor nutricional das sementes de cupuaçu (% de matéria seca). 38
Tabela 8. Informação nutricional da polpa de cupuaçu da marca ICEFRUIT®. 42
Tabela 9. Níveis dos parâmetros avaliados no primeiro planejamento. 50
Tabela 10. Matriz do planejamento de misturas..... 50
Tabela 11. Matriz do teste de otimização com as concentrações dos parâmetros avaliados. 51
Tabela 12. Concentrações dos parâmetros utilizadas na análise comparativa da estabilidade de emulsões. 51
Tabela 13. Variação da tensão superficial total do meio de cultivo contendo CCJ como fonte de carbono. 56
Tabela 14. Parâmetros obtidos na produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* utilizando cupuaçu e glicerol bruto como fonte de carbono..... 57
Tabela 15. Comparação dos resultados de índice de emulsificação (IE), variação da tensão superficial (ΔTS) e produção de biossurfactante (Xp) com outros trabalhos que utilizaram *Y. lipolytica* como microorganismo produtor de biossurfactante..... 59
Tabela 16. Exemplos de surfactantes e suas respectivas CMCs..... 61
Tabela 17. Concentração de proteínas do biossurfactantes produzidos. 62
Tabela 18. Concentração de carboidratos totais do biossurfactantes produzidos..... 62
Tabela 19. Matriz do 1º planejamento experimental com os valores reais e respectivos resultados para o diâmetro médio das micelas após 7 dias de produção da emulsão cosmética. 64
Tabela 20. Matriz do segundo planejamento experimental com os valores reais e respectivos resultados para o diâmetro médio das micelas após 7 dias de produção da emulsão cosmética..... 66

Tabela 21. Matriz do teste de otimização com os valores reais e respectivos resultados para o diâmetro médio das micelas após uma semana de produção da emulsão cosmética. 67
Tabela 22. Diâmetro médio das micelas medidos em Zetasizer para os tempos de 24h, 1 semana, 3 semanas e 4 semanas de armazenamento a 25ºC..... 68
Tabela 23. Fotografia das 3 emulsões estudadas nos tempos de 24h, 1 semana e 3 semanas..... 70

INTRODUÇÃO

Uma emulsão é um sistema com duas ou mais fases, compostas por uma dispersão coloidal, onde a fase dispersa é composta de pequenos glóbulos de líquido distribuídos em uma outra fase de composição distinta, na qual estes glóbulos são imiscíveis (ALLEN *et al.*, 2007; SCHRAMM, 2006). Os surfactantes desempenham um importante papel nas formulações cosméticas devido às suas propriedades, como molhamento, solubilização, emulsificação, capacidade de formar espuma, detergência, entre outras (FERREIRA *et al.*, 2017).

Atualmente, a maioria dos surfactantes utilizados industrialmente é baseada em derivados do petróleo, apresentando potencial para desencadear uma série de problemas ambientais e toxicológicos, devido à sua natureza recalcitrante e persistente. Além disso, muitos surfactantes sintéticos apresentam baixa biodegradabilidade, o que limita seu uso em diversas aplicações industriais e ambientais (ANJUM *et al.*, 2016; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; MAKKAR & ROCKNY, 2003; SARKAR *et al.*, 2005).

Os biossurfactantes apresentam propriedades emulsificantes semelhantes às dos surfactantes sintéticos, porém, com algumas vantagens, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior compatibilidade como meio ambiente, possibilidade de produção por fontes renováveis e atuação sobre condições extremas de pH, temperatura e salinidade e (HASSAN *et al*., 2016; PEREIRA *et al*., 2013).

Além disso, os biossurfactantes podem ser estáveis quanto os de origem sintética e apresentam longo tempo de armazenagem, podendo ser utilizados nos mesmos processos industriais, com evidentes benefícios para o ambiente. Por estes motivos, o interesse por biossurfactantes tem aumentado nos últimos anos (KIM *et al*., 2000; MARTINS, 2011; MUKHERJEE *et al*., 2006).

No entanto, apesar de apresentarem diversas propriedades benéficas ao meio ambiente, o alto custo de produção dos biossurfactantes ainda representa o seu maior obstáculo na utilização industrial, como é o caso da maioria dos produtos obtidos por processos biotecnológicos. Esse custo de produção elevado faz com que essas substâncias não sejam capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos disponíves no mercado (DAVIS *et al*., 1999; THAVASI *et al*., 2011).

O problema econômico da produção de 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 custo final do produto. Nesse contexto, os resíduos agroindustriais se apresentam como uma matéria–prima com grande potencial para produção de biossurfactantes, uma vez que possuem muitos nutrientes para auxiliar no crescimento da célula e possuem baixo valor de mercado (FONTES, 2008; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Dentre os resíduos industriais de maior importância nos últimos anos, destaca-se o glicerol bruto, por este ser uma matéria-prima de origem renovável promissora, constituindo o principal subproduto do processo de produção de biodiesel por transesterificação. Devido ao crescente interesse mundial no uso de combustíveis a partir de fontes alternativas, a demanda por biocombustíveis como o biodiesel tem aumentado, o que, consequentemente, aumenta a produção de glicerol bruto. O glicerol, em sua forma bruta, possui valor agregado muito baixo devido à presença das diversas impurezas presentes em sua composição (FONTES, 2008; SIQUEIRA, 2015; THOMPSON *et al*., 2006). Dessa forma, tem-se buscado novas aplicações biotecnológicas para o para o glicerol bruto, como a produção de biossurfactantes (AMARAL *et al*., 2006; FONTES, 2008).

No caso do cupuaçu, as suas sementes constituem a sua porção de maior valor agregado, uma vez que estas são utilizadas para a produção de óleo de cupuaçu, o qual se destaca como uma das gorduras mais estudadas nos últimos anos para substituir parcialmente a manteiga de cacau, uma das matérias-primas de maior valor agregado do chocolate (COHEN & JACKIX, 2009). Devido à crescente expansão do mercado do cupuaçu em nível nacional e internacional, houve possibilidade de ampliar o cultivo e aumentar a oferta de produto (ALVES, 2002). Assim, vislumbrou-se na polpa de cupuaçu um resíduo agroindustrial com potencial para a produção de biossurfactantes, devido ao seu alto valor nutricional (SOUZA, 2011) e baixo valor de mercado.

Desta forma, o estudo da utilização de resíduos como a polpa de cupuaçu e o glicerol bruto como meio de cultura de baixo custo para o crescimento celular pode indicar rotas econômicas alternativas para a produção de biossurfactantes e viabilizar o seu uso em larga escala, tornando-os compostos de uso comum nas indústrias em um futuro próximo.

Portanto, pretende-se com esse trabalho a produção e caracterização parcial de substâncias com propriedades surfactantes, a partir da cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando meio de cultivo contendo substratos de origem renováveis, com o objetivo de diminuir os custos de produção de biossurfactante para futuras aplicações na área cosmética. Em virtude disso, o presente trabalho também teve como objetivo avaliar a capacidade de estabilização de emulsões pelos biossurfactantes produzidos, a fim de estudar o seu potencial de uso em formulações cosméticas. Por fim, este trabalho visa dar continuidade àquele desenvolvido por FONTES (2008), no qual as condições ótimas para a produção de biossurfactantes por *Y. lipolytica* utilizando suco de caju clarificado e glicerina foram estudadas, obtendo resultados satisfatórios e vislumbrando a possibilidade de viabilizar economicamente o processo de síntese do biossurfactante.

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo produzir, caracterizar parcialmente e avaliar a capacidade de estabilização de emulsões dos biossurfactantes produzidos pela levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em dois meios de cultivo distintos: um utilizando glicerol bruto como fonte de carbono e outro utilizando suco de polpa de cupuaçu clarificado.

Para alcançar o objetivo geral do projeto, os seguintes estudos foram realizados:

- Avaliação do crescimento celular da levedura *Y. lipolytica* e acompanhar a produção dos biossurfactantes produzidos nos dois meios de cultivo disintos;
- Caracterização parcial do biossurfactante produzido em cada meio de cultivo;
- Elaboração de emulsões cosméticas utilizando ambos os biossurfactantes produzidos;
- Caracterização das emulsões cosméticas.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. BIOSSURFACTANTES

1.1.1. DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES

Biossurfactantes ou surfactantes microbianos são biomoléculas produzidas por uma grande variedade de microorganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos presentes na natureza (SOUZA *et al.*, 2017). A partir desses microorganismos, os biossurfactantes podem ser sintetizados extracelularmente ou como parte da membrana celular, a partir de substratos que incluem açúcares, óleos, alcanos, entre outros (MULLIGAN, 2005).

O termo "surfactante" é derivado da contração da expressão *surface active agent*, que, por sua vez, significa "agente de atividade superficial". Sendo assim, surfactantes são compostos caracterizados por apresentarem uma superfície ativa, capaz de interagir com as moléculas do líquido em que se encontram e de transformar as propriedades da tensão superficial e interfacial do líquido e, por isso, são também chamados de tensoativos ou compostos de superfície ativa (BARROS *et al.* 2007).

Através do seu acúmulo na interface do sistema, os biossurfactantes reduzem as tensões superficial e interfacial de fluídos imiscíveis entre si, aumentando a solubilidade e mobilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos ou insolúveis. São capazes ainda de promoverem emulsificação, molhamento e formação de espuma no sistema (MARCHANT & BANAT, 2012; SINGH *et al.*, 2007).

As moléculas de biossurfactante são anfifílicas, isto é, apresentam uma porção hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar). Em função da presença desses dois grupos na mesma molécula, os biossurfactantes tendem a se distribuir preferencialmente nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, tais como óleo/água e ar/água (BANAT *et al.*, 2000). O grupo polar (cabeça da molécula) ou iônico interage fortemente com o meio polar, que é solvatado via interação dipolo-dipolo ou íon-dipolo (BAPTISTA, 2007).

Em sua composição molecular, a porção hidrofílica dos biossurfactantes pode ser composta por: aminoácidos, peptídeos, ésteres e carboidratos ou pelos grupos hidróxi, fosfato, álcool e carboxila; e a sua porção hidrofóbica é composta por cadeias de

hidrocarboneto saturadas ou insturadas de 10 a 18 carbonos ou por ácidos graxos. Essas estruturas lhes conferem uma ampla gama de propriedades, incluindo as habilidades de formar micelas e microemulsões entre duas fases, o que os torna úteis em diversas aplicações (BANAT *et al.*, 2010; SUWANSUKHO *et al.*, 2008).

A Figura 1 ilustra as estruturas químicas de alguns biossurfactantes comuns, onde é possível observar suas porções polares e apolares, bem como os grupos funcionais que os compõem.

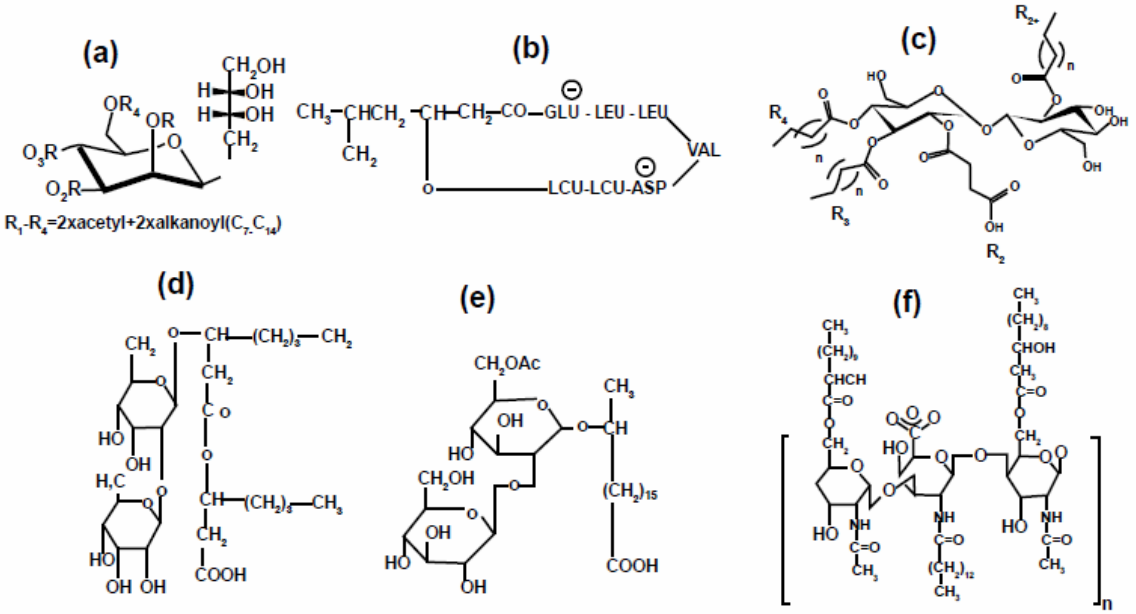


Figura 1. Estruturas químicas de alguns biossurfactantes comuns: (a) Manosil, (b) Surfactina, (c) Éster de trealose, (d) Soforolipídeo, (e) Ramnolipídeo e (f) Emulsan. Fonte: Fakhruddin (2012).

Biossurfactantes foram primeiramente descobertos como compostos extracelulares anfifílicos em fermentação de hidrocarbonetos, no fim dos anos 60 (KHAN *et al.* 2017). Porém, recentemente emergiram como moléculas promissoras devido, principalmente, à sua versatilidade estrutural e às suas diversas propriedades, que são potencialmente úteis em muitas aplicações terapêuticas (GUDIÑA *et al.*, 2013).

Dentre as propriedades que os biossurfactantes apresentam, podem-se citar duas fundamentais, também comuns aos surfactantes (BUENO, 2008):

– As moléculas migram do seio da solução para as interfaces (ex: ar-1íquido, líquido-1íquido) com orientação específica (adsorção);

– Formam agregados orientados, também conhecidos como micelas. A formação de micelas em solução irá conferir, por sua vez, as propriedades de detergência e de solubilização.

Além destas duas propriedades fundamentais, os biossurfactantes possuem muitas outras propriedades, como: formação de macroemulsões (micelas com diâmetro acima de 0,4 μm) e microemulsões (micelas com diâmetro entre 0,01 e 0,1μm), dipersão ou agregação de sólidos, ação espumante ou anti-espumante, solubilidade, solubilização, molhabilidade, detergência, lubrificação e dispersão de fases (BAPTISTA, 2007; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

1.1.2. CLASSIFICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES

1.1.2.1. DE ACORDO COM O SEU PESO MOLECULAR

Os compostos de superfície ativa (SACs) são geralmente classificados de acordo com o seu peso molecular, propriedades físico-químicas e forma de ação. Os SACs de baixo peso molecular são chamados de biossurfactantes e reduzem a tensão superficial da interface ar/água, enquanto os SACs de alto peso molecular, conhecidos como bioemulsificantes, reduzem a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis ou entre em interfaces de sistemas sólido-1íquido, sendo mais efetivos na estabilização de emulsões óleo em água. Geralmente, os biossurfactantes também exibem capacidade de emulsificar, mas nem sempre os bioemulsificantes reduzem a tensão superficial (BANAT *et al.*, 2010; FREITAS *et al.* 2009).

1.1.2.2. DE ACORDO COM A NATUREZA DO GRUPO POLAR

Baseado na natureza de seu grupo polar, os biossurfactantes podem ser classificados como: aniônicos, catiônicos, não iônicos ou zwiteriônicos (AKYODE *et al.*, 2016). No entanto, os tipos mais comuns encontrados de biossurfactante são os não-iônicos ou aniônicos, havendo casos de estruturas catiônicas encontradas naquelas contendo aminas (BAPTISTA, 2007).

1.1.2.3. DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Os biossurfactantes fazem parte de um diverso grupo de compostos químicos, como: glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e complexos lipídeo-polissacarídeo (MUKHERJEE *et al.*, 2009), descritos a seguir:

1ª) Glicolipídeos - Nesta classe, estão presentes os biossurfactantes mais conhecidos e estudados, sendo os considerados de baixo peso molecular. São carboidratos ligados a uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidroxi-alifáticos. Dentre os principais glicolípideos, destacam-se os ramnolipídeos, os trealolipídeos e os soforolipídeos (DESAI & BANAT, 1997; RON & ROSENBERG, 2001).

Os ramnolipídeos são os glicolipídeos mais estudados, sendo produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (FONTES, 2008). São formados por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β-hidroxidecanóico (KRONEMBERGER, 2007). A Figura 2 retrata o ramnolipídeo L-ramnosil-L-ramnosil-β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato.

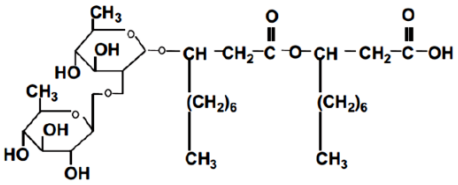


Figura 2. Estrutura do ramnolipídeo L-ramnosil-L-ramnosil-β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato. Fonte: Mulligan (2005).

2ª) <u>Lipopeptídeos e Lipoproteínas</u> - Englobam uma grande classe de biossurfactantes: os lipopeptídeos cíclicos, que se destacam pela sua ampla atividade biológica como antibióticos; os decapeptídeos (gramicidinas) e os lipopeptídeos (polimixinas), que apresentam atividade antiviral (MORIKAWA *et al.*, 2000). Além de apresentarem potencial antibiótico, os lipopeptídeos são particularmente interessantes por suas altas atividades superficiais, apresentando alta eficiência como tensoativo (AHIMOU *et al.*, 2000; FIECHTER, 1992). A surfactina (Figura 3) é um dos biossurfactantes mais conhecidos desta classificação (LANG, 2002).

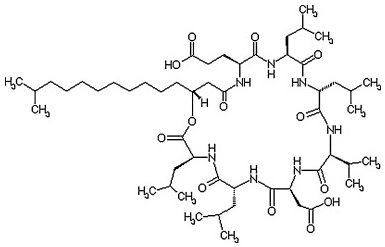


Figura 3. Estrutura da surfactina. Fonte: Da Silva *et al.* (2015).

3ª) <u>Ácidos graxos, Fosfolipídeos e Lipídeos neutros</u> – Os fosfolipídeos (ex.: Figura 4) fazem parte da estrutura de membranas celulares e são formados por uma molécula de glicerol ligada a duas moléculas de ácidos graxos através de uma ligação éster e por um grupamento fosfato, que pode apresentar diferentes constituintes (BEZERRA, 2012). Essas moléculas constituem uma classe de biossurfactantes sintetizada por microorganismos do tipo bactérias e leveduras que utilizam n-alcanos como fonte de carbono durante o crescimento (DESAI & BANAT, 1997). A produção

desses biossurfactantes é de grande interesse do ponto de vista científico, pois apresenta uma capacidade expressiva para formar microemulsões (CORDEIRO, 2006).

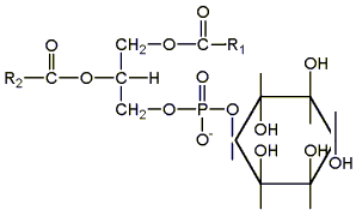


Figura 4. Estrutura do fosfolipídeo fosfatidilinositol. Fonte: Garcia (2010).

4ª) <u>Poliméricos</u> - São produtos constituídos por variados grupos químicos como, por exemplo, o Emulsan (Figura 5), no qual ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos; ou o Liposan, constituído por carboidratos e proteínas (DESAI & BANAT, 1997). Essa classe de biossurfactantes apresenta alta afinidade por interfaces óleo/água, facilitando a formação de emulsões estáveis, fazendo com que, mesmo em baixas concentrações, sejam alcançados elevados índices de emulsificação (BORGES, 2011).

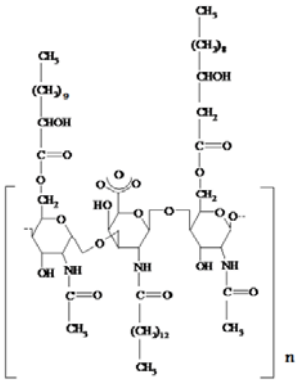


Figura 5. Estrutura do Emulsan. Fonte: Chamanrokh *et al.* (2012).

5ª) <u>Particulados</u> - De acordo com Nitschke e Pastore (2002), algumas células microbianas apresentam elevada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas por si só como biossurfactantes, como, por exemplo, microorganismos degradadores de hidrocarbonetos, dentre eles algumas espécies de *Cyanobacteria* e alguns patógenos, como *S. aureus* e *Serratia sp.* Bactérias como *Acinetobacter sp.* produzem vesículas extracelulares que têm função importante na captação de alcanos para a célula, possuindo elevada atividade surfactante.

A Tabela 1 relaciona os principais tipos de surfactantes conhecidos com suas respectivas espécies microbianas produtoras, levando em consideração sua classificação química.

Tabela 1. Principais classes de surfactantes e espécies microbianas produtoras.

Classe de Surfactante	Microorganismo
Glicolipídeos	*Pseudomonas aeruginosa*
Ramnolipídeos	*Candida bombicola, C. apicola*
Soforolipídeos	*C. antartica*
Manosileritritol	*Rhodococcus erithropolis*
Ésteres de trealose	*Arthobacter sp.*
Lipopeptídeos	
Surfactina/iturina/fengicina	*Bacillus subtilis*
Viscosina	*P. fluorescens*
Lichenisina	*B. Licheniformis*
Serravetina	*Serratia marqueses*
Fosfolipídeos	*Acinetobacter sp.* *Corynebacterium lepus*
Antibióticos com superfície ativa	
Gramicidina	*Brevibacterium breves*
Polymixina	*B. polymyxa*
Antibiótico TA	*Myxococcus xanthus*
Ácidos graxos/ Lipídeos neutros	
Ácidos corinomicólicos	*Corynebacterium insidibasseosum*
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	*Acinetobacter calcoaceticus*
Alasan	*A. radioresistens*
Liposan	*C. lipolytica*
Lipomanan	*C. tropicalis*
Biossurfactantes particulados	
Vesículas	*A. calcoaceticus*
Células microbianas	*Cyanobacteria*

Fonte: Muthusamy *et al.* (2008).

1.1.3. PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são produzidos principalmente durante o crescimento aeróbio ou na fase estacionária do desenvolvimento dos microorganismos, em meios de cultura contendo carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura destes como fonte de carbono (PIRÔLLO, 2006).

A produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida através da presença de compostos lipídicos, variações de pH, temperatura, aeração e agitação, ou ainda quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como em baixas concentrações de nitrogênio e condições de pH e temperatura diferentes das condições ótimas (ÚBEDA, 2004). Quando excretados no meio de cultivo durante o

crescimento microbiano, os biossurfactantes auxiliam no transporte e na transposição de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999).

1.1.4. FUNÇÃO FISIOLÓGICA DOS BIOSSURFACTANTES

As funções fisiológicas dos biossurfactantes ainda não foram completamente elucidadas, porém, algumas funções já têm sido atribuídas a eles, tais como (NITSCHKE & PASTORE, 2002):

– Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água: facilita o crescimento de microorganismos nestes substratos, porém, cepas de *Bacillus subtilis* produzem surfactantes apenas em substratos hidrossolúveis.

– Transporte de hidrocarbonetos: função atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *Candida tropicalis*, onde houve um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana quando o microorganismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido-graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos;

– Aderência-liberação da célula a superfícies: uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microorganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde ele possa se multiplicar. Nesta estratégia, as estruturas da superfície celular são consideradas elementos chaves, pois são as responsáveis pela aderência das células à própria superfície. Assim, os microorganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, com o objetivo de se aderir ou de se desligar de um determinado local, de acordo com sua necessidade, para encontrar novos *habitats* com maior disponibilidade de nutrientes ou simplesmente para se livrar de ambientes desfavoráveis;

– Atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente pelos da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios. Tanto os ramnolipídeos de *P. aeruginosa* quanto a surfactina, de *B. subtilis*, funcionam como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microorganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes.

1.1.5. APLICAÇÕES

As aplicações dos biossurfactantes estão diretamente relacionadas com as funções que estes apresentam. Por exemplo, os tensoativos que se adsorvem nas interfaces sólido/água e óleo/água são os melhores detergentes (MESQUITA, 2004). Alguns

estudos têm relatado que os surfactantes podem aumentar a desorção e disponibilidade de poluentes orgânicos aos microorganismos degradativos (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002). A Tabela 2, abaixo, relaciona as principais funções dos biossurfactantes com suas potenciais aplicações.

Tabela 2. Potenciais aplicações comerciais dos biossurfactantes.

