



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ROBERTO ALBUQUERQUE LIMA**

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE,  
COENZIMA Q<sub>10</sub> E LIPÍDEOS POLIINSATURADOS  
( $\omega$ 3 E  $\omega$ 6) POR AMOSTRAS DE *Candida glabrata*  
(UCP 1002 E 1556) UTILIZANDO RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS**

**Recife**

**2014**

**ROBERTO ALBUQUERQUE LIMA**

**Produção de Biossurfactante, Coenzima Q<sub>10</sub> e lipídeos  
poliinsaturados ( $\omega$ 3 e  $\omega$ 6) por amostras de *Candida  
glabrata* (UCP 1002 e 1556) utilizando resíduos  
agroindustriais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas, nível doutorado da Universidade  
Federal de Pernambuco, como pré-requisito para  
obtenção do título de **Doutor em Ciências Biológicas**

**Área de Concentração:** Microbiologia Aplicada

**Linha de Pesquisa:** Biotecnologia

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Galba Maria de Campos Takaki

**Recife**

2014

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Lima, Roberto Albuquerque**

**Produção de biossurfactante, coenzima Q<sub>10</sub> e lipídeos poli-insaturados (ω3 e ω6) por amostras de *Candida glabrata* (UCP 1002 e 1556) utilizando resíduos agroindustriais/ Recife: O Autor, 2014.**

**149 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Galba Maria de Campos Takaki**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,  
Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2014.**

**Inclui bibliografia e anexos**

- 1. Biossurfactante 2. Fungos 3. Resíduos I. Campos-Takaki,  
Galba Maria (orientador) II. Título**

**668.1**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2014- 214**

**ROBERTO ALBUQUERQUE LIMA**

**PRODUÇÃO DE BIODERIVADO, COENZIMA Q<sub>10</sub> E LIPÍDEOS  
POLIINSATURADOS (ω3 e ω6) POR AMOSTRAS DE *Candida glabrata*  
(UCP 1002 e 1556) UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**Aprovada em 16/06/2014**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas, Universidade Federal de  
Pernambuco, como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas

**Examinadores:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)  
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP/PE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza Santos Correia  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE/PE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hélvia Walleska Casullo de Araújo  
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB/PB

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Marcos Antônio Barbosa Lima  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE/PE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Carvalho Maia  
Universidade Federal de Rural de Pernambuco – UFRPE/PE

**DEDICO à Deus, pela infinita capacidade de me amar sem pedir nada em troca e me mostrar que os problemas encontrados ao longo da caminhada eram, na verdade, degraus para a minha vitória, à toda minha família pelo apoio irrestrito em todos os momentos da minha vida e incentivo no decorrer da realização deste trabalho, e em especial a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos-Takaki, pelo exemplo de profissional e acima de tudo pelo exemplo de ser humano.**

**"Não desista jamais! Creia! Pois será através da tua fé que você contemplará o  
mover de Deus em tua vida!"  
(Hebreus 11:27-40)**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, hoje e sempre, pelo discernimento e a sensibilidade que me concedeste para tamanha grandeza e por ter posto pessoas tão maravilhosas em meu caminho que fizeram e fazem toda a diferença. Deus, obrigado por ter me permitido vencer mais uma etapa em minha vida;

Com amor ao pai Manoel e a mãe Ivanuite, por terem transmitidos para mim os ensinamentos mais importantes de toda minha vida, por que eles foram, são e sempre serão os meus melhores modelos e os meus melhores exemplos;

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Galba Maria de Campos-Takaki, agradeço a Deus por permitir que essa pessoa iluminada entra-se na minha vida, agradeço ainda pela paciência, pela ajuda a superar as minhas fraquezas, pela disponibilidade demonstrada em todos os momentos da nossa jornada, ensinado-me a transformar dificuldades em facilidades e, sobretudo, pela amizade em todos os momentos, muito contribuindo para meu aperfeiçoamento profissional e principalmente pessoal, respeitando o meu estilo de pesquisa e valorizando os meus saberes e competências;