FUNÇÃO	APLICAÇÃO
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, aditivos para óleo, biorremediação, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes umectantes	Indústria têxtil, tintas e fármacos
Detergentes	Produtos agrícolas e de limpeza
Agentes espumantes	Cosméticos, produtos de higiene e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Agentes sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos líquidos, recuperação de petróleo
Agentes redutores de viscosidade	Transporte de óleo cru através de tubulações
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: Nitschke e Pastore (2002).

A indústria petrolífera apresenta-se como um dos principais mercados com interesse na utilização dos biossurfactantes, porém, há outras áreas onde sua aplicabilidade mostra-se bastante promissora, como: agricultura, construção, indústrias alimentícias, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (REIS *et al.* 2013).

Os biossurfactantes são tão versáteis que o seu uso pode proporcionar vários benefícios ao mesmo tempo. De Araújo *et al.* (2013) estudaram o emprego de biossurfactantes como agentes inibidores da adesão de microorganismos na formação indesejada de biofilme nas indústrias alimentícias e constataram seus efeitos antimicrobianos, antibiofilmes e anticorrosivos simultâneos.

Balan *et al.* (2017) descobriram um novo biossurfactante lipopeptídico, o Aneurinifactin, produzido pela bactéria marinha *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-1, isolada do golfo de Mannar, com emulsificação estável na faixa de pH de 2 a 9 e até a temperatura de 80ºC, durante 24 horas. O Aneurinifactin revelou promissora atividade

antimicrobiana e eficiente recuperação de óleo, dependendo de sua concentração. Os autores concluíram que o biossurfactante estudado poderia ser explorado como um potencial candidato para uso em diversas aplicações biomédicas e químicas.

1.1.6. BIOSSURFACTANTES EM COSMÉTICOS

Devido a sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos, desempenhando um importante papel nas formulações cosméticas devido às suas diversas propriedades, como: molhamento, solubilização, emulsificação, capacidade de formar espuma, detergência, entre outras (FERREIRA *et al.*, 2017; NITSCKE & PASTORE, 2002).

A regulação 2006/257/CE da Comissão Européia determina que um surfactante tem como função diminuir a tensão superficial em cosméticos, assim como proporcionar distribuição uniforme do produto, quando este for aplicado (VECINO *et al.*, 2017). O mercado para beleza e higiene pessoal busca cada vez mais produtos que contém ingredientes naturais em suas formulações, visando a maior compatibilidade com a pele possível e, para atingir esse objetivo, estes produtos devem possuir origem biológica e não petroquímica (VECINO *et al.*, 2017).

Nas indústrias de cosméticos, os biossurfactantes apresentam grande potencial de aplicação, podendo servir como emulsificantes, agentes espumantes, solubilizantes, agentes umidificantes e de limpeza. Diversos produtos cosméticos e de higiene pessoal poderiam conter biossurfactantes na sua formulação, como, por exemplo: repelentes, xampus e condicionadores, soluções para lentes de contato, pastas de dente, cremes faciais, entre outros (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; PROMMACHAN, 2002).

Um produto comercial que continha 1 mol de soforolipídeos e 12 mols de propilenoglicol apresentou excelente compatibilidade dérmica, sendo utilizado como hidratante em cremes faciais (NITSCKE & PASTORE, 2002). Alguns soforolipídeos são utilizados como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem. A KAO Co. Ltda desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolipídeos, que posteriormente sofrem esterificação, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (DESAI & BANAT, 1997).

Ferreira *et al.* (2017) produziram biossurfactante por *Lactobacillus paracasei*, utilizando glicose e milhocina como matérias-primas, e avaliaram o seu potencial de uso, combinado a diferentes óleos essenciais e extrato antioxidante natural obtido de sementes de uva, no desenvolvimento de emulsões cosméticas. Os autores observaram

máxima porcentagem em volume de emulsão (EV = 100%) em emulsões O/A (3:1) com óleo de amêndoa, contendo 10 $g.L^{-1}$ do biossurfactante produzido e 5 $g.L^{-1}$ do extrato antioxidante, após 7 dias de produção. A partir desse resultado, os autores concluíram que o biossurfactante produzido poderia ser utilizado como um ingrediente natural em formulações cosméticas, desempenhando um importante papel como emulsificante.

1.2. TENSÃO SUPERFICIAL

1.2.1. DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES

As forças coesivas entre as moléculas no interior de um líquido são compartilhadas com as moléculas vizinhas ao seu redor, já as moléculas presentes na superfície não têm moléculas vizinhas acima delas e exibem uma força atrativa maior sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. A este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície se dá o nome de tensão superficial (HEWITT, 2002).

Na

Figura 6. Esquema das forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido., é apresentado um esquema ilustrando as forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido.

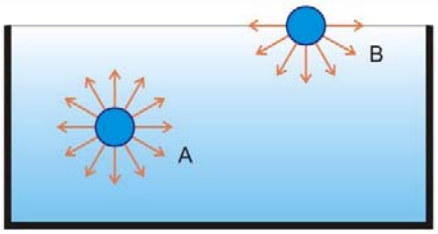


Figura 6. Esquema das forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido.
Fonte: Araújo (2013).

A adição de um soluto a um líquido altera a sua tensão superficial, tornando-a maior ou menor do que a tensão superficial do solvente puro. Quando o soluto se concentra na interface, a tensão superficial se torna menor, como é o caso dos agentes tensoativos ou surfactantes (FERREIRA, 2004).

A tensão superficial da água é muito forte, devido às ligações de hidrogênio intermoleculares, sendo responsável pela formação de gotas, borbulhas e meniscos. Nas interfaces água/óleo e ar/água, a tensão superficial pode ser facilmente medida utilizando-se um tensiômetro. Tanto os surfactantes sintéticos como os biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial da água (72 mN/m) para valores na faixa entre 47 e 27 mN/m e a tensão interfacial (tensão entre liquido polar e não polar), como

água em n-hexadecano, de 40 para 1 mN/m (MESQUITA, 2004; MULLIGAN, 2005). Portanto, a efetividade dos tensoativos está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (GOUVEIA *et al.*, 2003).

A Tabela 3 apresenta alguns surfactantes sintéticos comercialmente utilizados e seus respectivos valores de tensão superficial.

Tabela 3. Surfactantes sintéticos e respectivos valores de tensão superficial.

Surfactante	Tensão Superficial (mN/m)
Dodecil-sulfato de sódio (1%)	27,1
Sulfonato de petróleo (1%)	27,5
Spolene (1%)	28

Fonte: Banat (1995).

1.2.2. CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A tensão superficial está diretamente relacionada à concentração micelar crítica (CMC), um dos índices mais utilizados para avaliar a eficiência de um surfactante. A CMC é definida como a mínima concentração de surfactante requerida para que ocorra a máxima diminuição de tensão superficial e interfacial possível (MEIRA, 2007). Surfactantes eficientes possuem uma baixa CMC, isto é, menor quantidade de surfactante é necessária para o decréscimo da tensão superficial (MULLIGAN, 2005).

A determinação da CMC de um surfactante pode se dar através de mudanças bruscas no comportamento de algumas de suas propriedades físicas em solução, tais como: espalhamento de luz, viscosidade, condutividade elétrica, tensão superficial, pressão osmótica e capacidade de solubilização de solutos. Determinar a CMC de um surfactante é de fundamental importância para quaisquer processos envolvendo tensoativos, pois o efeito desses compostos é maior quando uma quantidade significante de micelas encontra-se presente (SANTOS *et al.*, 2007).

A CMC varia na solução aquosa em função da estrutura do tensoativo, temperatura da solução, pH, presença de eletrólitos e compostos orgânicos. O tamanho da fração apolar da molécula de tensoativo é um fator importante e geralmente a CMC decresce com o aumento da hidrofobicidade da molécula, ou seja, quanto maior a cadeia carbônica da fração apolar do tensoativo, maior a tendência das moléculas de se adsorverem entre a interface ar/água, diminuindo a tensão superficial da solução ainda mais (MESQUITA, 2004). A combinação destas propriedades distintas confere à molécula de biossurfactante características únicas na dissolução aquosa, permitindo a formação de emulsões (VALPUESTA, 2008).

A partir da CMC, os surfactantes se associam em estruturas como micelas, vesículas ou lamelas (Figura 7), e não ocorrerá maior redução na tensão superficial ou interfacial (DESAI & BANAT, 1997; MAIER, 2003).

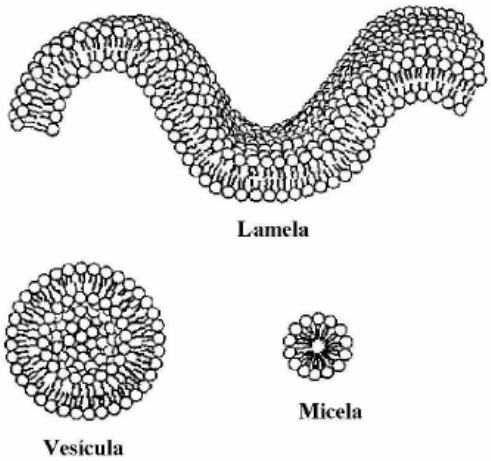


Figura 7. Estruturas básicas formadas por biossurfactantes a partir da CMC.
Fonte: Champion *et al*. (1995).

1.2.3. MICELAS

As micelas são agregados moleculares de surfactantes, com regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, que dinâmica e espontaneamente se associam em solução aquosa, a partir da CMC. Elas constituem a configuração das moléculas com melhor estabilidade em solução, formando cadeias hidrofóbicas agrupadas, e sua porção hidrofílica se direciona voltada para a água. Em concentrações acima da CMC, as micelas possuem um diâmetro entre 3 e 6 mm, o que representa uma quantidade de 30 a 200 moléculas de surfactante em cada uma (BARROS, 2007; VALPUESTA, 2008). A Figura 8 ilustra a estrutura de uma micela, onde se pode observar a porção polar do surfactante voltada para a fase aquosa e a porção apolar emulsionando a fase orgânica.

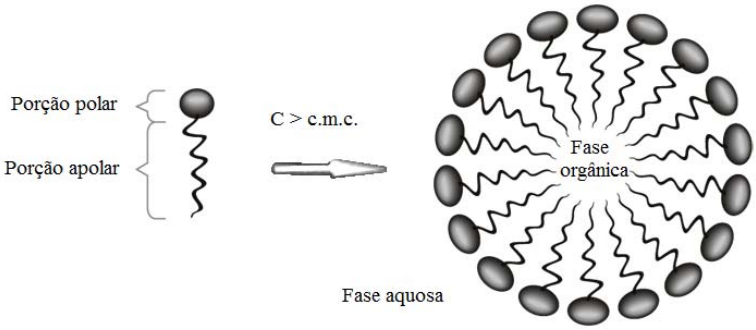


Figura 8. Esquema de formação de uma micela esférica a partir da CMC.
Adaptada de: Gusev *et al.* (2009).

As micelas não são estáticas, coexistindo em um equilíbrio dinâmico, mas são termodinamicamente estáveis e facilmente reprodutíveis, sendo destruídas por diluição

em água quando a concentração do tensoativo ficar abaixo da CMC (MANIASSO, 2001). Nesta condição, o tensoativo se encontra predominantemente na forma de monômeros de surfactante; porém, quando a concentração está próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas (VALPUESTA, 2008).

1.2.4. MECANISMO DE AÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Numa solução em que a concentração de tensoativo é baixa, as moléculas existem na forma de monômeros; conforme a concentração do tensoativo aumenta, os monômeros começam a saturar a interface e, assim, a interação desfavorável entre a fração apolar e as moléculas de água aumenta, provocando a agregação dos monômeros, até que se inicie a formação de micelas (LIN, 1996; MESQUITA, 2004). Este comportamento dos monômeros de tensoativo é ilustrado na Figura 9.

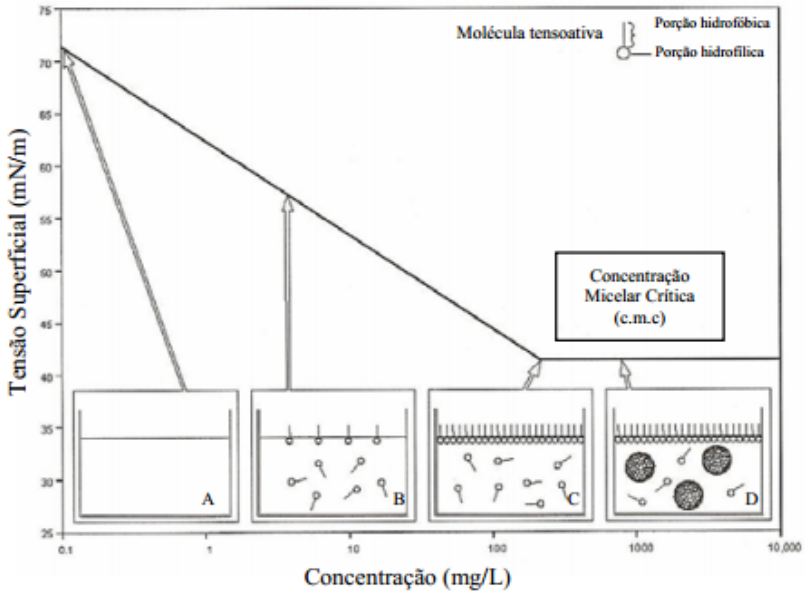


Figura 9 - Esquema didático para tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante. Fonte: Santos *et al.* (2007).

Pode-se observar na Figura 9 a diminuição da tensão superficial de acordo com aumento na concentração de surfactante (situação B). Quando a superfície da água se encontra totalmente coberta com o surfactante, tem-se a saturação do meio e as moléculas começam a se agregar, dando início à formação de micelas. Nesta concentração de monômeros, atinge-se a CMC e a tensão superficial do fluido passa a ser, então, constante (SANTOS *et al.*, 2007). Porém, em concentrações acima da CMC, o surfactante é capaz de aumentar a solubilidade de compostos orgânicos cuja solubilidade em água é baixa, uma vez que o composto orgânico é incorporado no interior da micela (Figura 10) (MESQUITA, 2004; MULLIGAN, 2005).

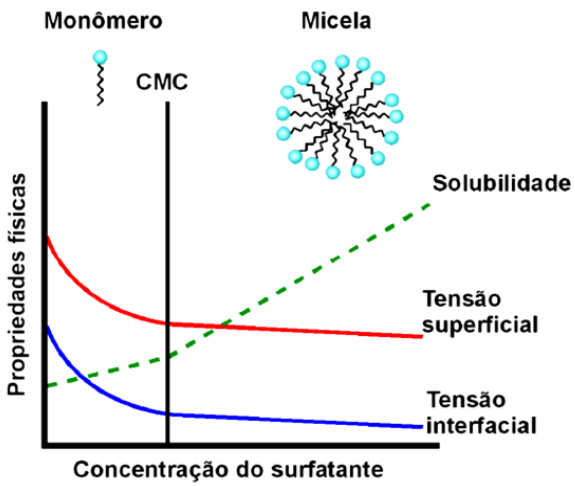


Figura 10. Esquema didático para tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante. Fonte: Cara (2009).

1.3. EMULSÕES

1.3.1. DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES

Uma emulsão é um sistema com duas ou mais fases, compostas por uma dispersão coloidal, onde a fase dispersa é composta de pequenos glóbulos de líquido distribuídos em uma outra fase de composição distinta, na qual estes glóbulos são imiscíveis (ALLEN *et al.*, 2007; SCHRAMM, 2006).

Nas emulsões, a fase dispersa é a fase interna e a fase dispersante é a fase externa (ou contínua). De acordo com a natureza da fase dispersante, as emulsões podem ser classificadas em: emulsão água em óleo (A/O), que contém água como fase dispersa sob a forma de pequenas gotículas (> 0,1 mm) na fase oleosa; e óleo em água (O/A), em que a emulsão é composta pela dispersão de material oleoso/graxo na fase aquosa (ALLEN *et al.*, 2007; PIANOVSKI *et al.*, 2008; SCHRAMM, 2006). Emulsões O/A são mais úteis como bases laváveis em água, enquanto emulsões A/O são emolientes e servem para limpeza (AULTON, 2005). A Figura 11 mostra a representação das emulsões tipo O/A e A/O.

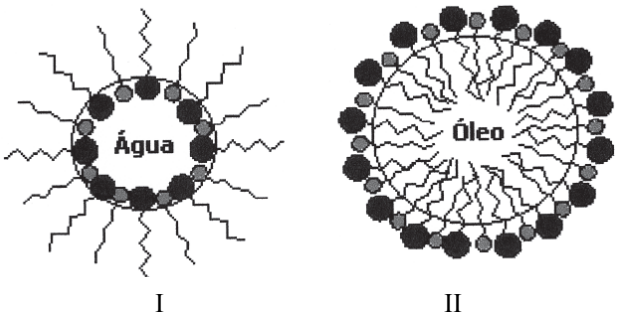


Figura 11. Esquema representativo de uma emulsão óleo em água (I) e de uma emulsão água em óleo (II). Adaptado de: De Oliveira *et al*. (2004).

Além desses dois tipos principais de emulsões (O/A e A/O), existem sistemas de emulsões mais complexos. Por exemplo, uma gotícula de óleo envolvendo uma gotícula de água pode ser suspensa em água para formar uma emulsão água-em-óleo-em-água (A/O/A) (Figura 12). Tais sistemas ou seus correspondentes (O/A/O) são chamados de emulsões múltiplas (AULTON, 2005).

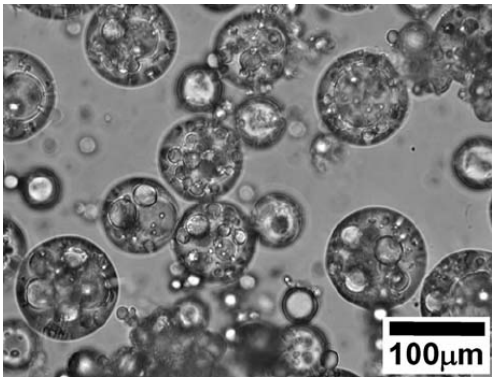


Figura 12. Microscopia óptica de uma emulsão múltipla (A/O/A). Fonte: Lim *et al.* (2013).

1.3.2. MECANISMO DE FORMAÇÃO DE EMULSÃO

A emulsificação é o principal mecanismo de formação de emulsões e permite o preparo de misturas homogêneas e relativamente estáveis de dois líquidos imiscíveis entre si, sendo responsável por manter as duas fases imiscícveis em suspensão uma na outra (FRANGE & GARCIA, 2009; THOMPSON, 2006). A emulsificação pode ser obtida a partir da aplicação de energia mecânica (como agitação ou homogeneização) a um sistema contendo um agente emulsificante, localizado na interface óleo/água, para formar pequenas gotículas e criar uma barreira física e/ou eletrostática em torno destas gotículas, prevenindo a sua coalescência (THOMPSON, 2006).

Os biossurfactantes atuam como agentes estabilizadores de emulsão na medida em que promovem a dispersão entre duas fases inicialmente imiscíveis. Quando dois

líquidos imiscíveis são colocados em contato, a tendência natural é a sua separação completa, a menos que seja aplicada uma força mecânica para dispersar um líquido no outro na forma de partículas finitas. Quando a força mecânica é removida, os dois líquidos puros tendem a separar-se, podendo esta separação demorar intervalos variáveis de tempo, desde poucos segundos a vários anos (GARCIA, 2008).

A Figura 13 ilustra o mecanismo de formação de uma emulsão a partir da adição de energia mecânica e de um biossurfactante a um sistema contendo água e hidrocarboneto. As moléculas de biossurfactante aderem à superfície das moléculas do hidrocarboneto, emulsionando-as e permitindo a dispersão da fase apolar na fase polar.

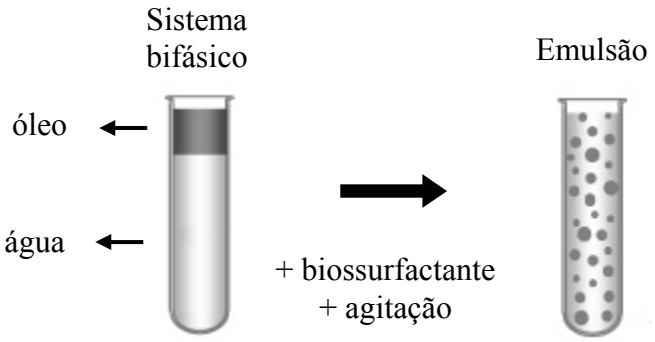


Figura 13. Esquema de formação de emulsão.
Fonte: Adaptado de Weiss *et al*. (2006).

1.3.3. ESTABILIDADE DE EMULSÕES

O termo "estabilidade" refere-se à habilidade que uma emulsão possui de resistir às modificações ou perdas de suas propriedades ao longo do tempo. Ou seja, quanto mais estável uma emulsão, mais lentas serão as mudanças sofridas por ela. (McCLEMENTES, 1999).

Presume-se que a estabilidade das emulsões dependa do tipo de agente emulsionante utilizado e das características físicas da camada interfacial formada. Esta camada deve ser rígida e compacta, possuir certo grau de elasticidade superficial e não deve romper-se quando pressionada pelas gotículas. Todavia, caso o rompimento venha a ocorrer, essa película deve ser capaz de formar-se rapidamente, impedindo a aproximação e consequente junção da fase dispersa (GENNARO, 1999; PRISTA *et al*., 1995).

A estabilidade das emulsões O/A pode ser obtida pela otimização da mistura de emulsificantes hidrofílicos e lipofílicos. A similaridade estrutural dos agentes emulsificantes com a fase dispersa é essencial para a estabilidade da emulsão; e a

estabilidade pode ser favorecida pelo complexo formado tanto entre o agente de viscosidade hidrofílico e tensoativo hidrofílico quanto pela interação do tensoativo hidrofílico com a fase oleosa (GULLAPALLI & SHETH, 1999). Os dois principais fatores que influenciam na estabilidade de emulsões estão enumerados abaixo:

1.3.3.1. AGENTES EMULSIFICANTES

Os agentes emulsificantes são capazes de formar entre si complexos interfaciais na superfície dos glóbulos dispersos. Esses complexos promovem a formação e a estabilização da emulsão, pois diminuem a tensão interfacial mais acentuadamente do que quando se emprega um só agente emulsionante, além de originarem uma película compacta e flexível na interface (FRANGE & GARCIA, 2009). Se o filme interfacial for eletricamente carregado, as forças repulsivas contribuirão para estabilidade do sistema, em consequência da formação da dupla camada elétrica (AULTON, 2005).

Por vezes, um único agente emulsionante é capaz de originar o tipo de emulsão desejada. No entanto, emulsões mais estáveis são preparadas quando se utilizam misturas de emulsionantes, sendo um para a formação de emulsões O/A e outro para a formação de emulsões A/O (GULLAPALLI & SHETH, 1999; PRISTA *et al*., 1995). Postula-se que os agentes emulsivos hidrofílicos e lipofílicos se alinham um ao lado do outro, conferindo maior rigidez e resistência ao filme emulsivo, através de ligações de hidrogênio (FOX, 1986).

Os agentes emulsificantes, com propriedade de diminuir a tensão interfacial entre o óleo e a água, têm papel fundamental na estabilização de emulsões. Entretanto, estes compostos não conseguem diminuir a tensão interfacial a ponto de contrariar totalmente a energia livre de superfície provocada pelo aumento da área interfacial. Desta forma, as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e, no desenvolvimento tecnológico, procura-se utilizar de meios que possam retardar pelo maior tempo possível a separação das fases (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

1.3.3.2. TAMANHO DE MICELA

A distribuição de tamanho de micela é uma propriedade muito importante na caracterização de emulsões e que depende tanto da velocidade de agitação do fluido quanto do tipo e quantidade de emulsificante utilizado (PETSEV, 2002). Quanto maior o tamanho das micelas, maior será a tensão interfacial entre a água e o óleo, ou seja, menos estável será a emulsão (CAENN *et al*, 2011).

O tamanho das micelas presentes na emulsão é capaz de provocar mudanças nos parâmetros reológicos do fluido. Normalmente, quando o tamanho das micelas diminui, há também uma redução na distribuição de tamanho das micelas (PETSEV, 2002).

As micelas de diferentes tamanhos (sistema polidisperso) tendem a obter um melhor empacotamento, resultando em uma diminuição na viscosidade do fluido. Além disso, micelas menores tendem a se comportar como partículas sólidas dentro da fase dispersa, provocando assim um aumento de viscosidade (PETSEV, 2002). Esse aumento de viscosidade é resultante de vários fatores, dentre os quais está o baixo empacotamento entre micelas de mesmo tamanho (sistema monodisperso), como pode ser mostrado na Figura 14.