A todos os Colegas do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), pela atenção e apoio, principalmente à equipe da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Galba Maria de Campos-Takaki: Marcos Luna, Dayana, Marcelo, Dafne, Raquel, Yuri Max, Adriana, Marcos e em especial a Rosileide Fontenele pela paciência e dedicação na execução dos experimentos minha eterna gratidão;

A todos os professores que contribuíram para elaboração deste trabalho, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Norma Gusmão, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hélvia Casulo, Prof<sup>a</sup> Dr. Ricardo Kenji, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luiz Bezerra de Carvalho, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza Correia;

Aos funcionários do NPCIAMB, Sônia Maria de Souza, secretária, Hildis, serviços gerais e em especial aos técnicos André Felipe e Severino Humberto de Almeida que foram pessoas que sempre se dispuseram a ajudar em todos os momentos, minha eterna gratidão;

À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnológicas;

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial a secretaria Adenilde, e a coordenação do curso de pós-graduação em Ciências Biológicas;

À Coordenação de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro da bolsa de Doutorado.

## SUMÁRIO

|                                                                                      |              |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                                        | <b>XIV</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                                         | <b>XVI</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>                                                   | <b>xviii</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                  | <b>XIX</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                | <b>XX</b>    |
| <b>Capítulo I .....</b>                                                              | <b>21</b>    |
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>                                                      | <b>22</b>    |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                             | <b>24</b>    |
| 2.1. OBJETIVO GERAL .....                                                            | 24           |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                     | 24           |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                 | <b>25</b>    |
| 3.1. BIOTECNOLOGIA MICROBIANA: aspectos gerais .....                                 | 25           |
| 3.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS: <i>Candida sp</i> .....                                 | 26           |
| 3.2.1. <i>Candida glabrata</i> .....                                                 | 27           |
| 3.3. SURFACTANTES .....                                                              | 29           |
| 3.3.1. Estrutura molecular .....                                                     | 29           |
| 3.3.2. Biossurfactantes .....                                                        | 30           |
| 3.3.2.1. Classificação .....                                                         | 30           |
| 3.3.2.2. Síntese do biossurfactante: metabolismo microbiano .....                    | 31           |
| 3.3.2.3. Propriedades dos biossurfactantes.....                                      | 33           |
| 3.3.2.3.1. Tensão superficial .....                                                  | 33           |
| 3.3.2.3.2. Emulsificação .....                                                       | 34           |
| 3.3.2.3.3. Concentração Micelar Crítica (CMC).....                                   | 35           |
| 3.3.2.4. Vantagens de utilização dos biossurfactantes em relação aos sintéticos..... | 36           |
| 3.3.2.5. Principais aplicações dos biossurfactantes .....                            | 36           |