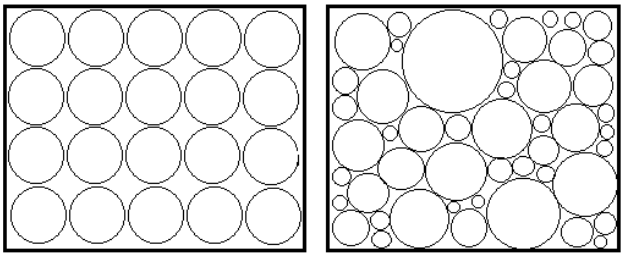


Figura 14. Formas de empacotamento para emulsão monodispersa e polidispersa, respectivamente. Fonte: Azevedo (2016).

Dentre os diversos métodos para determinação do tamanho de micelas, assim como de sua distribuição de tamanho, pode-se citar: microscopia, centrifugação, sedimentação, turbidimetria, espalhamento de luz, espectroscopia ultrassônica, entre outros (SCHRAMM, 2006).

Chanamai e McClements (2000) avaliaram a influência do tamanho das micelas na reologia de emulsões monodispersas de óleo em água e concluíram que, para a mesma concentração e tensão de cisalhamento, a viscosidade aparente de emulsões concentradas é maior para aquelas que possuem um menor tamanho de micela.

Klink *et al*. (2011) realizaram um balanço populacional para avaliar o efeito da distribuição do tamanho de micela inicial em uma emulsão e sua evolução ao longo do tempo. Como um dos resultados, obtiveram que, quando a fração numérica de micelas maiores na distribuição aumenta, a taxa de coalescência também aumenta.

1.3.4. DESESTABILIZAÇÃO DE EMULSÃO

Os processos de quebra de emulsão são bastante complexos porque envolvem conceitos difíceis de serem analisados, como os fenômenos de superfície. Além disso, esses processos podem ocorrer simultaneamente, dificultando a sua análise individual

(TADROS, 2013). À medida que as emulsões se tornam instáveis, suas características físico-químicas variam. Assim, para verificar tais variações, pode-se determinar o valor do pH, viscosidade, a distribuição de tamanho de partícula, potencial Zeta, entre outros (ANVISA, 2004).

Diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos podem desencadear esses processos de instabilidade, como: composição da formulação, tipo do tensoativo utilizado, tamanho dos glóbulos, viscosidade, volume de fases, valor de pH, presença de eletrólitos, propriedades do filme interfacial formado, processo de fabricação e velocidade de agitação (LIMA *et al*., 2008).

A perda da estabilidade de uma emulsão pode se manifestar das seguintes formas (Figura 15):

Floculação - onde a força de repulsão entre as moléculas é diminuída e estas se associam de maneira fraca e reversível por agitação (SILVA & SOARES, 1996);

Coalescência - caracterizada por uma larga distribuição de tamanho das gotículas, resultando na separação de fases de forma visível a olho nu (SILVA & SOARES, 1996);

Creaming - onde a fase dispersa, conforme sua densidade relativa à fase contínua, sobe até à superfície ou desce até o fundo da emulsão, formando uma camada de emulsão mais concentrada (AULTON, 2005; LIEBERMAN *et al.*, 1989);

Amadurecimento de Ostwald - onde as partículas maiores crescem de tamanho devido à dissolução das partículas menores (WELIN-BERGER & BERGENSTÅHL, 2000). Na teoria, uma emulsão perfeitamente monodispersa não apresenta maturação de Ostwald (PHILLLIPS & WILLIAMS, 2009).

Inversão de fase - onde existirá uma mudança entre a fase dispersa e o meio. Por exemplo, uma emulsão de O/A pode, com o tempo ou por mudanças de condições, inverter para uma emulsão de A/O (TADROS, 2013).

De acordo com Silva *et al*. (2010) e Trindade *et al*. (2008), a degradação física das emulsões é devido à tendência espontânea para a redução da energia livre de Gibbs, obtida através da redução do tamanho da interface óleo/água e/ou da tensão interfacial entre o contínuo e as fases dispersas. As micelas de óleo são estabilizadas contra a floculação e a coalescência devido ao forte efeito de barreira estérica resultante de blocos de polissacáridos que se projetam a partir da superfície de micelas para a fase de emulsão contínua, onde são ancorados através do agrupamento lipídico e hidrofóbico do biossurfactante (DICKINSON, 2003).

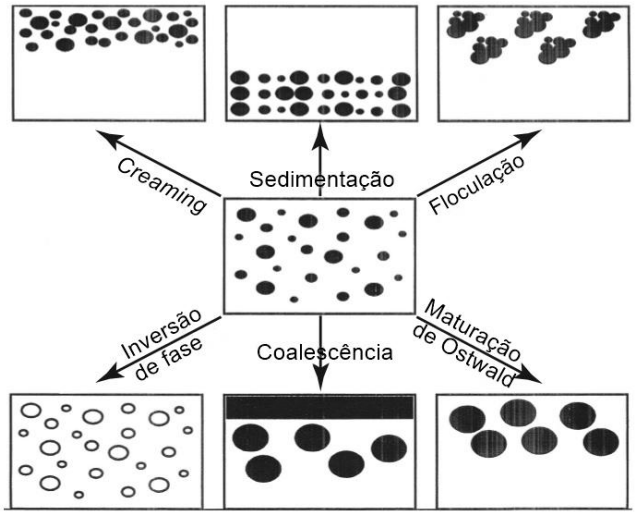


Figura 15. Processos de quebra de emulsão. Fonte: Azevedo (2016).

1.3.5. APLICAÇÕES

As áreas de aplicação das emulsões são vastas, sendo estas muito utilizadas em cosméticos, para aplicação tópica, assim como em preparações farmacêuticas administradas por diferentes vias de administração (PIANOVSKI *et al.*, 2008). Geralmente, as emulsões cosméticas são empregadas de duas formas principais:

Creme

Cremes tem forma consistente, emulsionada, e são de uso hidratante ou nutritivo para peles oleosa, normal ou seca. São formados por uma emulsão que contém um ou mais princípios ativos dissolvidos ou dispersos em uma base apropriada e são utilizados, normalmente, para aplicação tópica na pele ou nas membranas mucosas (ANVISA, 2010). Dependendo das substâncias utilizadas em sua formulação, os cremes podem destinar-se à limpeza, hidratação ou nutrição (REBELLO & BEZERRA, 2001).

As composições dos cremes são constituídas por um ou mais corpos gordurosos emulsionados com água e possuem uma consistência relativamente fluída, formulada com uma emulsão A/O ou O/A (FONSECA & PRISTA, 2000).

Recentemente, o termo “creme” tem sido utilizado em um sentido mais restrito, referindo-se apenas a emulsões O/A ou a dispersões aquosas microcristalinas de ácidos ou alcoóis graxos de cadeia longa, removíveis por água e com características cosméticas e estéticas mais aceitáveis (THOMPSON, 2006).

Gel-creme

Os géis são definidos como sistemas semissólidos constituídos por dispersões de pequenas partículas inorgânicas ou de grandes moléculas orgânicas, interpenetradas por um líquido (ALLEN *et al*., 2007).

Os géis oleosos possuem a mesma característica de um óleo, porém, deixam um filme mais denso sobre a pele e possibilitam a repelência da água. Os géis aquosos são fáceis de aplicar e deixam um filme seco e transparente sobre a pele. Gel creme é uma emulsão que contem alta porcentagem de fase aquosa e baixíssimo conteúdo oleoso (CHORILLI *et al*., 2006).

Pianovski *et al.* (2008), utilizaram o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) na formulação de emulsões cosméticas, vislumbrando a sua aplicabilidade para a cadeia produtiva de produtos naturais e desenvolvimento sustentável.

1.4. *YARROWIA LIPOLYTICA*

A levedura *Yarrowia lipolytica* é um fungo hemiascomiceto estritamente aeróbio, eucariótico e dimórfico, pertencente à família Dipodascaceae. É um microorganismo de grande potencial para aplicação biotecnológica e, pela sua capacidade de metabolizar hidrocarbonetos e lipídeos, pela sua não patogenicidade e pelo seu dimorfismo, é a espécie de levedura não convencional mais estudada nos últimos anos (BANKAR *et al.*, 2009; BARTH & GAILLARDIN, 1996; BOUCHEDJA *et al.*, 2017; DUTRA, 2010).

1.4.1. HABITAT

A levedura *Y. lipolytica* é uma espécie prontamente encontrada na natureza e que tem significativo valor industrial (KURTZMAN *et al.*, 2011). Como particularidade, *Y. lipolytica* é uma levedura oleaginosa, capaz de crescer em uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e de acumular lipídeos intracelularmente até 40% do seu peso seco (BEOPOULOS *et al.*, 2011).

De acordo com a teoria da evolução, acredita-se que alguns microorganismos que vivem em meios aquosos onde a fonte de carbono é hidrofóbica, encontrando-se dispersa no meio sob a forma de gotas, tenham sofrido mutação e desenvolvido mecanismos para facilitar o acesso a esse substrato (BARBOSA, 2011). Portanto, pode-se associar capacidade de *Y. lipolytica* de metabolizar substratos hidrofóbicos com o seu *habitat*, onde a mesma possui como nicho substratos ricos em lipídeos e proteínas. Entretanto, algumas espécies têm sido isoladas do solo, rede de tratamento de esgotos e

ambientes contaminados com óleo, como a Baía de Guanabara (AMARAL *et al.*, 2006; BARTH & GAILLARDIN, 1996).

1.4.2. METABOLISMO

A levedura *Y. lipolytica* é capaz de transportar eficientemente tanto alcanos quanto lipídeos para dentro de suas células e degradá-los (BARTH & GAILLARDIN, 1996). Por isso, a gama de substratos utilizados por *Y. lipolytica* é vasta e inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose) (BARBOSA, 2011).

Entre os substratos menos convencionais, estão os extratos de plantas, como os óleos de amêndoa, avelã e coentro, estudados por Krzyczkowska & Kozłowska (2017). No referido trabalho, os autores encontraram resultados promissores para o óleo de amêndoa, avaliando-o como um bom indutor da síntese extracelular de lipases por *Y. lipolytica*, atingindo 2,3 $U.mL^{-1}$ após 48 h de incubação. Assim, os autores constataram que os extratos de plantas podem ser utilizados como substratos de baixo custo para o crescimento da levedura.

Para explicar o transporte dos substratos hidrofóbicos para dentro da célula, duas hipóteses têm sido formuladas: a produção de biossurfactantes e a outra é a interação dos substratos com a superfície celular da levedura, na qual há um aumento nas propriedades apolares, tornando-as mais hidrofóbicas. O contato direto entre as gotas de óleo e as células parece ser o mecanismo pelo qual a maior parte do substrato é transportada. Desta forma, a assimilação de substratos hidrofóbicos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante. No caso de adsorção direta, muitos mecanismos podem estar envolvidos, como interações hidrofóbicas, interações de Lewis (ácido ou base), interações eletrostáticas ou de Van der Waals (KIM *et al*., 2000).

Y. lipolytica é um microorganismo com potencial de produção de diversos compostos (TEZAKI *et al.*, 2017), como poliálcoois, carotenóides, surfactantes, alcanos e ácidos orgânicos, incluindo intermediários do ciclo de Krebs, como ácido succínico, cítrico e isotrítrico (LEDESMA-AMARO & NICAUD, 2016; SABRA *et al.*, 2017). Além disso, excreta várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (NICAUD *et al.*, 2002).

Estudos recentes demonstraram que *Y. lipolytica* é capaz ainda de sintetizar dois compostos ao mesmo tempo. Xiaoyan *et al*. (2017), estudaram a produção concomitante

de dois importantes metabólitos por *Y. lipolytica*, o eritritol e a lipase, a partir de resíduo de óleo de cozinha, com o intuito de obter um processo de produção de baixo custo. A máxima concentração de eritritol obtida após 72h foi de 22,1 $g.L^{-1}$ e a atividade de lipase atingiu o seu máximo (12.7 $U.mL^{-1}$) após 24 h de incubação. A partir desses resultados, os autores deduziram que a estratégia de produção é factível.

Além da grande gama de substratos que é capaz de utilizar e dos diversos compostos químicos de grande interesse industrial que produz, a levedura *Y. lipolytica* possui vigoroso crescimento em diferentes valores de pH e é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura, que se estende de 5 a 32ºC (FICKERS *et al.*, 2005), embora apresente crescimento ótimo a 28ºC (FONTES, 2008).

1.4.3. DIMORFISMO

Outra característica peculiar de *Y. lipolytica* é o seu dimorfismo, que lhe confere a habilidade de migrar entre as formas de levedura, pseudo-hifa (cadeia de células alongadas com constrições visíveis posicionando o septo) e hifa (filamentos lineares sem constrições visíveis) (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2000; DUTRA, 2010).

De acordo com a literatura, a transição de levedura para hifa está associada ao crescimento unipolar, à divisão assimétrica, a grandes vacúolos fortemente polarizados localmente e à repressão de separação de células após a divisão. Acredita-se que o dimorfismo da levedura está relacionado a um mecanismo de defesa para condições adversas, tais como a temperatura e as alterações nutricionais. A Figura 16 ilustra a morfologia microscópica da *Y. lipolytica*, aonde é possível observar as células na forma de leveduras e também algumas hifas e pseudo-hifas (COELHO *et al.*, 2010).

Figura 16. Morfologia microscópica de *Y. lipolytica*. Fonte: Nunes (2011).

1.4.4. GÊNERO YARROWIA

A levedura *Y. lipolytica* difere, em diversos fatores, das leveduras convencionais, como *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Porém, apresenta similaridades no que diz respeito a sua evolução filogenética, fisiologia, genética e biologia molecular com a *Candida albicans* (DUJON *et al*., 2004). Essas semelhanças fizeram com que, inicialmente, *Y. lipolytica* fosse também denominada como *Candida lipolytica*, porém, algumas diferenças entre as duas espécies levaram os microbiologistas a separar o gênero *Yarrowia*, que possui atualmente *Y. lipolytica* como seu único membro (VAN DER WALT & VAN ARX, 1980, apud GROENEWALD *et al*., 2014). Isto se deve ao fato que, contrariamente a *C. albicans*, *Y. lipolytica* é um microorganismo não-patogênico e apresenta o ciclo celular bem definido. Essa última característica lhe permite fácil manipulação gênica, o que proporcionou um rápido progresso das pesquisas com essa levedura nos últimos anos (BACCIOTTI, 2015).

1.4.5. POTENCIAIS DE APLICAÇÃO

Os potenciais de aplicação de *Y. lipolytica* são vastos e ainda estão em desenvolvimento (GROENEVALD *et al*., 2014). Alguns trabalhos na literatura já utilizaram a *Y. lipolytica* para: produção em massa de biocombustíveis (BANKAR *et al*., 2009); lipase (XIAOYAN *et al*., 2017); produção de ácido gama linolênico (SUN *et al*., 2017); produção de ácido cítrico (DA SILVA, 2014); recuperação de sabor e atributos sensoriais de queijo Tettila (CENTENO *et al*., 2017); produção de eritritol (DO NASCIMENTO, 2016), entre outros.

1.4.6. *Y. LIPOLYTICA* COMO PRODUTORA DE BIOSSURFACTANTE

A levedura *Y. lipolytica* é considerada um microorganismo não patogênico e diversos processos baseados nesta levedura foram classificados com status GRAS (*generally recognized as safe*) pela Food and Drug Administration (FDA), EUA, permitindo que a mesma seja empregada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Isto representa uma grande vantagem do ponto de vista biotecnológico, pois, em geral, a grande maioria dos metabólitos sintetizados por bactérias não é adequada para a utilização nessas indústrias devido a sua possível natureza patogênica (BARTH & GAILLARDIN, 1997; FONTES, 2008).

Nas últimas décadas, houve um aumento no interesse em identificar e isolar novos microorganismos produtores de moléculas tensoativas, que exibem características

surfactantes, como baixa CMC, baixa toxicidade, alta atividade de emulsificação, entre outras (FONTES *et al*., 2008).

Um biossurfactante foi isolado por Amaral *et al*. (2006), denominado Yansan. Este biossurfactante foi secretado durante crescimento de *Y. lipolytica* em meio contendo glicose como fonte de carbono e apresentou alta atividade de emulsificação, mostrando que a produção de biossurfactante é possível em meios hidrofílicos.

Souza *et al*. (2012) produziram biossurfactante a partir da *Y. lipolytica* em água marinha, utilizando óleo diesel como fonte de carbono, evidenciando a capacidade desta levedura de crescer em meios salubres.

Fontes *et al*. (2012) estudaram a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* utilizando glicerol bruto e suco de caju clarificado como fontes de carbono, obtendo melhores resultados para o biossurfactante produzido a partir do meio de cultivo hidrofóbico.

A produção de biossurfactante por *C. lipolytica* em meio de cultivo contendo gordura animal (5%) e milhocina (2,5%) foi estudada por Santos *et al*. (2017). Através de um biorreator de 50L, os autores obtiveram uma elevada produção de biossurfactante (40 $g.L^{-1}$) e concluíram que o mesmo foi capaz de ocasionar uma redução na tensão superficial de 25 mN/m, além de apresentar baixa toxicidade e potencial para aplicação como agente de biorremediação.

1.5. FONTES DE CARBONO DE ORIGEM RENOVÁVEL

1.5.1. GLICEROL BRUTO COMO FONTE DE CARBONO

1.5.1.1. DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES

O glicerol (Figura 17), de nomenclatura (IUPAC) 1,2,3-propanotriol e fórmula química $C_3H_8O_3$, é um poliálcool que se apresenta como um líquido bastante viscoso, inodoro, higroscópico e de sabor levemente adocicado (KIRK-OTHMER, 2007; ZAVARIZE, 2012). Este poliálcool contém 3 grupos hidroxílicos hidrófilos, responsáveis pela sua solubilidade em água e álcool, sendo insolúvel em éter e em clorofórmio (QUISPE *et al*., 2013). Na sua forma bruta, o glicerol apresenta-se na cor pardo escuro, contendo quantidades variáveis de sabão, metanol ou etanol, mono, di ou triglicerídeos, oligômeros de glicerol, polímeros e água (OOI *et al*., 2004).

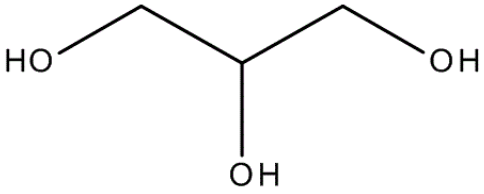


Figura 17 - Estrutura molecular do glicerol.
Fonte: Merck (2017).

O glicerol foi acidentalmente descoberto pelo químico sueco Carl W. Scheele em 1779, durante o processo de saponificação de azeite de oliva, e hoje sabe-se que o mesmo é um composto químico encontrado na própria natureza, em vegetais (soja, mamona, babaçu e girassol), animais, e também em formas combinadas de glicerina com alguns ácidos graxos (ARRUDA *et al*., 2007; THOMPSON & HE, 2006).

No sistema metabólico dos microorganismos, o glicerol é considerado fundamental como precursor de vários compostos e como regulador de diferentes mecanismos bioquímicos intracelulares (SIQUEIRA, 2015). Em microorganismos eucariotos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos (WANG *et al*., 2001). Nos seres humanos, o glicerol participa na termorregulação do corpo, na resistência às altas temperaturas, na resistência dos músculos em atividades físicas e na resposta neural da variação da glicemia (YANG *et al*., 2009). A Tabela 4 apresenta algumas propriedades do glicerol bruto.

Tabela 4. Algumas propriedades do glicerol.

PROPIEDADES	**UNIDADES**	**MORRISON (2000)**	**PAGLIARO-ROSSI *et al.* (2006)**	**OECD SIDS (2002)**
Fórmula Química		-	$C_3H_5(OH)_3$	$C_3H_8O_3$
Massa Molar	g/mol	92.09	92.09382	92
Densidade	kg/m^3	1260	1261	1260
Viscosidade	Pa.s	1,41	1,5	1,41
Ponto de fusão	ºC	18	18,2	18
Ponto de inflamação	ºC	177	160	160
Ponto de ebulição	ºC	290	290	290
Tensão superficial	mN/m	63,4	64	63,4

Fonte: QUISPE (2013).

O glicerol bruto, derivado da reação de transesterificação do biodiesel, possui baixo teor de pureza, o que lhe confere um baixo valor agregado. Sua composição contém um grande volume de ácidos graxos saponificados, catalisador e água derivada

do processo de transesterificação do biodiesel e varia largamente em função do processo de transesterificação e da eficiência da separação do biodiesel (FONTES, 2008; VAN GERPEN, 2002). A Tabela 5 apresenta a composição do glicerol bruto através de valores médios observados em 16 usinas produtoras de biodiesel no Brasil.

Tabela 5. Composição do glicerol bruto.

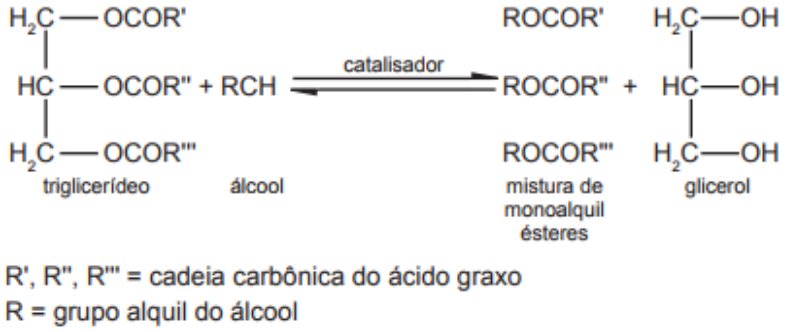
Parâmetro	Média
Glicerol (%)	74,4
Umidade (%)	9,7
Lipídios totais (%)	7,8
Cinzas (%)	5,3
Sódio ($g.kg^{-1}$)	20,8
Fósforo ($mg.kg^{-1}$)	541,0
Cálcio ($mg.kg^{-1}$)	36,2
pH	7,2

Fonte: Oliveira *et al*. (2013).

1.5.1.2. GLICEROL COMO SUBPRODUTO DO BIODIESEL

Biodiesel é definido como éster de ácidos graxos de cadeia longa (monoéster alquílico), derivado de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gorduras animais (MEHER *et al*., 2004). Na produção de biodiesel pelas indústrias petroquímicas, aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol, principal componente do glicerol bruto e importante subproduto gerado no processo de transesterificação do biodiesel (DASARI *et al*., 2005).

A transesterificação do biodiesel



(

Figura 18) consiste na reação de um triglicerídeo (óleo vegetal ou gordura animal) com um álcool de cadeia curta (metílico ou etílico) na presença de um catalisador (hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio) para acelerar o processo (PRATES *et al*., 2007). Como resultado, obtêm-se ésteres de ácidos graxos metílicos ou etílicos (biodiesel) e glicerol bruto (PINTO *et al*., 2005).

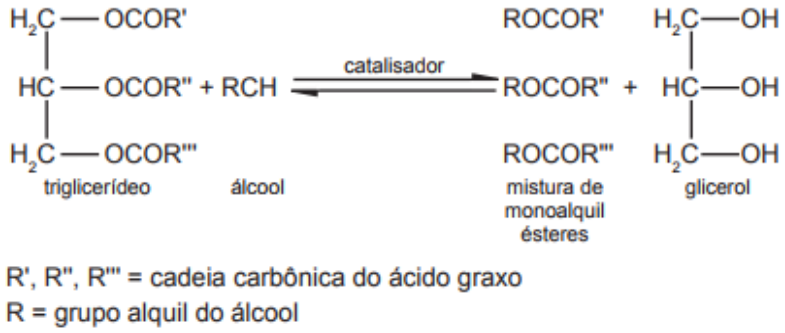


Figura 18. Reação de transesterificação de triglicerídeos com álcool.
Fonte: Jardine *et al.* (2009).

O glicerol oriundo da reação de transesterificação do biodiesel apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual. Estas impurezas culminam por conferir ao glicerol bruto baixa aplicabilidade no mercado e, consequentemente, pequena absorção pelas indústrias, resultando no descarte incorreto deste resíduo, que geralmente é feito nos rios ou córregos ou ainda, em um caso mais extremo, até mesmo através da queima deste subproduto (ZAVARIZE *et al*., 2012). Além da poluição gerada com a fumaça, estudos anteriores demonstraram que a queima do glicerol bruto produz acloreína, um composto químico cancerígeno, bem como o descarte incorreto do glicerol bruto pode gerar futuros problemas ambientais (DUARTE, 2011).

A produção do biodiesel vem crescendo consideravelmente nos últimos anos em função do aumento da preocupação mundial com o meio ambiente e da intenção de reduzir a dependência do petróleo importado (MELLO *et al*., 2007). Em virtude disso, a produção de glicerol bruto também irá aumentar e, portanto, torna-se necessária a busca de alternativas para o uso desse resíduo, através de estratégias e pesquisas científicas que visem incrementar a absorção do glicerol bruto no mercado, com o intuito de evitar futuros problemas derivados do acúmulo de glicerol (OOI *et al*., 2004).

1.5.1.3. GLICEROL BRUTO EM MICROORGANISMOS

Em microorganismos, o glicerol apresenta um papel fundamental no controle no metabolismo, na medida em que é responsável pela regulação de diversos mecanismos bioquímicos intracelulares (CHAVÉZ, 2008). A primeira etapa do metabolismo do glicerol compreende sua entrada na célula. Em microorganismos, o glicerol é normalmente assimilado por transporte passivo ou transporte ativo, através da membrana citoplasmática (LAGES *et al*, 1999). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estudos realizados anteriormente apontaram a existência de uma permease denominada FPS1, específica para o transporte passivo de glicerol (LUYTEN *et al*., 1995).

O glicerol é uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas ou anaeróbicas para obtenção de energia, atuando também como regulador do potencial redox e na reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (SIQUEIRA, 2015). Diversos estudos, especialmente os que empregam bactérias, têm demonstrado a capacidade de microorganismos de assimilar o glicerol e gerar compostos de interesse industrial, como polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (ITO *et al.*, 2005; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002).

Dentre os microorganismos capazes de metabolizar o glicerol, destacam-se: entre os fungos leveduriformes, os do gênero *Candida*, *Yarrowia* e *Saccharomyces*; e, entre as bactérias, a espécie *Clostridium pasteurianum* (AMARAL *et al*., 2006; ARRUDA *et al.*, 2007). Existem disponíveis na literatura científica diversos trabalhos que empregam o glicerol como substrato alternativo para os microorganismos, tendo como objetivo a geração de produtos de interesse industrial (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2003).

Na Figura 19, estão elucidadas as vias metabólicas do glicerol dentro da célula, bem como alguns bioprodutos de grande interesse industrial gerados a partir do glicerol, como o ácido cítrico, o etanol, ácido acético, o ácido lático, o 1,3-propanodiol e o ácido succínico.

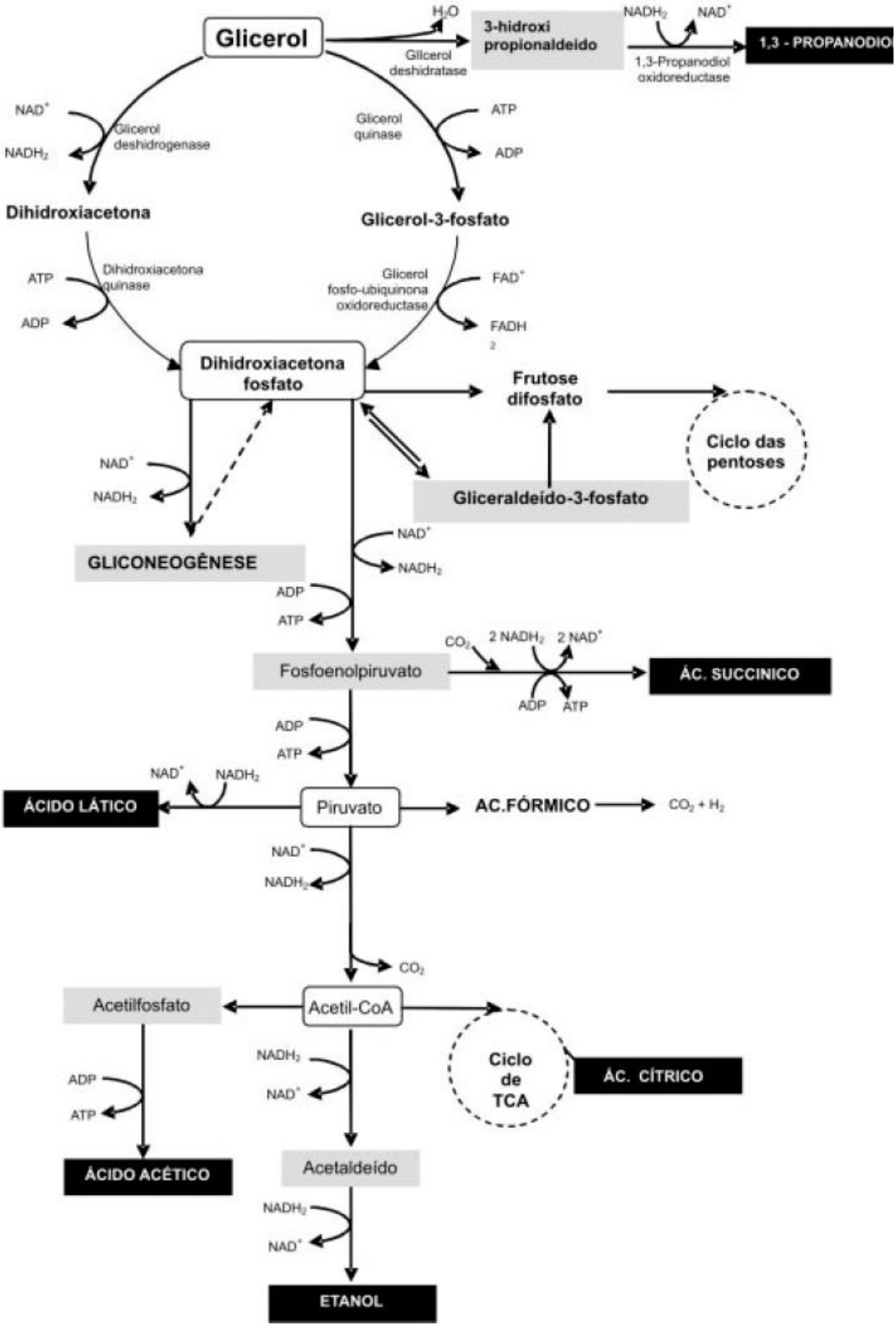


Figura 19. Vias metabólicas do glicerol e seus respectivos bioprodutos.
Fonte: Papanikolaou *et al*., (2008).

1.5.1.4. APLICAÇÕES

Alguns estudos abordaram a produção de etanol por microorganismos, a partir do glicerol. Ito *et al*. (2005), através de seus estudos, mostraram que a *Enterobacter aerogenes* HU-101 foi capaz de transformar resíduo de biodiesel contendo glicerol em H_2 e etanol. Levinson *et al*. (2007) obtiveram uma produção de 21,6 $g.L^{-1}$ de ácido cítrico a partir de 40 $g.L^{-1}$ de glicerol utilizando *Yarrowia lipolytica*.

Machado Jr. (2010) estudou a conversão por via biotecnológica da glicerina gerada na síntese de biodiesel em biomassa para a levedura *Y. lipolytica* NRRL YB-423, e caracterizou a biomassa obtida, em termos de perfil de ácidos graxos e perfil de aminoácidos, encontrando resultados promissores.

Fontes (2008) atingiu bons resultados ao produzir biossurfactante por *Y. lipolytica* a partir de glicerol bruto, mostrando alternativas promissoras para viabilizar economicamente o processo de síntese do biossurfactante.

Da Silva *et al*. (2012), testaram a produção de ácido cítrico a partir de *Y. lipolytica* utilizando diferentes concentrações de glicerol bruto em diferentes fontes de nitrogênio. Os autores obtiveram a maior produção de ácido cítrico na menor concentração de glicerol bruto utilizada no trabalho e na ausência de sulfato de amônia.

1.5.2. SUCO DE CUPUAÇU COMO FONTE DE CARBONO

1.5.2.1. ORIGEM E PROPRIEDADES

O cupuaçuzeiro (Figura 20. Árvore do cupuaçuzeiro.), de nome científico *Theobroma grandiflorum*, pertence à Família Malvaceae, subfamília Sterculiaceae (a mesma do cacaueiro) e é conhecido popularmente como “cupuaçu”, “cupu”, “pupu” e “pupuaçu”. O nome “cupuaçu” vem da língua Tupi (kupu = que parece com o cacau, uasu = grande) (GONDIM *et al*., 2001).

Figura 20. Árvore do cupuaçuzeiro.
Fonte: Rosa (2013).

O cupuaçuzeiro é uma das árvores frutíferas de maior interesse econômico da Amazônia (FERRAZ *et al*., 2012). Nativo dessa região do Brasil, o cupuaçuzeiro é uma espécie em domesticação, recebendo atenção crescente de diversas instituições de pesquisa (CLEMENT *et al*., 2010; SUFRAMA, 2003). Seu fruto exótico (cupuaçu) apresenta excelentes características de aroma, sabor e textura, tendo adquirido grande aceitação no mercado nacional e internacional (MARCHESE, 2002; VILALBA, 2003).

Em termos de potencial econômico, a espécie *Theobroma grandiflorum* ocupa o segundo lugar do gênero, antecedido apenas pelo cacau (*Theobroma cacao*) (MARCHESE, 2002; VILALBA, 2003). Produtos como "chocolate" em pó, ou "achocolatado", podem ser obtidos a partir da moagem da torta desengordurada de cupuaçu, misturados com outros ingredientes (LANNES *et al*., 2002).

O óleo de cupuaçu, obtido de suas sementes, se destaca como uma das gorduras mais estudadas nos últimos anos pelo seu potencial emprego como substituto da manteiga de cacau. As sementes do cupuaçu possuem um elevado teor de gordura (62%) e apresentam características semelhantes às do cacau, o que as torna adequadas para substituir parcialmente a manteiga de cacau, uma das matérias-primas de maior valor agregado do chocolate. Dessa forma, as sementes do cupuaçu constituem a sua porção de maior valor agregado, e o óleo obtido através delas apresenta potenciais aplicações nas indústrias de cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentares (COHEN & JACKIX, 2009; DE AZEVEDO *et al*., 2003).

1.5.2.2. COMPOSIÇÃO

O fruto do cupuaçu (Figura 21), o maior dentre os do gênero *Theobroma*, é do tipo drupáceo (que tem bagas). O epicarpo (casca) é rígido, lenhoso e com epiderme clorofilada, recoberta por um pó ferruginoso que se solta facilmente apenas com o

manuseio (SOUZA, 2011). Os frutos pesam em média 1,275 kg, sendo 38,5% de polpa, 17,19% de sementes, 43% de casca e 2,85% de placenta (VILALBA, 2003). A sua forma varia de ovalada a levemente elíptica e podem medir de 12 a 15 cm de comprimento e de 10 a 12 cm de diâmetro (VENTURIERI, 1993; CARVALHO, 2004).

Figura 21. Fruto do cupuaçu.
Fonte: ROCHA (2015).

O cupuaçu apresenta vários compostos importantes, como ácidos graxos insaturados, aminoácidos e vitaminas (COLOMÉ *et al*., 2010). É uma fruta reconhecida por sua polpa cremosa e seu sabor exótico, muito utilizado no Brasil e no Peru para fabricação de sucos, sorvetes, compotas e geleias (GIRALDO-ZUNIGA et al., 2010). A polpa do cupuaçu, de coloração amarela-clara, é ácida e fibrosa e possui um aroma intenso e agradável, além de alto valor nutricional, representado na Tabela 6 (SOUZA, 2011).

Tabela 6. Valor nutricional de 100 g de polpa de cupuaçuzeiro.

Componentes	Unidades	Valor
Acidez	g	2,15
Brix	-	0,80
pH	-	3,30
Umidade	g	89,00
Aminoácidos	mg	21,90
Estrato	g	0,53
Cinzas	g	0,67
Sólidos totais	g	11,00
Açúcares redutores	g	3,00
Pectina	mg	390,00
Fósforo	mg	310,00
Cálcio	mg	40,00
Vitamina C	mg	23,10

Fonte: Rocha Neto *et al.* (1999).

A acidez natural da polpa e o elevado teor de pectina são características que favorecem a fabricação de néctares, gelatina, compotas e doces pastosos. Como fonte de proteínas e de gorduras, a polpa do cupuaçu é bastante pobre, apresentando valores de 1,92% e 0,48%, respectivamente (ROCHA NETO *et al*., 1999).

As sementes do cupuaçu (Figura 22), em função de suas propriedades, apresentam grande valor agregado, pois possuem semelhança botânica e química com as sementes de cacau, desenvolvendo um fino e agradável aroma, similar ao do chocolate, quando fermentadas, secas e torradas (CARVALHO, 2004; MARCHESE, 2002). Essas propriedades possibilitam a utilização das sementes de cupuaçu na fabricação de produtos similares ao chocolate (COHEN & JACKIX, 2005).

Figura 22. Sementes do cupuaçu secas e fermentadas. Fonte: Teixeira (2014).

Das gordurosas sementes do cupuaçu, é possível extrair uma pasta semelhante àquela com que se produz o chocolate e a manteiga de cacau, a partir da qual é feito o cupulate, que é o chocolate feito a partir da semente do cupuaçu e que possui cor, aroma e sabor similares aos do chocolate, além de apresentar vantagens como preço mais acessível e a presença de substâncias como a teobromina, uma substância estimulante mais saudável do que a cafeína (SETEC, 2007).

O valor nutricional das sementes encontra-se na Tabela 7. Os ácidos esteárico, oleico, araquídico e linoleico são os principais constituintes da gordura contida nas sementes de cupuaçu (ROCHA NETO *et al*., 1999).

Tabela 7. Valor nutricional das sementes de cupuaçu (% de matéria seca).

Componentes	Valor Nutricional (%)
Proteínas	20,0
Gorduras	50,8
Carboidratos	15,9
Fibras	9,6
Cinzas	3,7

Fonte: Rocha Neto *et al.* (1999)

A torta do cupuaçu é o resíduo da extração do óleo da semente seca, livre de resíduo da polpa por prensagem mecânica, através do qual se retira cerca de 80% do óleo total da semente, resultando um resíduo com aproximadamente 11% de extrato etéreo. Além disso, sua casca é bastante dura, e é utilizada como adubo orgânico (XAVIER *et al*., 2016).

Lopes *et al*. (2008), ao realizarem estudos sobre as proteínas do cupuaçu, concluíram que estas apresentaram considerável potencial nutricional, pois possuem valor biológico e composição aminoacídica superiores às do cacau.

Lannes e Medeiros (2003) produziram achocolatado de cupuaçu, uma mistura do pó de cupuaçu, açúcar, aroma e outros ingredientes constantes da formulação, através da técnica de spray-dryer. Os autores obtiveram rendimentos de processo acima de 20% e a instantaneização completa do produto.

1.5.2.3. CULTIVO E PRODUÇÃO

Geograficamente, a cultura do cupuaçuzeiro está disseminada por toda a bacia Amazônica, onde é encontrado em estado silvestre nas florestas tropicais úmidas de terra firme nas regiões sul e sudoeste do Pará e no noroeste do Maranhão. Esse fruto também é cultivado em outras regiões do país, como nos estados da Bahia, Mato Grosso, São Paulo, Rio de Janeiro e em outros países como Colômbia, Venezuela, Equador, Costa Rica, Guiana, São Tomé e Gana (ANDRADE, 2004; IBGE, 2006; MARTINS, 2008).

O cupuaçuzeiro está bem adaptado às condições climáticas do Sul da Bahia, apresentando produção média superior a 80 frutos/planta/ano, mais elevada do que as médias da Amazônia brasileira que, em plantios bem conduzidos, adubados e com mais de dez anos, se consegue produções entre 60 e 70 frutos/planta/ano (LOPES, 2000).

As plantas de cupuaçuzeiro desenvolvem-se bem tanto em áreas de terra firme como em áreas de várzea alta (pontos marginais da floresta, temporariamente inundáveis por rios). O cupuaçuzeiro, em plantios comerciais, deve ser implantado em áreas com solos de alta fertilidade e alto teor de argila. No estado do Acre, aproximadamente 28% dos solos são considerados aptos ao cultivo do cupuaçuzeiro (GONDIM *et al*., 2001).

Comparando o consumo per capita do cupuaçu ao de outras frutas, são amplas as suas possibilidades de crescimento. De acordo com os dados do Censo Agropecuário de 2006 - IBGE, o Brasil colheu 3.026 toneladas de frutos no referido ano, sendo a região Norte responsável por 90% (2.786 ton.) da produção. O estado do Pará, principal produtor, colheu 1.793 ton., o que representa quase 60% da produção do país, seguido pelo estado do Amazonas, com 779 ton., e, em terceiro lugar, a Bahia, com 205 toneladas de cupuaçu colhidas, o que representa quase 90% da produção da região Nordeste.

CAPÍTULO 2: METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

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). Os solventes utilizados foram: clorofórmio, metanol (Vetec – R.J., Brasil).

Os componentes das emulsões foram: de álcool 3-(4-clorofenol)-1,2-propanodiol (Stab CPN), Carbomero (Carbopol 940), sulfato de β-hidroxi-etano (Stab HP100), monoleato de sorbitano (Span-80), óleo de canola, álcool cetílico e cetoestearílico e lauril éter sulfato de sódio (Laureth-23) da marca SIGMA.

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

A polpa de cupuaçu utilizada foi a da marca ICEFRUIT®. O glicerol bruto 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) e membranas em poliestireno (NADIR®) 30kDa.

Equipamentos:

- Balança analítica marca OHAUS modelo Adventurer;
- Capela de fluxo laminar equipada com luz UV (*Labconco*);
- Centrífuga (Chriss modelo UJ1S);
- Espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800)
- Incubador rotatório, com agitação e controle de temperatura (Certomat BS-1)
- Liofilizador (Terroni modelo Enterprise 1);
- Paquímetro (Vernier caliper);
- pHmetro Tecnal (modelo Tec-3MP);
- Ultra-Turrax (IKA T25 digital);
- Refratrômetro (Briobrix);
- Tensiômetro (K100 Krüss);
- Ultrafreezer (Coldlab, modelo CL120-80V);
- Sistema de ultrafiltração (Brats)
- Vórtex (Tecnal);
- Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments).

2.2 CONDIÇÕES DE MICROORGANISMO E INÓCULO

2.2.1. MANUTENÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Para realização dos experimentos, foi utilizada a cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 IMUFRJ 50682, selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil. As células foram conservadas a 4ºC após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio sólido YPD ("**Y**east Extract, **P**eptone, **D**extrose") contendo (em p/v): extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e agar 2%.

2.2.2. OBTENÇÃO DO INÓCULO

A partir dos tubos contendo a levedura, inoculavam-se 200 mL de meio de cultivo YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%) em *Erlenmeyer* de 500 mL. Após cerca de 70 horas em um incubador rotatório (28ºC, 160 rpm), a absorbância (570 nm) de uma amostra deste cultivo foi determinada e, em seguida, as células foram centrifugadas (3.000 g, 10 min), servindo de inóculo dos experimentos. A concentração inicial de células de aproximadamente 1,0 ± 0,1 mg m.s.cel/mL foi utilizada em todos os experimentos.

2.3 PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

A produção de biossurfactante foi realizada em *Erlenmeyer* de 1000 mL, contendo 500 mL de meio de cultura, em um agitador rotatório (Certomat BS-1) a 28ºC e 250 rpm por 96 horas. 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. Antes de analisadas, as amostras foram centrifugadas (3000 g por 5 min) e filtradas em membrana de diâmetro de 0,45 μm para a remoção das células.

Para a produção de biossurfactante, dois meios de cultivo foram utilizados: um contendo glicerol bruto e outro contendo suco de polpa de cupuaçu como matérias-primas, cujas composições são descritas a seguir.

2.3.1. MEIO DE CULTIVO A PARTIR DE GLICEROL BRUTO

A glicerina utilizada neste trabalho é o co-produto da produção de biodiesel, resultante da transesterificação de óleo de rícino por metanol em meio alcalino (NaOH), e foi obtida de uma planta piloto do NUTEC - Fundação Núcleo de Tecnologia

Industrial do Ceará - da empresa TECBIO. Para a produção do meio de cultivo, 500 mL de água destilada contendo glicerol bruto a 3%(v/v) foram suplementados com sulfato de amônio (10 $g.L^{-1}$) e extrato de levedura (0,5 $g.L^{-1}$) como fonte de nitrogênio.

2.3.2. Meio de Cultivo A Partir De Suco De Cupuaçu Clarificado

A polpa de cupuaçu (ICEFRUIT®) foi adquirida em mercado local (Cobal, Rio de Janeiro-RJ). A Tabela 8 mostra a informação nutricional da polpa.

Tabela 8. Informação nutricional da polpa de cupuaçu da marca ICEFRUIT®.

Quantidade por porção (200mL)		VD* (%)
Valor energético	48 Kcal ou 202 Kj	2
Carboidratos	9,8 g	3
Proteínas	1,1g	3
Gorduras totais	1,1g	22,8
Ferro	1,7g	12

*Valores diários de referência com base em uma dieta de 2000 Kcal.
Não contém quantidades significativas de gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio.

A polpa de cupuaçu (100 g) foi diluída em 200 mL de água. O suco obtido foi clarificado através de centrifugação (3.500g) e filtração, utilizando membranas de celulose triacetato (Millipore Corp.) com diâmetros de poros de 0,45 μm. O pH do suco clarificado foi ajustado para 7,0 com NaOH 1M. O suco de cupuaçu clarificado foi suplementado com sulfato de amônio (10 $g.L^{-1}$) e extrato de lêvedo (0,5 $g.L^{-1}$).

Ambos os meios de cultivo passaram por processo de esterilização em autoclave a 0,5 atm por 20 min.

2.4 Extração e Purificação Parcial do Biossurfactante

Após o cultivo de *Y. lipolytica* por 96 h em incubador rotatório nas condições já especificadas, o meio de cultivo foi centrifugado (5.000g) a 25ºC por 20 minutos e filtrado em uma membrana de celulose triacetato (Millipore) de 0,45 μm, a fim de se retirar as células.

Para a purificação parcial do biossurfactante, utilizou-se, primeiramente, um sistema de ultrafiltração (6-8 bar), para concentrar o meio de cultivo livre de células. Nesta técnica, 250 mL do extrato filtrado eram concentrados até 12,5 mL no sistema de ultrafiltração (BRATS) (Figura 23).

Figura 23. Sistema de ultrafiltração BRATS utilizado para concentrar o extrato livre de células.

Para realizar a extração do biossurfactante, foi utilizado o sistema de solventes extrato concentrado/clorofórmio/metanol em proporções de 1:8:8 (RAMOS *et al.*, 2010). Inicialmente, 25 mL do meio de cultivo concentrado e livre de células foram colocados em um funil de separação e, em seguida, 50 mL de clorofórmio foram adicionados ao funil, seguidos por 50 mL de metanol. O sistema foi, então, homogeneizando manualmente e deixado em repouso por intervalos de 10 min. As adições dos solventes se sucederam dessa forma até totalizar o volume de 200 mL de clorofórmio e 200 mL de metanol. O biossurfactante, precipitado na fase aquosa, foi centrifugado (3.000g, 10 min) a 25ºC, dissolvido em 5 mL de água destilada e congelado em ultrafreezer a -50ºC, para posterior liofilização.

2.5 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Dois métodos foram utilizados para acompanhar a produção do biossurfactante durante as 96 h de experimento: a medida da tensão superficial e o índice de emulsificação do meio de cultivo livre de células.

2.5.1. TENSÃO SUPERFICIAL

A determinação da tensão superficial foi realizada utilizando o tensiômetro K100 Krüss, segundo o método do anel De Nöuy (FONTES, 2008). 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.

2.5.2. ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (IE)

O índice de emulsificação (Figura 24. Medição do IE dos meios de cultivo) foi realizado segundo Cooper e Goldenberg (1987), com algumas modificações. Este procedimento consistiu na adição de 1 mL de n-hexadecano a 1 mL do meio de cultura fermentado e livre de células em tubo de ensaio, seguido por agitação em vórtex por 2 minutos. Após 24 horas, calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e altura total de amostra presente no tubo de ensaio (Eq. 1).