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.2.5.1. Cosméticos .....                                                                                                                                                      | 36 |
| 3.3.2.5.2. Aplicações biomédicas .....                                                                                                                                           | 37 |
| 3.3.2.5.3. Indústria de alimentos .....                                                                                                                                          | 38 |
| 3.3.2.5.4. Aplicações ambientais.....                                                                                                                                            | 38 |
| <b>3.4. COENZIMA Q<sub>10</sub></b> .....                                                                                                                                        | 39 |
| 3.4.1. Uso tópico da CoQ <sub>10</sub> .....                                                                                                                                     | 41 |
| 3.4.2. Obtenção da CoQ <sub>10</sub> .....                                                                                                                                       | 43 |
| 3.4.3. Micro-organismos produtores de CoQ <sub>10</sub> .....                                                                                                                    | 43 |
| <b>3.5. LIPÍDEOS</b> .....                                                                                                                                                       | 44 |
| 3.5.1. Produção de lipídeos por leveduras.....                                                                                                                                   | 45 |
| 3.5.2. Síntese de lipídeos por leveduras .....                                                                                                                                   | 46 |
| 3.5.3. Ácidos graxos.....                                                                                                                                                        | 48 |
| 3.5.4. Importância dos ácidos graxos no uso tópico.....                                                                                                                          | 50 |
| <b>3.6. ESTRATÉGIA BIOTECNOLÓGICA: uso de resíduos agroindustriais</b> .....                                                                                                     | 51 |
| 3.6.1. Soro de leite.....                                                                                                                                                        | 52 |
| 3.6.2. Milhocina .....                                                                                                                                                           | 53 |
| <b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                                                                                                                       | 55 |
| <b>Capítulo II</b> .....                                                                                                                                                         | 75 |
| <b>Biosurfactants production by <i>Candida glabrata</i> strains using industrial wastes as carbon and nitrogen sources</b> .....                                                 | 76 |
| <b>1. Introduction</b> .....                                                                                                                                                     | 77 |
| <b>2. Materials and methods</b> .....                                                                                                                                            | 77 |
| <b>3. Results and discussions</b> .....                                                                                                                                          | 78 |
| 3.1. Production of biosurfactant by <i>Candida glabrata</i> (UCP 1002 and 1556).....                                                                                             | 78 |
| 3.2. Stability of the biosurfactant produced by <i>Candida glabrata</i> (UCP 1002 and 1556).....                                                                                 | 80 |
| <b>4. References</b> .....                                                                                                                                                       | 81 |
| <b>Capítulo III</b> .....                                                                                                                                                        | 83 |
| <b>Resíduos agroindustriais como substrato não convencional para crescimento de uma linhagem de <i>Candida glabrata</i> e produção de um biossurfactante lipopeptídico</b> ..... | 84 |

|                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                         | <b>84</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                       | <b>85</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                  | <b>86</b> |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                          | <b>87</b> |
| 2.1. Micro-organismo e condições de cultivo .....                                                           | 87        |
| 2.2. Substratos .....                                                                                       | 87        |
| 2.3. Produção de biossurfactante.....                                                                       | 87        |
| 2.4. Otimização da produção do biossurfactante por <i>C. glabrata</i> (UCP 1556).....                       | 88        |
| 2.5. Determinação da tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC) .....                          | 89        |
| 2.6. Perfil de crescimento .....                                                                            | 89        |
| 2.6.1. Determinação de glicose e pH.....                                                                    | 89        |
| 2.6.2. Determinação da velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e o tempo de geração ( $T_G$ )..... | 90        |
| 2.7. Determinação do índice de emulsificação.....                                                           | 90        |
| 2.8. Estudos de estabilidade .....                                                                          | 90        |
| 2.9. Isolamento e purificação do biossurfactante .....                                                      | 90        |
| 2.10. Caracterização do biossurfactante .....                                                               | 91        |
| 2.10.1. Caracterização do biossurfactante por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....                   | 91        |
| 2.10.2. Análise dos grupos funcionais do biossurfactante e carga iônica .....                               | 91        |
| 2.10.3. Efeito do biossurfactante na viscosidade.....                                                       | 92        |
| 2.11. Determinação do potencial do biossurfactante na dispersão de óleo .....                               | 92        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                      | <b>92</b> |
| 3.1. Produção de biossurfactante.....                                                                       | 92        |
| 3.2. Otimização Experimental.....                                                                           | 92        |
| 3.3. Determinação da tensão superficial e CMC .....                                                         | 97        |
| 3.4. Perfil da cinética de crescimento de <i>Candida glabrata</i> (UCP 1556) .....                          | 98        |
| 3.5. Rendimento do biossurfactante e purificação .....                                                      | 100       |
| 3.6. Propriedade emulsificante .....                                                                        | 100       |
| 3.7. Estudo de estabilidade .....                                                                           | 100       |