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} * 100 \quad (1)$$

onde:

E_{24} = IE após 24 h;
H_{el} = altura da emulsão;
H_s = altura total

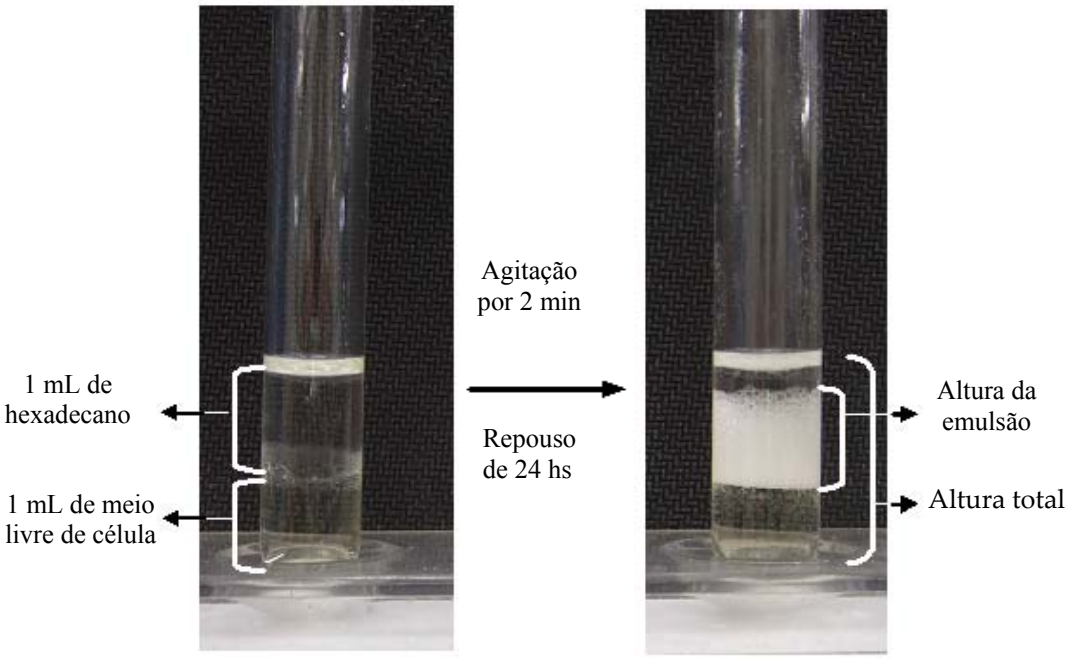


Figura 24. Medição do IE dos meios de cultivo
Fonte: Fontes (2008).

2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.6.1. QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorbância em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800) a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg m.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco (Figura 25). A curva de massa seca versus absorbância é obtida através da utlização de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com

0,9%(p/v) de NaCl). Desta suspensão, uma amostra (10 mL) é retirada e 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 absorbância para cada concentração é obtida em espectrofotômetro a 570 nm. O fator de conversão encontrado foi de 0,643.

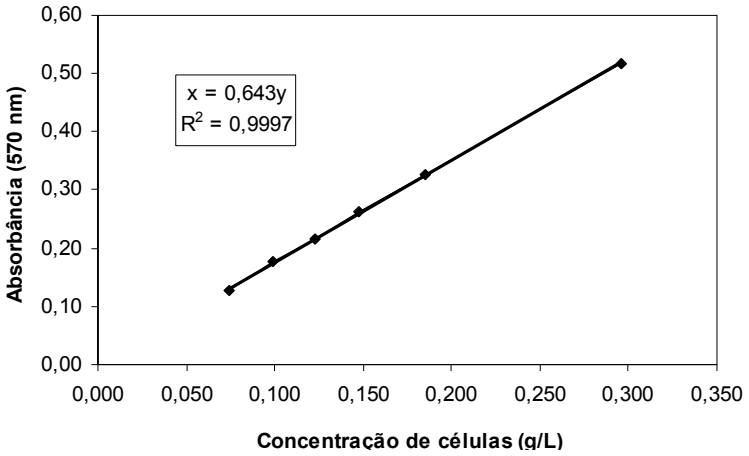


Figura 25. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Y. lipolytica* através de medidas de absorbância em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800).

2.6.2. pH do Meio de Cultivo

O pH do meio de cultivo livre de células foi determinado utilizando-se um pHmetro da marca Tecnal, modelo Tec-3MP, na temperatura ambiente (25°C).

2.6.3. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores

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 totais consistiu em preparar a amostra (hidrólise), adicionando-se 1 mL de ácido clorídrico 2N a 1 mL da amostra, que foi então aquecida a 80°C durante 5 min. Após este tempo, a amostra foi resfriada e à mesma acrescentaram-se 3 mL de NaOH 1N. Posteriormente, 1 mL da amostra foi adicionado a 1 mL de DNS em um tubo de ensaio e a mistura foi aquecida por 10 minutos em banho-maria (100°C). A seguir, as amostras foram resfriadas e a elas foram adicionados 10 mL de água destilada. Após homogeneização, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva padrão foi preparada com solução de glicose + frutose nas concentrações de 0,0 a 1,2 $g.L^{-1}$ (Figura 26).

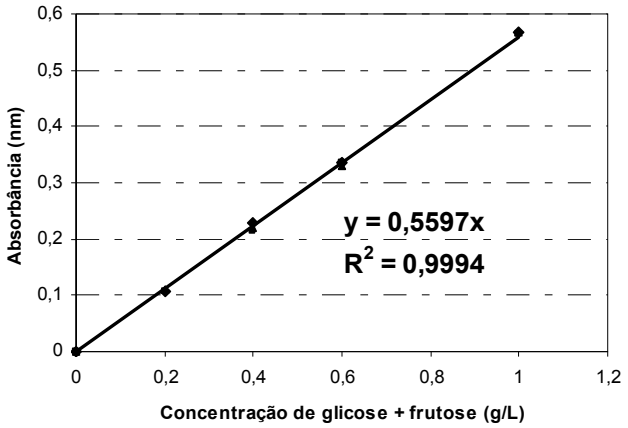


Figura 26. Curva padrão de DNS (glicose + frutose) para quantificação de açúcares redutores presentes no meio de cultivo.

2.6.4. 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 3000 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 $U.L^{-1}$; glicerol quinase 200 $U.L^{-1}$; glicerol fosfato oxidase 1500 $U.L^{-1}$; peroxidase 900 $U.L^{-1}$; ATP 2 $mmol.L^{-1}$; 3-5 HDCBS 2 $mmol.L^{-1}$; 4-aminofenazona 1 $mmol.L^{-1}$) e 30 mL de reativo de tampão (50 $mmol.L^{-1}$ tris, pH 7,6). Após homogeneização em vórtex, procedeu-se a incubação em banho-maria a 37ºC por 10 minutos, seguidos de resfriamento e adição de 1 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu (modelo UV 1800) a 505 nm.

Um branco foi preparado nas condições já descritas, substituindo-se o volume de amostra por água. Paralelamente à quantificação da amostra, foi preparada uma curva padrão com solução de glicerol nas concentrações de 0,0 a 1,0 $g.L^{-1}$ (Figura 27).

Os resultados obtidos foram calculados com base na Eq. 2, descrita a seguir e expresso em $g.L^{-1}$.

$$[Glicerol] = \frac{DO_{am}}{fc} \times fd \qquad (2)$$

onde:

DO_{am} = Densidade óptica da amostra
f_c = fator de correção
f_d = fator de diluição

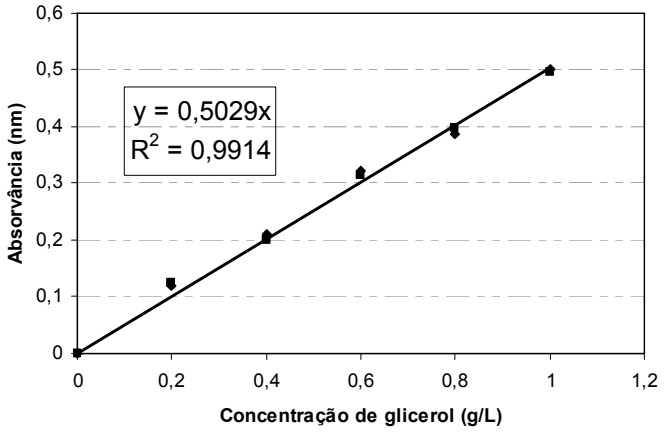


Figura 27. Curva padrão glicerol realizada em espectrofotômetro UV/VIS - Shimadzu a 505 nm.

2.7. MÉTODOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

2.7.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

Foi determinada através de titulação turbidimétrica (espectrofotometria). Esta técnica consistia na medição da transmitância das amostras a 450 nm (ABED *et al.*, 2004), utilizando água como controle, à temperatura ambiente (25ºC). Diluições sucessivas foram realizadas em triplicata, na faixa de 0,001 $g.L^{-1}$ até 50,000 $g.L^{-1}$, para que se fosse possível prever o ponto em que a amostra passaria de turva a límpida. Dessa forma, obtinha-se o comportamento do decaimento da transmitância em função da concentração de biossurfactante. A CMC era então obtida igualando-se as equações das duas curvas no ponto de interseção das mesmas, para uma dada faixa de concentração de biossurfactante.

2.7.2. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO

Foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). Este método consistia na adição de 2,5 mL de reagente do Bradford a 1 mL de água destilada contendo 5 mg de biossurfactante em tubo de ensaio à temperatura de 25ºC, de forma que a concentração de amostra era de 1,43 $g.L^{-1}$. O sistema era agitado, deixado em repouso por 2 minutos e, então, era feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. O valor obtido era comparado com um valor já conhecido da proteína padrão albumina de serum bovino (BSA), cuja curva padrão está ilustrada na Figura 28.

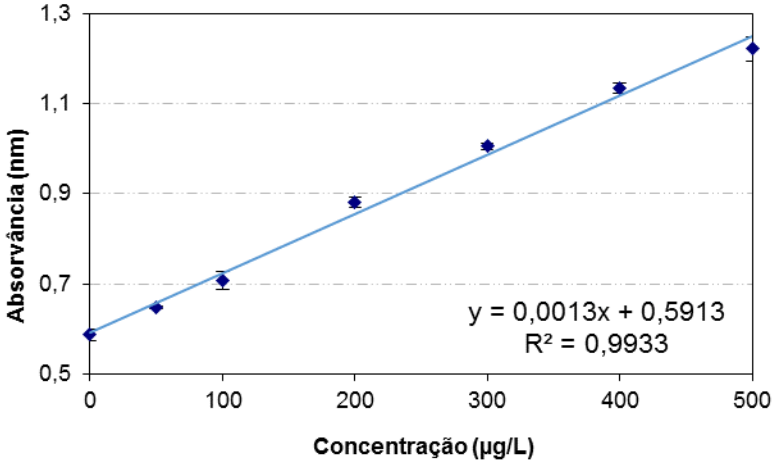


Figura 28. Curva padrão da concentração da proteína BSA medida em espectrofotômetro.

2.7.3. Determinação de Açúcares Totais

Foi determinada pelo método fenol-sulfúrico. Foram preparados 2 padrões, em Eppendorf de 2 mL, de acordo com a seguinte sequência de adição:

i. 0,27 mL de Fenol a 5%;

ii. 0,27 mL de água destilada para os padrões e 0,26 mL para a amostra;

iii. 10 µL de amostra (2 $g.L^{-1}$).

Os *Eppendorfs*, com as soluções, foram então colocados em um recipiente com água, para evitar o superaquecimento dos reagentes, e a estes foram adicionados 1,36 mL de ácido sulfúrico PA. Em seguida, as soluções eram homogeinizadas e deixadas em repouso por 15 min, antes da leitura em espectrofotômetro (490 nm). A curva padrão foi preparada com solução de glicose nas concentrações de 20 a 70 $mg.L^{-1}$ (Figura 29).

Figura 31. Curva padrão construída para determinação da concentração de carboidratos totais.

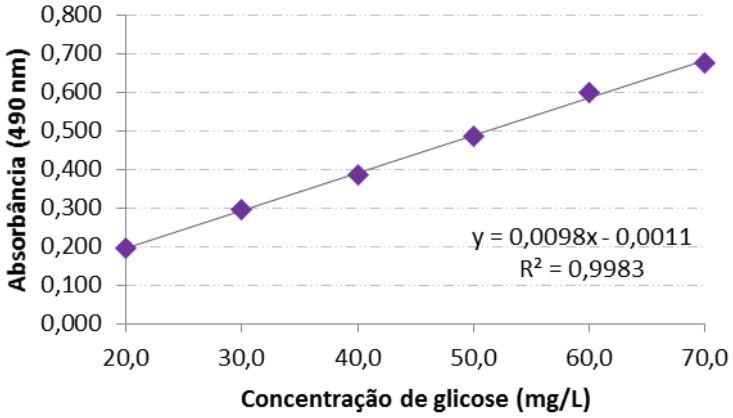


Figura 29. Curva padrão construída para determinação da concentração de açúcares totais.

2.8. EMULSÕES UTILIZANDO O BIOSSURFACTANTE PROVENIENTE DE GLICEROL BRUTO

2.8.1. PREPARO DAS EMULSÕES COSMÉTICAS

O preparo das emulsões foi realizado em duas etapas: primeiramente, preparou-se a fase A, contendo composição fixa de: 8 mL de água destilada, 30 mg de álcool 3-(4-clorofenol)-1,2-propanodiol (Stab CPN), 30 mg de Carbomero (Carbopol 940), 10 mg de sulfato de β-hidroxi-etano (Stab HP100), e monoleato de sorbitano (Span-80), em concentrações variadas. Esta fase foi aquecida por cerca de 1,5 h em banho-maria e agitada em vórtex a cada 10 min, até que a mistura estivesse homogênea. Em seguida, preparou-se a fase B, contendo 0,8 mL de óleo de canola, álcool cetílico, lauril éter sulfato de sódio (Laureth-23) e biossurfactante, em proporções variadas. A fase B foi aquecida por 5 min em banho-maria e, em seguida, vertida na fase A, adicionando-se 10 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada por 10 min em vórtex, o pH foi ajustado para 7 e foi feita a homogeneização final por mais 5 min no vórtex. A análise do diâmetro médio das micelas foi realizada em Zetasizer (Figura 30) após 24h e uma semana de preparo das emulsões. A determinação do índice de refração do óleo de canola foi realizada em refratômetro (Brix). As análises de diâmetro médio de micelas foram realizadas no laboratório ENGEPOL-UFRJ, sob responsabilidade do professor Márcio Nele de Souza.

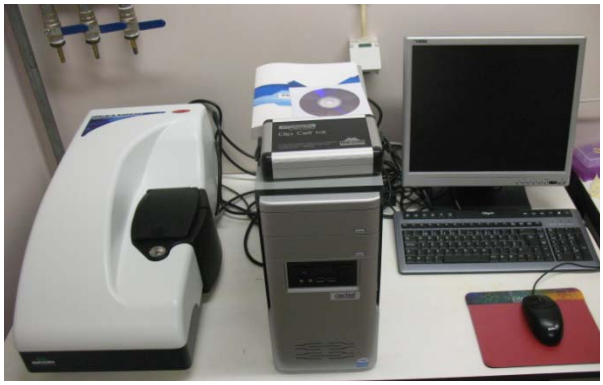


Figura 30. Zetasizer utilizado para medir o diâmetro médio das micelas.

2.8.2. PLANEJAMENTOS DE EXPERIMENTO

A concentração ótima para se obter a emulsão cosmética mais estável utilizando o biossurfactante proveniente de glicerol bruto foi baseada na formulação de uma emulsão

cosmética padrão, composta por: água destilada a 0,9%(v/v), óleo de canola a 0,04%(v/v), Stab CPN (0,5g.L^{-1}), Carbopol (1,5 g.L^{-1}), Stab HP100 (1,5g.L^{-1}), álcool cetílico (25 g.L^{-1}), Laureth-23 (27,5 g.L^{-1}) e Span-80 (5 g.L^{-1}). Com o objetivo de diminuir as altas quantidades de álcool cetílico, Laureth-23 e Span-80 presentes nessa emulsão incorporando o biossurfactante produzido a partir de glicerol bruto e, ao mesmo tempo, avaliar o potencial desse biossurfactante para estabilizar emulsões, um planejamento de experimento foi realizado. Para tal, realizou-se, inicialmente, um delineamento central composto rotacional (DCCR) 2^4 com 27 experimentos, cujos níveis avaliados encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Níveis dos parâmetros avaliados no primeiro planejamento.

	Níveis				
Variáveis Independentes	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**
Biossurfactante (mg/mL)	0	2,00	6,00	10,00	12,00
Álcool cetoestearilico (mg/mL)	0	4,15	8,30	12,45	16,60
Lauril éter sulfato de sódio (mg/mL)	0	4,60	9,20	13,80	18,40
Monoleato de sorbitano (mg/mL)	0	0,63	1,25	1,87	2,50

Nota: Apenas para o primeiro planejamento de experimento, foi utilizado o álcool cetoestearílico, porém, na falta deste reagente, foi utilizado o alcool cetílico nos demais estudos de estabilidade, por este apresentar propriedades fisico-químicas semelhantes.

Com o objetivo de aperfeiçoar os resultados do primeiro planejamento, realizou-se um planejamento de misturas, com um total de 10 experimentos, fixando-se a concentração do Span-80 em 1,25 mg/mL, por este não ter sido um parâmetro estatisticamente significativo dentro da faixa de concentração estudada. A Tabela 10, com as porcentagens dos parâmetros avaliados neste planejamento, encontra-se abaixo.

Tabela 10. Matriz do planejamento de misturas.

Níveis	**Álcool Cetílico (%)**	**Laureth-23 (%)**	**Biossurf. (%)**
1	1,00	0,00	0,00
2	0,00	1,00	0,00
3	0,00	0,00	1,00
4	0,50	0,50	0,00
5	0,50	0,00	0,50
6	0,00	0,50	0,50
7	0,33	0,33	0,33
8	0,67	0,17	0,17
9	0,17	0,67	0,17
10	0,17	0,17	0,67

Por último, foi realizado um teste de otimização, com 6 experimentos, fixando-se a concentração de álcool cetílico em 30 mg/mL, de acordo com os resultados do planejamento anterior. As concentrações do teste de otimização encontram-se nas Tabela 11.

Tabela 11. Matriz do teste de otimização com as concentrações dos parâmetros avaliados.

Emulsão	Laureth-23 ($g.L^{-1}$)	Biossurf. ($g\ L^{-1}$)
1	0	20
2	4	16
3	8	12
4	12	8
5	16	4
6	20	0

2.9. ANÁLISE COMPARATIVA DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES

2.9.1. PREPARO DAS EMULSÕES COSMÉTICAS UTILIZANDO BIOSSURFACTANTE PROVENIENTE DA POLPA DO CUPUAÇU

A emulsão cosmética contendo biossurfactante produzido a partir de suco de cupuaçu clarificadp foi preparada com a melhor condição obtida nos planejamentos de experimento, contendo: água destilada a 0,9%(v/v), óleo de canola a 0,04%(v/v), Stab CPN (0,5$g.L^{-1}$), Carbopol (1,5 $g.L^{-1}$), Stab HP100 (1,5$g.L^{-1}$), álcool cetílico (33,5 $g.L^{-1}$), Laureth-23 (5 $g.L^{-1}$), Span-80 (1,25 $g.L^{-1}$) e biossurfactante a 8 $g.L^{-1}$.

Uma emulsão padrão (sem nenhum dos biossurfactantes), bem como uma réplica da melhor formulação preparada com o biossurfactante produzido a partir de glicerol bruto, foram concomitantemente preparadas, com o intuito de realizar um estudo comparativo da estabilidade entre as 3 emulsões. As concentrações das emulsões produzidas nesse estudo encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Concentrações dos parâmetros utilizadas na análise comparativa da estabilidade de emulsões.

Emulsão	Span-80 ($g.L^{-1}$)	Álcool Cetílico ($g.L^{-1}$)	Laureth-23 ($g.L^{-1}$)	Biossurf. ($g.L^{-1}$)
Padrão	5	25,0	27,5	0,0
Glicerol	1,25	33,5	8,5	8,0
Cupuaçu	1,25	33,5	8,5	8,0

De acordo com CAENN *et al.*, 2011, para que uma emulsão seja formada, é necessário algum grau de agitação, uma vez que, para que haja a criação de novas superfícies, é necessário trabalho. Por isso, para se obter uma emulsão com micelas relativamente pequenas, é necessário um maior grau de agitação. Assim, as emulsões

foram preparadas conforme descrito no item 2.8.1, com a diferença de que, após o ajuste do pH, as emulsões foram homogeinizadas em Ultra-Turrax (8.000 g) por 5 min, com o objetivo de se obter emulsões com micelas menores e, consequentemente, mais estáveis.

O Zetasizer foi novamente utilizado para avaliar a estabilidade das emulsões através da distribuição do tamanho de micelas ao longo do tempo de 4 semanas de armazenamento, à temperatura ambiente (25ºC).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Para acompanhar a produção dos biossurfactantes, 4 parâmetros foram avaliados durante o tempo de experimento dos meios de cultivo: o crescimento celular, o consumo de substrato, a tensão superficial e o índice de emulsificação.

3.1.1. ANÁLISE DO CRESCIMENTO CELULAR E PERFIL DE CONSUMO DE SUBSTRATO

O perfil cinético de crescimento celular de *Y. lipolytica* em meio de cultivo contendo glicerol bruto e o consumo desse substrato pela levedura estão ilustrados na Figura 31.

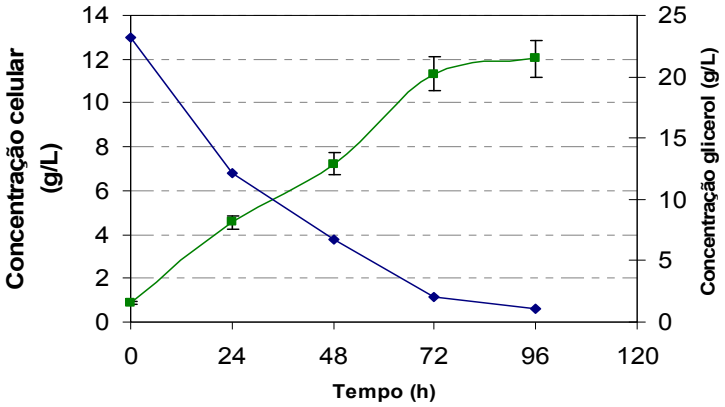


Figura 31. Perfil cinético de crescimento de *Y. lipolytica* (■) e de consumo do glicerol (♦) em meio contendo glicerina bruta (3%).

Pode-se observar na Figura 31 um crescimento exponencial das leveduras até o tempo de 72 h, onde o mesmo passa a ser constante (fase estacionária), atingindo a concentração celular final de 12,03 $g.L^{-1}$. A Figura 31 também ilustra que o glicerol bruto foi praticamente todo consumido até o final do experimento, indicando que este serviu como substrato para a levedura. Estes perfis indicam que a levedura utilizou o glicerol bruto como substrato para a produção de biomassa.

De Lima (2014) estudou a produção de bioprodutos por *Yarrowia lipolytica* em meio mineral M1 contendo glicerol (30 $g.L^{-1}$) em pH 6 e concentração inicial de inóculo de 10% (28ºC, 160 rpm) por 96h. O autor observou que, ao fim do tempo de processo, o

microorganismo consumiu aproximadamente 70% de glicerol e apresentou crescimento celular máximo no tempo de 48 horas (5,9 $g.L^{-1}$). No presente estudo, a concentração celular foi praticamente o dobro (12,06 $g.L^{-1}$) e o glicerol foi todo consumido.

A Figura 32 apresenta o perfil cinético de crescimento de *Y. lipolytica* no meio de cultivo contendo suco de cupuaçu clarificado, bem como o consumo de açúcares redutores totais durante o tempo de duração do experimento.

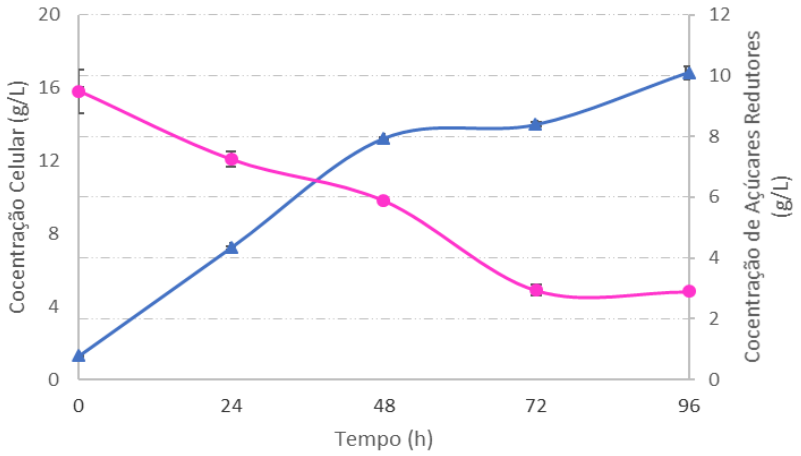


Figura 32. Perfil cinético de crescimento de *Y. lipolytica* em meio contendo CCJ, suplementado com sulfato de amônio 10 g^{-1} e extrato de levedo (0,5g^{-1}) (▲) e concentração de açúcares redutores (●).

De acordo com a Figura 32, o crescimento celular das leveduras apresenta um perfil majoritariamente linear, tendo apresentado maior crescimento nas primeiras 48 horas de incubação. Ao final do experimento, a produção de biomassa para o meio estudado foi de 16,84 $g.L^{-1}$ e de açúcares redutores foi de 2,89 $g.L^{-1}$.

Comparando-se os perfis de crescimento celular e de consumo de substrato entre os dois meios de cultivo utilizados, observa-se que, no meio contendo suco de cupuaçu clarificado, a produção de biomassa foi maior (16,84 $g.L^{-1}$) do que no meio em que se utilizou glicerol bruto como substrato (12,03 $g.L^{-1}$). Isto significa que a célula consome preferencialmente açúcares simples ao glicerol bruto para o seu crescimento. Este comportamento pode ser explicado através das vias metabólicas, pois, enquanto a respiração celular a partir de glicose é capaz de gerar 38 moléculas de ATP, a utilização de glicerol gera apenas 22 moléculas de ATP, o que faz com o crescimento celular Aa partir desta molécula ocorra de forma mais lenta.

3.1.2. COMPORTAMENTO DO IE E DA TENSÃO SUPERFICIAL DO MEIO DE CULTIVO

Os comportamentos do índice de emulsificação (IE) e da variação da tensão superficial (ΔTS) do meio de cultivo à medida que o biossurfactante era produzido pela levedura também foram analisados (Figura 33).

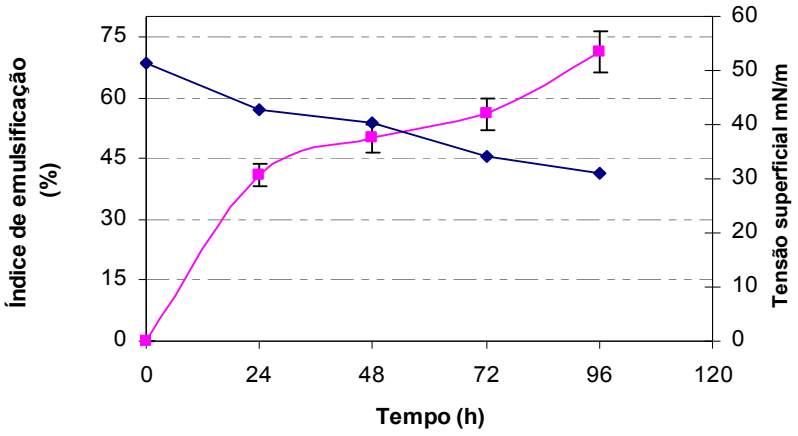


Figura 33. Evolução do IE (■) e da tensão superficial (♦) durante a produção de biossurfactante em meio contendo glicerina.

Pode-se observar na Figura 33 que o IE teve o seu valor máximo de 70,22% ao final dos experimentos, apresentando um aumento significativo entre 0 e 24 horas, indicando que, já no primeiro dia de incubação, o biossurfactante começou a ser produzido pela levedura e a ser secretado para o meio de cultivo. Nota-se também que a tensão superficial apresentou um decaimento praticamente linear durante todas as 96 horas de experimento, resultando numa diminuição total de 22 mN/m.

O comportamento do índice de emulsificação do meio de cultivo contendo cupuaçu durante as 96 horas de experimento está ilustrado na Figura 34.

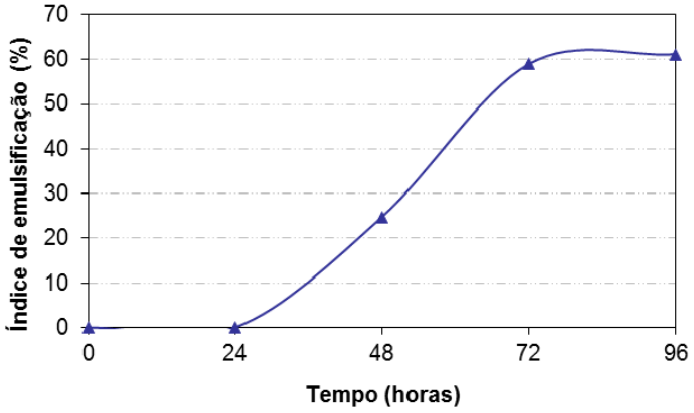


Figura 34. Índice de emulsificação do meio de cultivo contendo suco de cupuaçu clarificado.

De acordo com a Figura 34, pode-se observar que a produção de biossurfactante se iniciou a partir das primeiras 24h de experimento, com crescimento linear até 72h, onde então atingiu o seu valor máximo de 61,20%. A partir deste resultado, infere-se que a produção de biossurfactante no meio de cultivo ocorre majoritariamente entre 24 e 72h de incubação, que também é o intervalo onde se observou o consumo de açúcares pela Figura 32.

Comparando-se os resultados para o índice de emulsificação, observou-se que o meio contendo glicerol bruto apresentou maior valor de IE do que o meio contendo CCJ. Esse resultado pode ser explicado com base no fato de que, apesar de ambas as matérias-primas utilizadas neste trabalho serem hidrofílicas, o glicerol bruto foi obtido diretamente da planta de produção do biodiesel e, portanto, pode conter impurezas de óleo, como ácidos graxos, que são facilmente absorvidos pela levedura *Yarrowia lipolytica*, sendo incorporados à porção apolar da molécula de biossurfactante e conferindo-lhe melhores propriedades emulsificantes. Isto sugere que os ácidos graxos presentes no glicerol bruto favorecem a biossíntese dos biossurfactantes, enquanto os carboidratos simples presentes no suco de cupuaçu favorecem o crescimento celular.

De fato, de acordo com Fontes *et al.* (2008), os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo microorganismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbonada do biossurfactante, pois a levedura *Yarrowia lipolytica* é capaz de incorporar diretamente ácidos graxos para a produção de biossurfactante. De acordo com os mesmos autores, 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.

A variação da tensão superficial do meio de cultivo contendo suco de cupuaçu clarificado foi avaliada e encontra-se na Tabela 13. Observa-se nesta tabela que o biossurfactante produzido proporcionou uma ΔTS de 14,99.

Tabela 13. Variação da tensão superficial total do meio de cultivo contendo CCJ como fonte de carbono.

TS inicial (mN/m)	**TS final (mN/m)**	**ΔTS**
60,2 ± 2,3	45,21 ± 0,8	14,99

Ao se comparar os dois valores de variação de tensão superficial obtidos, observa-se novamente que o meio a partir de glicerol bruto apresentou resultados mais satisfatórios (ΔTS = 22 mN/m) do que o meio contendo CCJ (ΔTS = 14,99 mN/m), corroborando com a hipótese de que, neste meio, houve maior produção de tensoativos, ou ainda que os biossurfactantes produzidos neste meio apresentam melhores propriedades surfactantes.

De Lima (2014), ao produzir biossurfactante por *Y. lipolytica* em meio contendo glicerina bruta nas condições já especificadas, observou a ocorrência máxima de formação do biossurfactante com aproximadamente 96 horas de processo, encontrando variação de tensão superficial da água de 37,8 mN/m, valor superior ao encontrado neste trabalho.

Ferreira (2017) comprovou que o biossurfactante produzido por *L. paracasei* utilizando glicose (33 $g.L^{-1}$), milhocina (10 $g.L^{-1}$) e extrato de lêvedo (10 $g.L^{-1}$), foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 25 mN/m, valor mais próximo daquele encontrado para o meio de cultivo contendo glicerol bruto (22 mN/m).

Siddhartha *et al*. (2006) avaliaram a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir de óleo de cupuaçu (30ºC, 200 rpm) por 120h. Os autores encontraram uma produção de biomassa de 1,29 $g.L^{-1}$, valor bem inferior ao encontrado neste trabalho. Porém, a variação da tensão superficial encontrada foi de 30,4 mN/m, o dobro do encontrado para o meio contendo suco de cupuaçu clarificado neste trabalho, indicando novamente que substratos lipídicos favorecem a diminuição da tensão superficial.

Tabela 14. Parâmetros obtidos na produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* utilizando cupuaçu e glicerol bruto como fonte de carbono.

Parâmetro	Cupuaçu	Glicerol bruto
μ (h^{-1})	0,16	0,11
-dS/dt ($g(L.h)^{-1}$)	0,07	0,13
ΔTS (mN/m)	14,99	22,00
IE (%)	61,20	70,22
X_f ($mg.mL^{-1}$)	16,84	12,03
X_p ($mg.mL^{-1}$)	0,8	7,9

μ: taxa específica de crescimento
-dS/dt: taxa de consumo de substrato
ΔTS: variação da tensão superficial
IE: índice de emulsificação
X_f: concentração celular final
X_p: produção de biossurfactante

Para melhor analisar os resultados obtidos na produção de ambos os biossurfactantes produzidos, foi elaborada a Tabela 14, que evidencia os valores de todos os parâmetros obtidos até aqui. Nesta tabela, pode-se observar que o meio de cultivo contendo CCJ como fonte de carbono apresentou as melhores taxas de crescimento celular (μ de 0,16 h^{-1} e X_f de 16,84 $mg.mL^{-1}$), enquanto as melhores propriedades surfactantes foram obtidas com o biossurfactante proveniente do glicerol bruto (ΔTS de 22 mN/m e IE de 70,22%). Observa-se ainda que a produção de biossurfactante foi significativamente maior para o meio de cultivo contendo glicerol bruto. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Fontes *et al*. (2008), no qual os autores afirmam que, enquanto meios contendo açúcar como fonte de carbono favorecem o crescimento celular, meios hidrofóbicos favorecem a produção de biossurfactantes, embora ambos os substratos sejam capazes de possibilitar a biossíntese de biossurfactantes por microorganismos. No caso do presente trabalho, as impurezas de óleo presentes no glicerol bruto são possivelmente as responsáveis pelas melhores propriedades surfactantes do biossurfactante produzido a partir desta matéria-prima.

As diferenças entre os resultados da Tabela 14 para cada parâmetro analisado em ambos os meios de cultivo podem ser explicadas pelo fato de que, quando se utiliza matérias-primas diferentes, se obtém biossurfactantes com composições químicas diferentes e, consequentemente, o seu comportamento em relação à variação de tensão superficial e índice de emulsificação serão diferentes.

A cinética e os parâmetros fermentativos da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerina bruta (2%) como fonte de carbono e $NaNO_3$ (0,4%) foram estudados por Sousa *et al*. (2014). Nesta condição, os valores obtidos para os parâmetros foram: $\mu_{máx}$ de 0,167 $g.L^{-1}$ e X_f de 0,72 $g.L^{-1}$. Comparando-se estes resultados aos do presente trabalho, observa-se que, apesar de X_f ter sido bem inferior ao encontrado para ambos os meios de cultivo (16,84 e 12,03 $g.L^{-1}$), $\mu_{máx}$ foi muito próximo do obtido para o meio contendo CCJ (0,16 h^{-1}), indicando que a célula é capaz de apresentar a mesma taxa específica de crescimento mesmo em concentrações celulares iniciais menores. Os mesmos autores encontraram $IE_{máx}$ de 80% em querosene com 10% NaCl e consumo de glicerol de 50,77%, metade do consumo encontrado no presente trabalho (~100%). O resultado do IE encontrado pelos autores foi, embora próximo, maior do que o encontrado para o meio contendo glicerol bruto neste trabalho

(70,22%), indicando que a adição de sal ao meio de cultivo pode ser um fator favorável para a produção de biossurfactante a partir de meios hidrofóbicos.

Bezerra (2012) produziu de biossurfactante a partir de *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono. Os melhores resultados mostraram produção de 3,0 $g.L^{-1}$ de biomassa e índice de emulsificação superior a 65%.

Farias e Sarubbo (2006) otimizaram as condições de produção do biossurfactante por *C. lipolytica* em meio contendo óleo de canola (100 $g.L^{-1}$) e glicose (100 $g.L^{-1}$). O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial de 71 mN/m para valores em torno de 30 mN/m (ΔTS = 41 mN/m), maior valor encontrado dentre as literaturas pesquisadas. Este resultado indica que a junção de substratos hidrofóbicos e hidrofílicos em altas concentrações pode ser uma forte estratégia para otimizar a produção de biossurfactantes.

A Tabela 15 compara os resultados dos parâmetros relacionados diretamente à produção de biossurfactante (IE, ΔTS e Xp) obtidos neste trabalho com resultados de outros trabalhos da literatura que utilizaram *Y. lipolytica* como microorganismo produtor de biossurfactante.

Tabela 15. Comparação dos resultados de índice de emulsificação (IE), variação da tensão superficial (ΔTS) e produção de biossurfactante (Xp) com outros trabalhos que utilizaram *Y. lipolytica* como microorganismo produtor de biossurfactante.

Microorganismo	**Matéria-prima**	**IE (%)**	**ΔTS (mN/m)**	**X_p (g/L)**	**Referência**
Y. lipolytica	Glicerol bruto	70,2	22,0	7,9	Este trabalho
Y. lipolytica	Suco de cupuaçu	61,2	15,0	0,8	Este trabalho
Y. lipolytica	Suco de caju	68,0	18,0	6,9	Fontes *et al.* (2012)
Y. lipolytica	Óleo diesel	-	10,0	-	Souza *et al.* (2012)
Y. lipolytica	Resíduo de óleo vegetal	-	20,0	8,0	Rufino *et al.* (2014)
Y. lipolytica	Resíduo do soro de manteiga	66,7	-	-	Santos *et al.* (2016)
Y. lipolytica	Resíduo do soro de leite	71,5	-	-	

De acordo com a Tabela 15, o IE encontrado para biossurfactante produzido a partir de glicerol bruto foi próximo daquele encontrado por Santos *et al.* (2016), enquanto o IE do biossurfactante produzido a partir de CCJ mostra-se um pouco abaixo dos demais. A maior variação da tensão superficial foi obtida com o biossurfactante produzido com glicerol bruto e a ΔTS do biossurfactante a partir de CCJ manteve-se acima da ΔTS do biossurfactante produzido por Souza *et al.* (2012), utilizando óleo

diesel. Quanto à produção de biossurfactante, o glicerol bruto utilizado neste trabalho e o resíduo de óleo vegetal, utilizado por Rufino *et al*. (2014), apresentaram os maiores rendimentos.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

3.2.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A CMC é um parâmetro crucial quando se trata da caracterização de biossurfactantes, pois indica qual é a concentração mínima necessária de biossurfactante em solução para que ocorra um abaixamento máximo de tensão superficial e interfacial, ou seja, quanto menor a CMC, mais eficiente é o biossurfactante (MEIRA, 2007).

A Figura 35 ilustra o decaimento da transmitância em função da concentração do biossurfactante produzido a partir de glicerol bruto em semi-log. A CMC foi obtida a partir do ponto de interseção das duas curvas, cujo melhor ajuste foi em 1,77± 0,56g.L^{-1}.

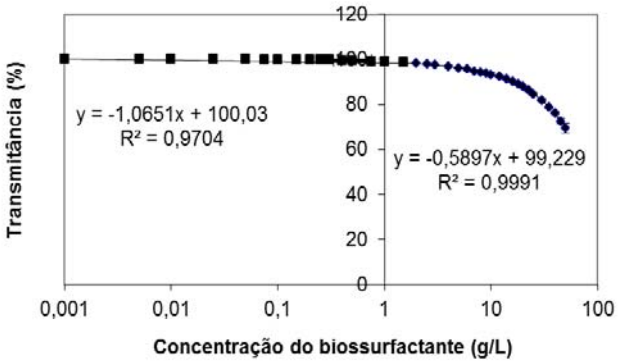


Figura 35. Decaimento da transmitância para em função das concentrações do biossurfactante produzido a partir da glicerina bruta antes (■) e depois (♦) da interseção das curvas.

A Figura 36 ilustra o decaimento da transmitância em função da concentração do biossurfactante produzido a partir do suco de cupuaçu em semi-log. A CMC foi obtida a partir do ponto de interseção das duas curvas, cujo melhor ajuste foi em 7,78± 0,33g.L^{-1}.

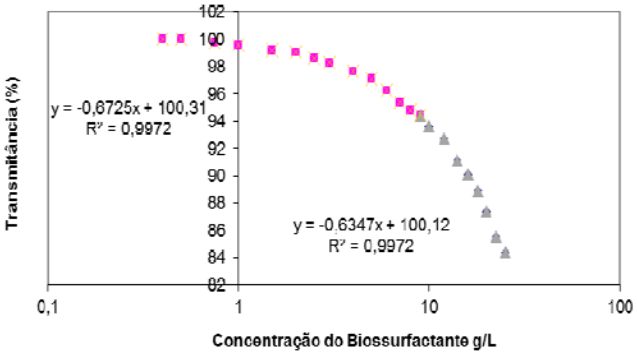


Figura 36. Decaimento da transmitância para em função das concentrações do biossurfactante produzido a partir de suco de cupuaçu clarificado (■) e depois (♦) da interseção das curvas.

Comparando-se ambos os resultados obtidos, observa-se que a CMC do biossurfactante produzido a partir de glicerol bruto (1,77 $g.L^{-1}$) foi menor do que a obtida com o biossurfactante produzido com o meio hidrofílico (7,78 $g.L^{-1}$), o que o torna um biossurfactante mais eficiente do que este, de acordo com Meira (2007). Agora é possível verificar que a maior diminuição da tensão superficial encontrada para o meio de cultivo contendo glicerol bruto pode estar, de fato, relacionada a melhores propriedades surfactantes do tensoativo produzido, e não necessariamente à quantidade de biossurfactante produzido.

Ferreira *et al*. (2017), ao produzir biossurfactante por *L. paracasei* utilizando meio de cultivo contendo glicose (33 $g.L^{-1}$), milhocina (10 $g.L^{-1}$) e extrato de lêvedo (10 $g.L^{-1}$), obtiveram CMC da ordem de 1,35 $g.L^{-1}$, valor próximo ao encontrado para o biossurfactante produzido com glicerol bruto (1,77 $g.L^{-1}$), indicando que os carboidratos simples também são substratos a partir dos quais é possível sintetizar biossurfactantes com boa eficiência.

Souza *et al*. (2014), ao produzirem moléculas com propriedades surfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 a partir de meio salino, encontraram CMC de 28,2 $mg.L^{-1}$, indicando que a salinidade do meio pode ser um fator favorável no aumento da eficiência de biossurfactantes.

Tabela 16. Exemplos de surfactantes e suas respectivas CMCs

Surfactante	**CMC ($g.L^{-1}$)**	**Referência**
Produzido por *Y. lipolytica* utilizando glicerol bruto como matéria-prima	1,77	Presente trabalho
Produzido por *Y. lipolytica* utilizando suco de cupuaçu como matéria-prima	7,78	Presente trabalho
Produzido por *Y. lipolytica* utilizando suco de caju como matéria-prima	7,85	Ramos (2013)
SDS (Dodecil sulfato de sódio)	2,10	Kile e Chlou (1989)
Produzido por *L. paracasei* utilizando glicose e milhocina matéria-prima	1,35	Ferreira *et al*. (2017)
Goma Arábica	1,65	Amaral *et al.* (2006)
Yansan	0,50	Amaral *et al.* (2006)
Goma Xantana	0,30	Amaral *et al.* (2006)
Triton X-405 (TX405)	0,62	Kile e Chlou (1989)

A Tabela 16 apresenta alguns surfactantes naturais e sintéticos, suas respectivas CMCs. Pode-se observar que a CMC do biossurfactante produzido pela *Y. lipolytica* utilizando glicerol bruto como fonte de carbono apresentou valor de CMC próximo ao surfactante natural Goma Arábica e ao produzido por Ferreira *et al*. (2017), enquanto o biossurfactante produzido a partir de CCJ apresentou uma CMC próxima àquela obtida por Ramos (2013), utilizando suco de cupuaçu como matéria-prima.

3.2.2. Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração média de proteína encontrada nos biossurfactantes produzidos é apresentada na Tabela 17.

Tabela 17. Concentração de proteínas do biossurfactantes produzidos.

Biossurfactante	Concentração de PTN (%)
Cupuaçu	2,6 ± 0,2
Glicerol Bruto	13,8 ± 1,6

Pode-se observar na Tabela 17 que a concentração de proteínas encontrada para o biossurfactante produzido a partir de meio de cultivo contendo suco de cupuaçu (2,6%) foi relativamente menor do que aquela obtida para o biossurfactante produzido a partir de glicerina bruta (13,8%). Amaral *et al*. (2006), ao analisarem o teor de proteínas do Yansan, produzido a partir de glicerol PA, encontraram 15%, valor próximo ao encontrado para o biossurfactante produzido a partir do glicerol bruto. Rufino *et al*. (2014) encontraram teor de proteínas de 50% para o biossurfactante produzido por *Y. lipolytica* a partir de resíduo de óleo vegetal.

3.2.3. Determinação da Concentração de Açúcares Totais

A concentração média de açúcares totais para ambos os biossurfacantes produzidos é apresentada na Tabela 18.

Tabela 18. Concentração de carboidratos totais do biossurfactantes produzidos.

Biossurfactante	Concentração de AT (%)
Cupuaçu	17,7 ± 1,1
Glicerol Bruto	21,2 ± 3,0

Pode-se observar na Tabela 18 que a quantidade de açúcares totais encontrada no biossurfactante produzido a partir de meio de cultivo contendo suco de cupuaçu clarificado (17,7%) foi ligeiramente menor do que aquela encontrada para o biossurfactante produzido a partir do substrato proveniente do biodiesel (21,2%).

Rufino *et al*. (2014) encontraram teor de carboidratos de 8% para o biossurfactante produzido por *Y. lipolytica* a partir de resíduo de óleo vegetal, valor significativamente inferior ao encontrado neste trabalho.

Sarrubo *et al*. (2001), ao produzirem biossurfactante por *Y. lipolytica* na presença de glicose, encontraram 45% de carboidratos, basicamente o dobro dos resultados encontrados.

No entanto, estes resultados são significativamente inferiores àqueles encontrados por Bueno *et al*. (2010), no qual os autores encontraram 80,4% de açúcares redutores totais ao produzir tensoativos pela bactéria *Bacillus pumilus* utilizando sacarose e açúcar de cana como fontes de carbono. Todavia, devido à natureza naturalmente açucarada do meio de cultivo utilizado no referido trabalho, este resultado já poderia ser esperado, uma vez que a composição do biossurfactante está intimamente ligada ao meio de cultivo em que este é produzido (FONTES *et al*., 2008).

Ainda segundo Fontes *et al*. (2008), 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.

3.4. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES

Os resultados do DCCR encontram-se na

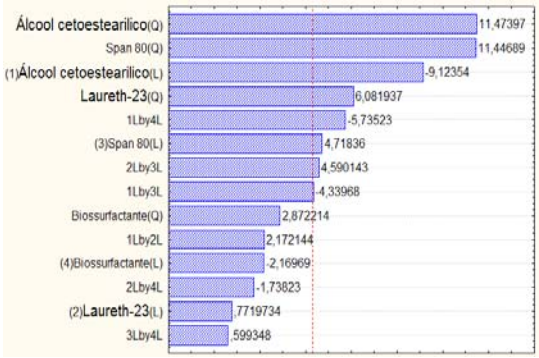
Tabela 19, onde se pode observar que a emulsão que apresentou o menor diâmetro médio de micelas após uma semana de produção e que se manteve, portanto, como a mais estável, foi a amostra 27.

A magnitude dos efeitos estimados de cada variável é apresentada no diagrama de Pareto (Figura 37). Com os resultados da análise estatística, confirmou-se que as variáveis que apresentaram maior efeito sobre o diâmetro médio das micelas foram o Span-80 e o álcool cetoestearílico. A concentração de biossurfactante não foi estatisticamente significativa na faixa estudada, mostrando que, nesta faixa, o biossurfactante não influenciou no diâmetro médio das micelas.

Tabela 19. Matriz do 1º planejamento experimental com os valores reais e respectivos resultados para o diâmetro médio das micelas após 7 dias de produção da emulsão cosmética.

Emulsão	**Álcool cetoest. (g/L)**	**Laureth-23 (g/L)**	**Span-80 (g/L)**	**Biossurf. (g/L)**	**Diâmetro médio (nm)**
1	25	27,5	5	0	1.026,65
2	4,15	4,6	0,625	2	2.564,50
3	12,45	4,6	0,625	2	1.263,00
4	4,15	13,8	0,625	2	1.574,50
5	12,45	13,8	0,625	2	2.744,00
6	4,15	4,6	1,87	2	650,95
7	12,45	4,6	1,87	2	2.436,00
8	4,15	13,8	1,87	2	2.511,50
9	12,45	13,8	1,87	2	2.302,50
10	4,15	4,6	0,625	10	677,05
11	12,45	4,6	0,625	10	1.726,00
12	4,15	13,8	0,625	10	917,40
13	12,45	13,8	0,625	10	2.123,00
14	4,15	4,6	1,87	10	1.775,50
15	12,45	4,6	1,87	10	2.403,00
16	4,15	13,8	1,87	10	1.593,00
17	12,45	13,8	1,87	10	2.534,50
18	0	9,2	1,25	6	1.079,50
19	16,6	9,2	1,25	6	1.109,15
20	8,3	0	1,25	6	1.111,20
21	8,3	18,4	1,25	6	1.987,50
22	8,3	9,2	0	6	1.619,50
23	8,3	9,2	2,5	6	778,50
24	8,3	9,2	1,25	0	612,25
25	8,3	9,2	1,25	12	703,02
26	8,3	9,2	1,25	6	668,55
27	8,3	9,2	1,25	6	429,05

Ainda na Figura 37, encontra-se a análise de variância, que mostra que o modelo estatístico selecionado (nesse caso, possui termos lineares, quadráticos e a interação dos termos lineares) para a variável de resposta diâmetro médio é significativo, como foi evidenciado pelo teste F. Desta forma, foi possível gerar uma superfície de resposta (Figura 38).



(1)

R-sqr=.99571; Adj:.99071

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Álcool cetoestearílico(L)	1745756	1	1745756	11045,68	0,000091
Álcool cetoestearílico(Q)	2517511	1	2517511	15928,70	0,000063
(2)Laureth-23(L)	38	1	38	0,24	0,672762
Laureth-23(Q)	611563	1	611563	3869,46	0,000258
(3)Span 80(L)	408224	1	408224	2582,90	0,000387
Span 80(Q)	2504630	1	2504630	15847,19	0,000063
(4)Biossurfactante(L)	5480	1	5480	34,67	0,027650
Biossurfactante(Q)	4002	1	4002	25,32	0,037294
1L by 2L	875	1	875	5,53	0,142965
1L by 3L	497489	1	497489	3147,70	0,000318
1L by 4L	783884	1	783884	4959,76	0,000202
2L by 3L	393368	1	393368	2488,90	0,000402
2L by 4L	875	1	875	5,53	0,142965
3L by 4L	3337	1	3337	21,12	0,044239
Lack of Fit	36347	10	3635	23,00	0,042371
Pure Error	316	2	158		
Total SS	8553355	26			

(2)

Figura 37. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do DCCR 2^4 (1) e ANOVA com modelo ajustado para o diâmetro médio das micelas (2).

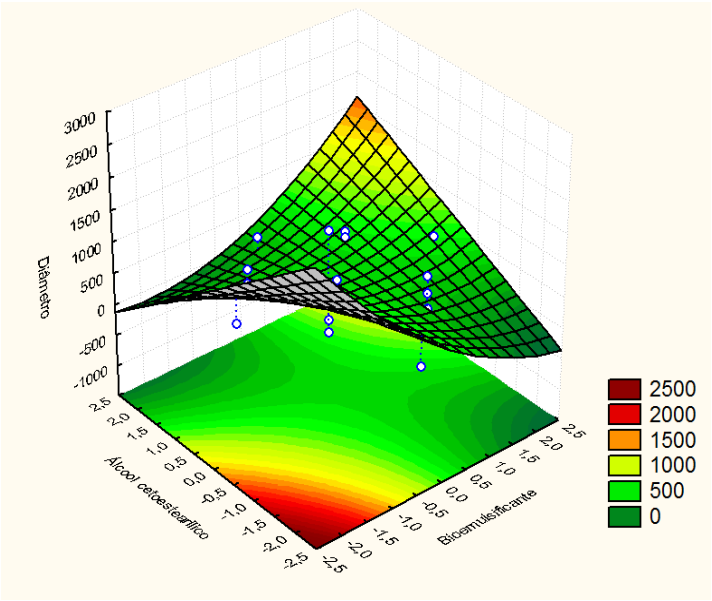


Figura 38. Superfície de resposta da variável diâmetro médio em relação em relação à concentração de span 80 e álcool cetoestearílico.

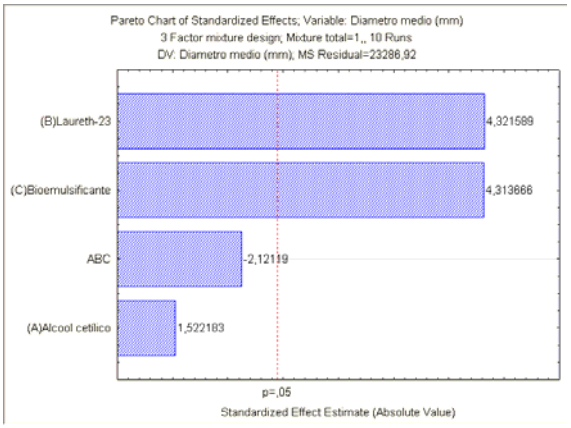
Com base nos resultados obtidos no primeiro planejamento, um planejamento de misturas foi realizado, aumentando-se a concentração total dos parâmetros avaliados, e fixando-se a concentração de Span-80 em 1,25 $g.L^{-1}$, em busca de melhores resultados. Assim, os níveis dos parâmetros avaliados, bem como os resultados do diâmetro médio após uma semana de produção das emulsões, encontram-se na Tabela 20.

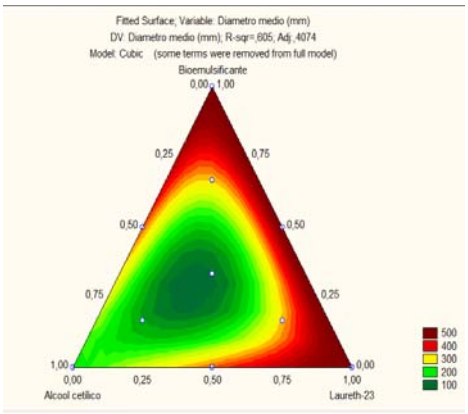
Tabela 20. Matriz do segundo planejamento experimental com os valores reais e respectivos resultados para o diâmetro médio das micelas após 7 dias de produção da emulsão cosmética.

Emulsão	Álcool Cetílico ($g.L^{-1}$)	Laureth-23 ($g.L^{-1}$)	Biossurf. ($g.L^{-1}$)	Diâmetro médio (nm)
1	0,00	0,00	50,00	396,26
2	50,00	0,00	0,00	188,12
3	0,00	50,00	0,00	552,24
4	25,00	0,00	25,00	492,54
5	0,00	25,00	25,00	700,00
6	25,00	25,00	0,00	204,32
7	16,67	16,67	16,67	227,22
8	8,33	8,33	33,33	192,46
9	33,33	8,33	8,33	114,52
10	8,33	33,33	8,33	171,52

De acordo com a Tabela 20, nota-se que a emulsão que apresentou o menor diâmetro médio e que foi, portanto, a mais estável, foi a amostra 9. Isto sugere que esta combinação dos parâmetros avaliados é capaz de produzir emulsões estáveis.

A magnitude dos efeitos estimados de cada variável no 2º planejamento é apresentada no diagrama de Pareto (Figura 39), onde se observa que tanto o biossurfactante quanto o Laureth-23 foram mais estatisticamente significativos para o tamanho do diâmetro médio das micelas nestes experimentos, dentro da faixa de concentração estudada. O diagrama também mostra que a concentração de álcool cetílico não foi estatisticamente significativa na faixa estudada, evidenciando que, nesta faixa, o álcool cetílico não influenciou estatisticamente no diâmetro médio das micelas. Na Figura 39, estão presentes ainda a curva de contorno que relaciona as 3 variáveis analisadas e o teste F, que evidencia que o modelo estatístico selecionado para a variável de resposta diâmetro médio foi significativo.





(1) (2)

Factor	Coeff.	Std.Err.	t(6)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
(A)Alcool cetilico	179,93	118,204	1,52218	0,178788	-109,3	469,162
(B)Laureth-23	510,83	118,204	4,32159	0,004974	221,6	800,063
(C)Bioemulsificante	509,89	118,204	4,31367	0,005017	220,7	799,126
ABC	-8239,92	3884,575	-2,12119	0,078155	-17745,1	1265,289

(3)

Figura 39. Diagrama de Pareto para estimar o efeito de cada variável no planejamento de misturas (1), curva de contorno (2) e teste F.

Para o teste de otimização (Tabela 21), adotou-se uma concentração fixa de álcool cetílico de 30 g.L^{-1}, baseando-se no planejamento anterior. Desta vez, obteve-se como emulsão mais estável a amostra 4 (150,64 nm) que apresentou maior diâmetro médio de micelas do que a amostra 9 do planejamento anterior, o que significa que uma pequena diminuição na quantidade de álcool cetílico pode resultar em uma menor estabilidade da emulsão.

Tabela 21. Matriz do teste de otimização com os valores reais e respectivos resultados para o diâmetro médio das micelas após uma semana de produção da emulsão cosmética.

Emulsão	Laureth-23 (g.L^{-1})	Biossurf. (g.L^{-1})	Diâmetro médio (nm)
1	0	20	156,43
2	4	16	165,04
3	8	12	167,70
4	12	8	150,64
5	16	4	221,55
6	20	0	320,14

Tabela 19 e Tabela 20, nota-se que o menor diâmetro médio de micela obtido se deu a partir da emulsão 9 (Figura 40) do planejamento de misturas (D_m = 114,52 nm), que continha as seguintes concentrações dos parâmetros avaliados: álcool cetílico (33,5

g.L^{-1}), Laureth-23 (8,5 g.L^{-1}), Span-80 (1,25 g.L^{-1}) e biossurfactante (8 g.L^{-1}). Esta emulsão foi, portanto, considerada a formulação cosmética mais estável e serviu como base para o estudo comparativo da estabilidade de emulsões.

Figura 40. Emulsão 9 do planejamento de misturas, avaliada como a emulsão produzida mais estável (D_m = 114,52 nm).

3.5. ANÁLISE COMPARATIVA DE ESTABILIDADE DE EMULSÕES

A estabilidade de uma emulsão pode ser estudada através da evolução do tamanho de micelas. O aumento no diâmetro médio de micela é um indicador da perda de estabilidade da emulsão (McCLEMENTES, 1999).

A estabilidade de emulsão por medida de diâmetro médio de micela (D_m) para as emulsões contendo os dois biossurfactantes produzidos e para a emulsão padrão (sem conter biossurfactante) foi avaliada pelo período de 4 semanas de armazenamento. Os resultados desta análise para as 3 emulsões produzidas se encontram na Tabela 22.

Tabela 22. Diâmetro médio das micelas medidos em Zetasizer para os tempos de 24h, 1 semana, 3 semanas e 4 semanas de armazenamento a 25ºC.

	Diâmetro médio (nm)			
Emulsão	**T_{24h}**	**$T_{1semana}$**	**$T_{3semanas}$**	**$T_{4semamas}$**
Cupuaçu	158,10±12,45	193,58±21,33	252,23±17,16	127,40±15,18
Glicerol	202,68±19,96	209,88±30,00	245,90±1,41	248,64±11,20
Padrão	143,70±42,71	170,01±167,15	172,92±44,94	107,33±80,07

Pode-se observar na Tabela 22 que as emulsões produzidas seguem comportamentos distintos em termos de perda de estabilidade: enquanto a emulsão produzida com glicerol bruto apresentou um aumento linear no tamanho do diâmetro médio das micelas ao fim do período de um mês de produção (ΔD_m= 45,96 nm), as

emulsões contendo biossurfactante de CCJ e Padrão apresentaram resultados inesperados para ΔD_m (-30,7 e -36,37 nm, respectivamente). Dessa forma, este experimento deverá ser repetido, pois a diminuição do D_m nesse caso não é um indicador de ganho de estabilidade, mas sim resultado de algum possível erro experimental ou de fatores externos, que podem ter influenciado no resultado dessa análise.

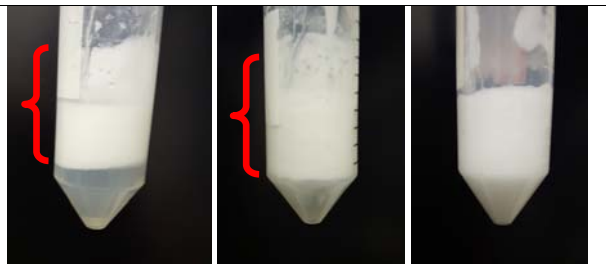
Em virtude desse resultado, o diâmetro médio de micelas foi avaliado até o tempo de 3 semanas de produção das emulsões. Assim, para a emulsão contendo biossurfactante de CCJ, observou-se o maior ΔD_m dentro deste intervalo (83,40 nm), indicando que esta emulsão se mantém estável por menos tempo do que as demais. Pode-se observar também que, para a emulsão Padrão, em geral, todos os tempos apresentaram um desvio padrão relativamente alto, o que pode indicar que esta emulsão apresenta um elevado índice de polidispersão entre os diâmetros das micelas ou que estes resultados também deverão ser repetidos.

Para a emulsão contendo biossurfactante de Glicerol, observou-se que, apesar de esta apresentar o maior diâmetro médio das primeiras 24h, ela apresentou o menor ΔD_m no tempo de 1 semana de produção (5,2 nm), enquanto a emulsão Padrão e a produzida com biossurfactante de CCJ obtiveram ΔD_m bem maiores neste mesmo período de tempo (26,31 e 35,48 nm, respectivamente). Isto indica que esta emulsão se manteve mais estável do que as outras por um período de uma semana de armazenamento.

Normalmente, com o decorrer do tempo, ocorre a separação das fases constituintes de uma emulsão (perda da estabilidade). Porém, algumas emulsões permanecem estáveis por longos períodos de tempo, por estas possuírem componentes mais resistentes aos processos de quebra de emulsão (KLINK *et al*, 2010; SCHRAMM, 2006).

Os resultados dos diâmetros médios das micelas apresentados na Tabela 22 estão condizentes com as análises visuais das emulsões, ilustradas na Tabela 23, onde se pode observar que, nas primeiras 24h de produção, as 3 emulsões se encontram estáveis. Porém, após uma semana de produção, a emulsão contendo biossurfactante de CCJ já apresentou quebra de fases, fato que ocorreu com a emulsão formada a partir do glicerol bruto apenas após 3 semanas de produção da emulsão, indicando que esta emulsão se apresenta estável por um maior período de tempo do que a primeira. A emulsão Padrão, todavia, não apresentou quebra de fases ainda dentro deste período, sendo considerada, portanto, a mais estável entre as 3.

Tabela 23. Fotografia das 3 emulsões estudadas nos tempos de 24h, 1 semana e 3 semanas.

Tempo	Cupuaçu | Glicerol | Padrão
24 horas	
1 semana	
3 semanas	

Ferreira *et al*. (2017), ao produzirem emulsões cosméticas O/A com o biossurfactante produzido a partir de *L. paracasei* em IKA T25 digital Ultra-Turrax® (18.000 rpm) por 2 min, encontraram diâmetro médio de micelas de 199 nm após uma semana de produção, valor semelhante ao do biossurfactante produzido a partir de glicerol bruto, neste trabalho (209,88 nm). Os autores também utilizaram Zetasizer Nano-ZS (*Malvern Instruments*) à temperatura ambiente (~25ºC) para a realização das medições.

Dentre os dois biossurfactantes analisados, portanto, o produzido a partir do glicerol bruto apresentou melhor capacidade para estabilizar emulsões do que o produzido a partir de CCJ, embora os dois apresentem potencial para serem aplicados na indústria cosmética. Para tal, novos testes de estabilidade devem ser realizados.

4. CONCLUSÕES

- ✓ De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que, tanto o glicerol bruto, proveniente da produção do biodiesel, quanto o suco de cupuaçu clarificado, são matérias-primas adequadas para a produção de biossurfactante a partir da levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682;
- ✓ Os biossurfactantes produzidos apresentam açúcares e proteínas em sua composição;
- ✓ O biossurfactante produzido a partir de glicerol bruto proporcionou uma maior diminuição na tensão superficial (22 mN/m) e um maior índice de emulsificação (70,22%) do que o produzido a partir de CCJ, além de ter apresentado uma menor CMC (1,77 $g.L^{-1}$). Esses resultados mostram que o biossurfactante produzido a partir do glicerol bruto apresentou melhores propriedades surfactantes do que o produzido utilizando CCJ.
- ✓ Através dos planejamentos de experimento, foi possível obter algumas emulsões que se mantiveram estáveis após uma semana de produção, dentre as quais, a mais estável foi a emulsão 9 (Dm = 114,54 nm), que foi considerada a formulação ótima para a produção das emulsões.
- ✓ Através da análise de estabilidade de emulsão por diâmetro médio de micela por 4 semanas de armazenamento, observou-se que a emulsão produzida com biossurfactante a cuja matéria-prima foi CCJ perdeu a estabilidade mais rapidamente do que as demais. A emulsão Padrão foi avaliada como a emulsão mais estável das 3, enquanto a emulsão produzida a partir do biossurfactante proveniente do glicerol bruto apresentou estabilidade intermediária entre as duas primeiras.

A partir dos resultados obtidos, foi possível realizar a produção e a caracterização parcial de biossurfactantes por *Y. lipolytica* utilizando matérias-primas de origem renovável. O biossurfactante produzido a partir de glicerol bruto apresentou boas propriedades surfactantes, o que o identifica como um possível composto tensoativo natural para ser aplicado futuramente em emulsões cosméticas, porém, para que isso seja possível, novos estudos de caracterização deverão ser realizados.

Os estudos de estabilidade de emulsão com os biossurfactantes produzidos podem ser analisados como o primeiro passo para a inserção dos mesmos em aplicações cosméticas, pois mostraram que ambos apresentam potencial para serem aplicados como agentes estabilizadores de emulsões, embora novos estudos de estabilização de emulsões necessitem ser realizados.

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Realizar uma caracterização da polpa de cupuaçu utilizada;
- ✓ Realizar novos estudos de caracterização para os biossurfactantes produzidos, como o potencial zeta, o ângulo de contato e o balanço HBL;
- ✓ Analisar a quantidade de lipídeos dos biossurfactantes;
- ✓ Investigar os grupos funcionais presentes nos biossurfactantes, bem como suas estruturas moleculares através de análises em FT-IR e RMN;
- ✓ Encontrar a CMC por meio da tensão superficial e comparar os resultados com os obtidos pela titulação turbidimétrica;
- ✓ Estudar a reologia dos biossurfactantes;
- ✓ Realizar um experimento em um biorreator, com a finalidade de aumentar a escala de produção;
- ✓ Produzir as emulsões por meio de Turbiscan;
- ✓ Realizar um estudo de estabilidade de emulsões por análise digital de imagem e por potencial Zeta;
- ✓ Avaliar o potencial de aplicação dos biossurfactantes na indústria de cosméticos;
- ✓ Avaliar a viabilidade econômica dos biossurfactantes produzidos;
- ✓ Como melhorar a performance dos biossurfactantes na estabilização de emulsões.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABED, M.A.; SAXENA, A.; BOHIDAR, H.B. Micellization of alpha-olefin sulfonate in aqueous solutions studied by turbidity, dynamic light scattering and viscosity measurements. Colloids Surface A: Physicochemistry Engineering Aspects, v. 233, n. 1, p. 181-187, 2004.

AHIMOU, F.; JACQUES P.; DELEU, M. Surfactin and iturin effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. Enzyme and Microbial Technology, v. 27, p.749–754, 2000.

AKIYODE, O.; GEORGE, D.; GETTI, G.; BOATENG, J. Systematic comparison of the functional physico-chemical characteristics and biocidal activity of microbial derived biosurfactants on blood-derived and breast cancer cells. Journal of Colloid and Interface Science, n. 479, p. 221-233, 2016.

ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ALVES, R.M. Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânicoa-agronômicos. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

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, n. 8, p. 1894-1898, 2006.

ANDRADE, W.D.C. A emergência da agroindústria de processamento de frutas no Nordeste Paraense, Região Metropolitana de Belém e no Marajó: uma análise do potencial da capacidade produtiva e inovativa sob a ótica de Arranjo e Sistema Produtivo e Inovativo Local – ASPL. Dissertação de Mestrado, UFPA - NAEA, Belém/PA, 2004.

ANJUM, F.; GAUTAM, G.; EDGARD, G.; NEGI, S. Biosurfactant production through *Bacillus sp*. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. Bioresource Technology, n. 213, p. 262–269, 2016.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Séries Temáticas. Qualidade, v. 1, Brasília. 52 p., 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira, 5. Ed. v. 2. Brasília , 2010.

ARAÚJO, F. Tensão superficial. 2013. Disponível em: < http://fisicacomentada.blogspot.com.br/2013/01/tensao-superficial.html>, acessado em 10/08/2017.

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. Revista Analytica, n. 26, p. 56-62, 2007.

AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêutica. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 677 p., 2005.

AZEVEDO, J.O. Correlação entre tamanhos de gotas, propriedades reológicas e estabilidade elétrica de emulsões de água em óleo: um estudo aplicado a fluidos de perfuração. Monografia de graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2016.

BACCIOTTI, F. Fisiologia e formação de partículas lipídicas durante o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Dissertação de mestrado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2015.

BALAN, S.S.; KUMAR, C.G.; JAYALAKSHMI, S. Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: purification, characterization and its biological evaluation. Microbiological Research, n. 194, p. 1–9, 2017.

BANAT, I.M; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl Microbiol Biotechnol, n. 87, p. 427–444, 2010.

BANAT, L.M., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Potencial Commercial application of microbial surfactants. Applied Microbiol Biotechnol, v. 53, p. 495-508, 2000.

BANKAR A.V.; KUMAR A.R.; ZINJARDE S.S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol, n. 84, p. 847–65, 2009.

BAPTISTA, S.J. Avaliação do emprego de biossurfactante na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2007.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. Environment International, v. 26, n 5–6, p. 413–416, 2001.

BARBOSA, S.A. Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biossurfactantes como matéria-prima. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju/SE, 2011.

BARROS, F.F.C.; DE QUADROS, C.P.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

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

BEZERRA, M.S. Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J-M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolismin yeasts and its impact on biotechnological processes. Appl. Microbiol. Biot, v. 90, p. 1193–1206, 2011.

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

BONI, L.A.B. Tratamento da glicerina bruta e subprodutos obtidos da reação de transesterificação de sebo bovino utilizada para a produção de biodiesel. Dissertação de Mestrado, Universidade Luterana do Brasil, 2008.

BORGES, W.S. Aproveitamento de efluente gorduroso gerado por abatedouro e frigorífico para produção de biossurfactante. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais/MG, 2011.

BOUCHEDJA, D.N.; DANTHINE, S.; KAR, T.; FICKERS, P.; BOUDJELLA, A.; DELVIGNE, F. Online flow cytometry, an interesting investigation process for monitoring lipid accumulation, dimorphism, and cells' growthin the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* JMY 775. Bioresour. Bioprocess, n. 4:3, 2017.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUENO, S.M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de São José do RioPreto/SP, 2008.

CAENN, R.; DARLEY, H.C.H.; GRAY, G.R. Composition and properties of drilling and completion fluids. 6th ed. Amsterdam; London: Gulf Professional, 2011.

CARA, D.V.C. Produção de biossurfatante por *Flavobacterium sp*. a partir de óleo de soja residual e fertilizante comercial. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2009.

CENTENO, J.A.; GARABAL, J.I.; DO CAMPO, F.; LORENZO, J.M.; CARBALLO, J. Recovering traditional raw-milk Tetilla cheese flavour and sensory attributes by using *Kocuriavarians* and *Yarrowia lipolytica* adjunct cultures. International Journal of Food Microbiology, n. 25, p. 33–40, 2017.

CHAMANROKH, P.; ASSADI, M.M.; AMOABEDINY, G.; RASHEDI, H. Cleaning oil-contaminated vessel by emulsan producers (*Autochthonous Bacteria*). Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng., v. 7, n. 3, p. 209-222, 2010.

CHANAMAI, R.; MCCLEMENTS, D.J. Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 172, n. 1–3, p. 79-86, 2000.

CHAMPION, J.T.; GILKEY, J.C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R.M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH,

cadmium and octadecane. Journal of Colloid and Interface Science, v. 170, p. 569-574, 1995.

CHÁVEZ, J.D.R. Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2008.

CHORILLI, M; UDO, M.S.; CAVALLINI, M.E.; LEONARDI, G.R.; Desenvolvimento e estudos preliminares de estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo Granlux GAI-45 TS®. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.27, n.3, p. 267-264, 2006.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. A review - Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. Journal of Applied Microbiology, v. 93, p. 915-929, 2002.

CLEMENT, C.R.; CRISTO-ARAÚJO, M.; D'EECKENBRUGGE, G.C.; PEREIRA, A.A.; PICANÇO-RODRIGUES, D. Origin and domestication of native Amazonian crops. Diversity, Basileia, v. 2, n. 1, p. 72-106, 2010.

COELHO, M.A.Z.; AMARAL, P.F.F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Méndez-Vilas, A. (ed.), Formatex Research Center, v. 2, p. 930-944, 2010.

COHEN, K.O.; JACKIX, M.N.H. Características Químicas e Física da Gordura de Cupuaçu e da Manteiga de Cacau. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Cerrados, 22 p., Planaltina/DF, 2009.

COLOMÉ, L.M.; RAFFIN, R.P.; ASSUMPÇÃO, E.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Theospheres Based on *Theobroma Grandiflorum* Seed Butter: Development of Innovative Nanoparticles for Skin Application. **Soft Materials**, v. 8, n. 2, p. 72–88, 2010.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacilllus* species. Applied and Environmental Microbiology, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

CORDEIRO, C.M.M. Caracterização de biossurfactante produzido pela cepa *Serratia sp*. obtido a partir de diferentes condições demeio de cultivo visando sua aplicação na redução de tensão superficial e captação de metais pesados. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2006.

DA SILVA, M.T.S.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. SANTANA, C.C. Integral production and concentration of surfactin from *Bacillus sp*. ITP-001 by semi-batch foam fractionation. Biochemical Engineering Journal, v. 104, p. 91-97, 2015.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; AND VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. Enzymology Microbiology Technology, v. 25, p. 322-329, 1999.

DE ARAUJO, L.V.; FREIRE, D.M.G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. Quím. Nova, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.

DE AZEVEDO, A.B.A.; KOPCAK, U.; MOHAMED R.S. Extraction of fat from fermented Cupuaçu seeds with supercritical solventes. J. of Supercritical Fluids, n. 27 p. 223-237, 2003.

DE LIMA, J.R.C. Produção de bioprodutos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 a partir de glicerol bruto proveniente dobiodiesel de soja. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

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

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocolloids, v. 17, n. 1, p. 25-39, 2003.

DO NASCIMENTO, F.V. Produção de eritritol por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em sistemas miniaturizados. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2016.

DOMÍGUEZ, A.; FERMINAN, E.; GAILLARDIN, C. *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. Contributions to Microbiology, v. 5, p. 151-172, 2000.

DUARTE, S.H. Utilização do glicerol bruto proveniente da síntese do biodiesel para produção de lipídeos por leveduras silvestres. Dissertação de Mestrado. UNICAMP, Campinas/SP, 2011.

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

DUTRA, K.R. Transição dimórfica em *Yarrowia lipolytica*: ação da auxina e óxido nítrico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes/RJ, 2010.

FAKHRUDDIN, S.S. Biosurfactant: Production and Application. J Pet Environ Biotechnol, p. 3-4, 2012.

FARIAS, C.B.B.; SARUBBO, L.A.; *3ª Semana de Integração Universidade Sociedade – 3º SIUS e 7ª Jornada de Iniciação Científica*, Pernambuco, Brasil, 2006.

FERRAZ, I.D.K.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; CALVI, G.P.; FARIAS, D.L. Critérios morfológicos e temperatura para avaliação da germinação das sementes de cupuaçu. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal/SP, v. 34, n. 3, p. 905-914, 2012.

FERREIRA, A.; VECINO, X.; FERREIRA, D.; CRUZ, J.M.; MOLDES, A.B.; RODRIGUES, L.R. Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant rom *Lactobacillus paracasei*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, n. 155, p. 522–529, 2017.

FERREIRA, J.P.M. Tensão superficial – sua natureza e efeitos. Boletim n° 93. Sociedade Portuguesa de Química, p. 43-48, 2004.

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

FIECHTER, D. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends in Biotechnology, v.10, p. 208-216, 1992.

FONSECA, A.; PRISTA, L.N. Manual de Terapêutica Dermatológica e Cosmetologia. São Paulo, SP, 2000.

FONTES, G.C.S. Produção de biossurfactantes por *Yarrowia lipolytica.* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

FONTES, G.C.S.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante por levedura. Química Nova, 2008.

FONTES, G.C.S.; RAMOS, N.M.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, MA.Z. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 29, n. 3, p. 483-493, 2012.

FOX, C. Rationale for the seletion of emulsifying agents. Cosmet Toiletries, v. 101, p. 25-44, 1986.

FRANCY, D.S.; THOMAS, J.M.; RAYMOND, R.L.; WARD, C.H.; J. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. Journal of Industrial Microbiology, v. 8, 237, 1991.

FRANGE, R.C.C.; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. Rev Ciênc Farm Básica Apl., v. 30, n. 3, p. 263-271, 2009.

FREITAS, F.; ALVES V.D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. Carbohydrate Polymers, v. 78, p. 549-556, 2009.

GARCIA, Y. BIOQUIMICA 108, 2010. Disponível em: <http://bioquimicauabc108.blogspot.com.br/2010/04/jueves-15-de-abril-del-2010.html>, acessado em 15/06/17.

GARCIA, M.M.T. Avaliação da estabilidade do extrato hidrossolúvel de soja enriquecido de cálcio e vitaminas C e D através do processamento digital de imagens. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2008.

GENNARO, A.R. Remington: a ciência e a prática da farmácia 20º Ed. Buenos Aires, 2228p., 1999.

GIRALDO-ZUNIGA, A.D.; ARÉVALO-PINEDO, A.; SILVA, A.F.; SILVA, P. F.; VALDES-SERRA, J.C.; PAVLAK, M.C.M. Datos experimentales de la cinética Del secado y del modelo matemático para pulpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) enrodajas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 30 n.1, p. 179-182, 2010.

GONDIM, T.M.S.; THOMAZINI, M.J.; CAVALCANTE, M.J. B.; SOUZA, J.M.L. Aspectos da produção do cupuaçu. Rio Branco: Embrapa Acre, 43 p. (Embrapa Acre. Documentos; 67), 2001.

GOUVEIA, E.R.; LIMA, D.P.A.; DUARTE, M.S.; LIMA, G.M.S.; ARAÚJO, J.M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, ed. 30, p. 39-45, 2003.

GROENEWALD, M.; BOEKHOUT, T.; NEUVÉGLISE, C.; GAILLARDIN, C.; VAN DIJCK, P.W.M.; WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Crit Rev Microbiol, n. 40, v. 3, p. 187–206, 2014.

GUDIÑA, E.J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. Trends Pharmacol. Sci., n. 34, p. 667, 2013.

GULLAPALLI, R.P.; SHETH, B.B. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. Eur J Pharm Biopharm, v. 48, n. 3, p 233-238, 1999.

GUSEV, A.I.; KHOKHLOV, A.R.; GOVORUN, E.N. Micelle. Glossary of nanotechnology and related terms. 2009. Disponível em: <http://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1199>. Acessado em 10/11/2016.

HASSAN, C.; REPICI A.; SHARMA, P.; CORREALE, L.; ZULLO, A.; BRETTHAUER, M.; SENORE, C.; SPADA, C.; BELLISARIO, C.; BHANDARI, P.; REX, D.K. Efficacy and safety of endoscopic resection of large colorectal polyps: a systematic review and meta-analysis. Gut.,v. 65, n. 5, 806-820, 2016.

HEWITT, P.G. Física Conceitual, 9ª edição. Ed. Bookman, 2002.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Vocabulário básico de recursos naturais e meio ambiente, 2ª Ed, 2004. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/vocabulario.pdf, acessado em 10/11/2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário,

2006.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 100, p. 260-265, 2005.

JARDINE, J.G.; DISPATO, I.; PERES, M.R. Considerações sobre Biodiesel como Biocombustível Alternativo ao Diesel. Documentos 93. Embrapa Informática Agropecuária Campinas, SP, 2009.

KHAN, A.H.A.; TANVEER, S.; ALIA, S.; ANEES, M.; SULTAN, A.; IQBAL, M.; YOUSAF, S. Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecological Engineering*, n. 104, p. 158–164, 2017.

KILE, D.E.; CHLOU, C.T. Water solubility enhancements of DDT and trichlorobenzene by some surfactants belowand above the critical micelle concentration. Environtal Science and Technology, v. 23, p. 832-838, 1989.

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

KIRK-OTHMER, E.T. Glycerol. In: American Society of Chemistry. Encyclopedia of chemical technology. 5ª Ed. New York: Edit. John Wiley, 2007.

KLINK, I. M.; PHILLIPS, R. J.; DUNGAN, S. R. Effect of emulsion drop-size distribution upon coalescence in simple shear flow: A population balance study. Journal of Colloid and Interface Science, v. 353, n. 2, p. 467-475, 2011.

KRONEMBERGER, F.A. Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2007.

KRZYCZKOWSKA, J.; KOZŁOWSKA, M. Effect of oils extracted from plant seeds on the growth and lipolytic activity of *Yarrowia lipolytica* yeast. J Am Oil Chem Soc, n. 94, p. 661–671, 2017.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: A Taxonomic Study. Fifth Ed. Amsterdam: Elsevier, p. 927–929, 2011.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v.45, p.2577-2585, 1999.

LANNES, S.C.S.; MEDEIROS, M.L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 39, n. 1, 2003.

LANNES, S.C.S.; MEDEIROS, M.L.; AMARAL, R.L. Formulação de "chocolate" de cupuaçu e reologia do produto líquido. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 38, n. 4, 2002.

LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO, T. M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. Enzyme and Microbial Technology, v.41, p. 292-295, 2007.

LIEBERMAN H.A., RIEGER M.M., BANKER, G.S. Pharmaceutical dosage forms: disperse systems. New York: Marcel Dekker, v. 2, 1989.

LIM, H.J.; LEE, Y.; KIM, H.B.; SHIN, S.S. Preparation and evaluation of polymer microspheres containing *Broussonetia kazinoki* root Extract. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, v. 39, p. 89-96. 2013.

LIMA, D.O.; SOGABE, V.P.; CALARGE, T.C. Mercado do biodiesel: um panorama mundial. Espacios, v.29, p.1-4, 2008.

LIN, S.C. Biosurfactans: Recent advances - review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 66, p. 109-120, 1996.

LEDESMA-AMARO, R.; NICAUD, J-M. Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. Trends in Biotechnology, v. 4, n. 10, 2016.

LOPES, A.S.; PEZOA-GARCÍA, N.H.; AMAYA-FARFÁN, J. Qualidade nutricional das proteínas de cupuaçu e de cacau. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, v. 28, n. 2, p. 263-268, 2008.

LOPES, J.R.M.; LUZ, E.D.M.N. Origem e caracterização do cupuaçuzeiro no Sul da Bahia. Magistra, Cruz das Almas - BA, v. 12, n. 1/2, 2000.

LUYTEN, K.; ALBERTYN, J.; SKIBBE, W.F.; PRIOR, B.A.; RAMOS, J.; THEVELEIN, J.M.; HOHMANN, S. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. EMBO Journal**,** v.14, p.1360-71, 1995.

MACHADO JUNIOR, F.R.S. Conversão por via biotecnológica de glicerina residual em biomassa de leveduras como fonte de proteínas e lipídios. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, RS, 2010.

MAIER, R.M. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. Advances in Applied Microbiology, v. 52, p. 101-121, 2003.

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S., An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbial Biotechnol, v. 58, p. 428-434, 2002.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem*, n. 22, p. 2280–2292, 2003.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. Química Nova, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in Biotechnol, n. 30, p. 558–565, 2012.

MARCHESE, D.A. Estudo do processo de obtenção do pó de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) alcalinizado. Dissertação de Mestrado (Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2002.

MARTINS, A.C.G. Valorização de borra de café através da produção de biossurfactantes. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2011.

MARTINS, V.B. Perfil sensorial de suco tropical de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum*) com valor calórico reduzido. Tese de Doutorado (Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 2008.

McCLEMENTES, D.J. Food Emulsions principles, practice, and techniques. London, Food Science Biochemistry Food Chemistry, v. 186, p. 249, 1999.

MEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. Technical aspects of production by transesterification: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.10, p.248-255, 2004.

MEIRA, J.A. Produção de biossurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2007.

MELLO, F.O.T.; PAULILLOS, L.F.; VIAN, C.E.F. O biodiesel no Brasil: panorama, perspectivas e desafios. Informações Econômicas, v. 37, n. 1, 2007.

MERCK. 104092 Glicerina. 2017. Disponível em: <http://www.merckmillipore.com>, acessado em 15/08/17.

MESQUITA, A.C. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns componentes recalcitrantes. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

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

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochimica *et* Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1488, n. 3, p. 211-218, 2000.

MORRISON, L.R. Glycerol, in encyclopedia of chemical technology. New York, United States, p. 921–32, 2000.

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

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Rapid quantification of a microbial surfactant by a simple turbidometric method. Journal of Microbiological Methods, n. 76, p. 38–42, 2009.

MULLIGAN, C.N. Enviromental applications for biosurfactants. Environ. Pollut, n. 133, p. 183–198, 2005.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. Current Science, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.

NICAUD, J.-M.; MADZAK, C.; VAN DEN BROEK, P.; GYSLER, C.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P.; GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS yeast research, v. 2, n. 3, p. 371–379, 2002.

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

NUNES, P.M.B. Estudo do efeito do farnesol sobre a morfologia celular de *Yarrowia lipolytica*. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

OECD SIDS Initial Assessment Report, Glycerol Cas No. 56-81-5. 2002. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/56815.pdf>, acessado em 14/05/17.

OLIVEIRA, J.S.; ANTONIASSI, R.; DE FREITAS, S.C.; MÜLLER, M.D. Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. Ciência Rural, v.43, n.3, p. 509-512, 2013.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. Quím Nova v. 7, n. 1, p. 131-138, 2004.

OOI, K.T.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z. Glycerol residue: a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. Journal of Oleo Science, v. 53, p. 29-33, 2004.

PAGLIARO, M.; ROSSI, M. The future of glycerol: new usages for a versatile raw material. RSC Green Chem Book Ser, Roma, Italy, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT. I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. Journal of Applied Microbiology, v. 92, p. 737-744, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. J. Chem. Technol. Biotechnol., v. 78, p. 542–547, 2003.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; PANAYOTOU, M. G.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. Biomass and bioenergy, v. 32, p. 60 –71, 2008.

PETSEV, D. Emulsions: structure, stability and interactions. Ed. Academic Press, v. 4, 1st Edition, 780p, 2004.

PEREIRA, J.F.B.; GUDIÑA, E.J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J.A.; COUTINHO, J.A.P.; RODRIGUES, L.R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. Fuel, v. 111, p. 259-268, 2013.

PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. Handbook of hydrocolloids. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC. Woodhead Publishing Ltd. Oxford, 2009.

PIANOVSKI, A.R.; VILELA, A.F.G.; DA SILVA, A.A.S.; LIMA, C.G.; DA SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; DE MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44, n. 2, 2008.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.. LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.P.; DE ANDRADE. J.B. Biodiesel: an overview. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 16, n. 6b, p. 1313-1330, 2005.

PIRÔLLO, M.P.S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro/SP, 2006.

PRATES, C.P.; PIEROBON, E.C.; COSTA, R.C. Formação do mercado de Biodiesel no Brasil. BNDES setorial, Brasil, 2007.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. Tecnologia farmacêutica. 5.ed. Lisboa, 1995.

PROMMACHAN, O. Production and application of biosurfactant from *Bacillus* MUV4. 107f. Tese de Doutorado, Prince of Songkla University, Biotechnology, Índia, 2002.

QUISPE, A.G.; CORONADO, J.R.; CARVALHO, J.R. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Brazil, v.27, p.475-493, 2013.

RAMOS, N.M. Produção, extração e caracterização parcial do biossurfactante produzido por *Yarrowia lipolytica* a partir de fontes renováveis. Projeto final de curso para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, EQ, 2013.

RAMOS, N.M.; FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, M.A.Z. Produção e recuperação de biossurfactantes por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono. COBEQ – XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçú/PR, 2010.

REBELLO, T.; BEZERRA, S. V. Guia de Produtos Cosméticos. São Paulo: Editora SENAC São Paulo, 2001.

REIS, R.S.; PACHECO, G.J.; PEREIRA, A.G.; FREIRE, D.M.G. Biosurfactants: Production and Applications. Biodegradation - Life of Science, Dr. Rolando Chamy (Ed.), InTech, v.01, p.1-370, 2013.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento- n. 37, p. 44-51, 2008.

ROCHA, N. 10 Frutas típicas da Região Norte. NorteCuriosos. 2015. Disponível em:<http://nortecuriosos.blogspot.com.br/2015/08/10-frutas-tipicas-da-regiao-norte_30.html>, acessado em 01/08/17.

ROCHA, NETO, O.G.; SOUZA, A.R.; MARADIAGA, J.B.G.; JUNIOR; R.C.O.; CARVALHO, J.E.V.; LAMEIRA, O.A. Principais produtos extrativos da Amazônia e seus coeficientes técnicos. Brasília: IBAMA, DF, 1999,

RON, E.Z.; ROSENBERG, E: Natural roles of biosurfactants. Environ Microbiol, n. 3, p. 229-236, 2001.

ROSA, R. Substituição de copa do cupuaçuzeiro. 2013. Disponível em: <http://hotsites.sct.embrapa.br/diacampo/programacao/2013/substituicao-de-copa-de-cupuacuzeiro>, acessado em 05/08/17.

RUFINO, R.D.; DE LUNA, J.M.; TAKAKI, G.M.C.; SARUBBO, L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. Electronic Journal of Biotechnology, v. 17, p. 34–38, 2014.

SABRA, W.; BOMMAREDDY, R.R.; MAHESHWARI, G.; PAPANIKOLAOU, S.; ZENG, A-P. Substrates and oxygen dependent citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: insights through transcriptome and fulsome analyses. Microb Cell Fact, 16:78, 2017.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. Environmental Pollution, p. 136, v. 187-195, 2005.

SANTOS, D.K.F.; MEIRA, H.M.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. Process Biochemistry, n. 54, p. 20–27, 2017.

SANTOS, F.F.; DA SILVA, L.V.; FREITAS, K.M.L.; ROCHA LEÃO, M.H.M.; AMARAL, P.F.F. Utilização de resíduos como substrato para produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*. XXV Congresso Brasileiro de Tecnologia de Alimentos. FAURGS, Gramado/RS, 2016.

SANTOS, F.K.G.; ALVES, J.V.A.; DANTAS, T.N.C.; NETO, A.A.D.; DUTRA JR, T.V.; NETO, E.L.B. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. 4o PDPETRO, Campinas/SP, 2007.

SCHRAMM, L.L. Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications. E-Book, Wiley, 463p., 2006.

SIDDHARTHA, G.V.A.O.; COSTA, M.N.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, C. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. Process Biochemistry, v. 41, p. 483–488, 2006.

SILVA, K.A.; ROCHA-LEÃO, M.H.; COELHO M.A.Z. Evaluation of aging mechanisms of olive oil–lemon juice emulsion through digital image analysis. Journal of Food Engineering, 2010.

SILVA, E.C.; SOARES, I.C. Tecnologia de emulsões. Cosmetics & Toiletries, v. 8, n. 5, p. 37-46, 1996.

SILVA, L.V. Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* a partir de glicerol e análise proteômica. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2014.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Application aspects. Biotechnol Adv, n. 25, p, 99–121, 2007.

SIQUEIRA, F.S. Bioprospecção de leveduras oleaginosas capazes de utilizar o glicerol bruto como fonte de carbono. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto/MG, 2015.

SOUSA. J.R.; CORREIA, J.A.C., MELO, V. M.M.; GONCALVES, L.R.B.; CRUZ, A.J.G. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas*

aeruginosa MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. Quim. Nova, v. 37, n. 3, p. 431-441, 2014.

SOUZA, F.A.S.D.; SALGUEITO, A.; ALBUQUERQUE, A.C D.C. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 29, n. 1, p. 61-67, 2012.

SOUZA, K.T.S.; GUDIÑA, E.; AZEVEDO C, Z.; DE FREITAS, V.; SCHWANA, R.F.; RODRIGUES, L.R.; DIAS, D.R.; TEIXEIRA, J.A. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, n. 154, p. 373–382, 2017.

SOUZA, V.C. Efeito da liofilização e desidratação em leito de espuma sobre a qualidade do pó de polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia – UESB. Dissertação de Mestrado, Itapetinga – Bahia, 2011.

SUFRAMA. Projeto potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica: cupuaçu. Manaus: Fundação Getúlio Vargas, v. 4, 62p., 2003.

SUN, M-L.; MADZAK, C.; LIU, H-H.; SONG, P.; RENA, L-J.; HUANG, H.; JI, X-J. Engineering *Yarrowia lipolytica* for efficient γ-linolenic acid production. Biochemical Engineering Journal, n. 117 p. 172–180, 2017.

SUWANSUKHO, P.; RUKACHISIRIKUL, V.; KAWAI, F.; H-KITTIKUN, A. Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. Songklanakarin Journal of Science and Technology, v.30, p.87-93, 2008.

TADROS, T.F. Emulsion Formation and Stability. Ed. Wiley-VCH; 1st Ed, 272p., 2013.

TEIXEIRA, G.L. Estudo da estabilidade e comportamento reológico de emulsões de gordura de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) com diferentes tensoativos. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, PR, 2014.

TEZAKI, S.; IWAMA, R.; KOBAYASHI, S.; SHIWA, Y.; YOSHIKAWA, H.; OHTA, A.; HORIUCHI, H.; FUKUDA, R. D12-fatty acid desaturase is involved in growth at low temperature in yeast *Yarrowia lipolytica*. Biochemical and Biophysical Research Communications xxx, p. 1-6, 2017.

THAVASI, R. JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I.M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. Bioresour. Technol, n 102, p. 3366–3372, 2011.

THOMPSON, J.E. A Prática Farmacêutica na Manipulação de Medicamentos. Porto alegre: Artmed, 2006.

THOMPSON, J.C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Applied Engineering Agriculture, v. 22 n. 2, p. 261-265, 2006.

TRINDADE, J.R.; FREIREA, M.G.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z.; COUTINHO, J.A.P.; MARRUCHO, I.M. Aging mechanisms of oil-in-water emulsions

based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects, v. 324, p. 149-154, 2008.

ÚBEDA, B.T. Estudo da Produção de Biossurfactante pela Bactéria *Kocuria rhizophila*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas/SP, 2004.

VALPUESTA, R.R.F. Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de matéria-prima renovável e de baixo custo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

VAN DER WALT, J.P.; VON ARX, J.A. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. Antonie Van Leeuwenhoek, n. 46, p. 517–521, 1980.

VAN GERPEN, J. Biodiesel processing and production. Fuel Processing Technology, v.86, p. 1097-1107, 2002.

VECINO, X.; CRUZ, J.M.; MOLDES, A.B.; RODRIGUES, L.R. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. Crit. Rev. Biotechnol, 2017.

VENTURIERI, G.A. Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Clube do cupu, 108 p, 1993.

VILALBA, F.A. Fragmentação mecânica de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) por meio de um beneficiador de cilindros. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP/SP, 2003.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, J.D. Functional Materials in Food Nanotechnology. Journal of food science, v. 71, n. 9, p. 107-116, 2006.

WELIN-BERGER, K.; BERGENSTAHL, B. Inhibition of Ostwald ripening in local anesthetic emulsions by using hydropho-bic excipients in the disperse phase. Int J Pharm, v. 200, p. 249- 260, 2000.

XAVIER, D.T.O.; BRANDÃO, V.M.D.; DA SILVA, F.N.; BRANDÃO, L.V.; DE SOUZA, R.A.L. Torta de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) em dietas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* cuvier, 1818). PubVet, v.10, n.11, p.795-803, 2016.

XIAOYAN, L.; XINJUN, Y.; JINSHUN, L.; JIAXING, X.; JUN, X.; ZHEN, W.; TONG, Z.; YUANFANG, D. A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. Food and bioproducts processing, n. 103, p. 86–94, 2017.

YANG, Q.; CHEN, B.; JI, X.; HE, Y.F.; CHEN, G.Q. Exergetic evaluation of cornethanol production in China. Communications in nonlinear science and numerical simulation. Harbin, China, v.14, p. 2450–2461, 2009.

ZAVARIZE, K.C. Utilização da glicerina proveniente da produção do biodiesel na dieta de frangos de corte. USP, 2012.