|                                                                                                                                                    |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.8. Caracterização do biossurfactante .....                                                                                                       | 102        |
| 3.9. Testes de dispersão do óleo .....                                                                                                             | 103        |
| <b>4. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                          | <b>103</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                        | <b>104</b> |
| <b>Capítulo IV .....</b>                                                                                                                           | <b>111</b> |
| <b>Produção de CoQ<sub>10</sub> por <i>Candida glabrata</i> (UCP 1556) utilizando meio de baixo custo a base de resíduos agroindustriais .....</b> | <b>112</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                                                                | <b>113</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                              | <b>114</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                         | <b>115</b> |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                 | <b>116</b> |
| 2.1. MATERIAIS .....                                                                                                                               | 116        |
| 2.1.1. Micro-organismo .....                                                                                                                       | 116        |
| 2.1.2. Substratos .....                                                                                                                            | 116        |
| 2.1.3. Meio de manutenção .....                                                                                                                    | 116        |
| 2.1.4. Otimização da produção de biomassa por <i>C. glabrata</i> (1556).....                                                                       | 116        |
| 2.2. Métodos microbiológicos.....                                                                                                                  | 117        |
| 2.2.1. Preparação do inóculo .....                                                                                                                 | 117        |
| 2.2.2. Produção de biomassa por <i>Candida glabrata</i> (UCP 1556).....                                                                            | 118        |
| 2.2.3. Determinação do consumo de glicose e do pH .....                                                                                            | 118        |
| 2.2.4. Extração da CoQ <sub>10</sub> .....                                                                                                         | 118        |
| 2.2.5. Identificação da CoQ <sub>10</sub> .....                                                                                                    | 119        |
| 2.2.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD) .....                                                                                               | 119        |
| 2.2.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....                                                                                      | 119        |
| 2.2.6. Determinação da atividade citotóxica da CoQ <sub>10</sub> .....                                                                             | 119        |
| 2.2.7. Determinação de atividade antioxidante "Scavenger" do radical DPPH .....                                                                    | 120        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                             | <b>120</b> |
| 3.1. Otimização da produção de biomassa por <i>C. glabrata</i> (UCP 1556) .....                                                                    | 120        |

|                                                                                                                                                                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2. Cinética de crescimento no meio otimizado de <i>C. glabrata</i> (UCP 1556).....                                                                                                                                   | 122        |
| 3.3. Identificação e quantificação da CoQ <sub>10</sub> .....                                                                                                                                                          | 123        |
| 3.4. Resultados da atividade citotóxica da CoQ <sub>10</sub> .....                                                                                                                                                     | 124        |
| 3.5. Análise da atividade antioxidante da CoQ <sub>10</sub> .....                                                                                                                                                      | 124        |
| <b>4. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                              | <b>125</b> |
| <b>5.REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                                              | <b>125</b> |
| <b>Capítulo V .....</b>                                                                                                                                                                                                | <b>128</b> |
| <b>Produção de ácidos graxos poliinsaturados PUFAs (<math>\omega</math>3 e <math>\omega</math>6) por <i>Candida glabrata</i> (UCP 1002 e 1556) em substratos alternativos à base de resíduos agroindustriais .....</b> | <b>129</b> |
| <b>RESUMO. ....</b>                                                                                                                                                                                                    | <b>130</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>131</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                                             | <b>132</b> |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                                                                                     | <b>133</b> |
| 2.1. Materiais.....                                                                                                                                                                                                    | 133        |
| 2.1.1. Micro-organismo .....                                                                                                                                                                                           | 133        |
| 2.1.2. Substratos .....                                                                                                                                                                                                | 133        |
| 2.1.3. Meio de manutenção .....                                                                                                                                                                                        | 133        |
| 2.1.4. Meio de produção da biomassa seca .....                                                                                                                                                                         | 133        |
| 2.2. Métodos microbiológicos.....                                                                                                                                                                                      | 134        |
| 2.2.1. Preparação do inóculo .....                                                                                                                                                                                     | 134        |
| 2.2.2. Determinação do pH.....                                                                                                                                                                                         | 134        |
| 2.2.3. Produção de biomassa por <i>C. glabrata</i> (UCP 1002 e 1556) .....                                                                                                                                             | 134        |
| 2.2.4. Determinação da velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e tempo de geração ( $T_G$ ) .....                                                                                                             | 134        |
| 2.3. Métodos analíticos .....                                                                                                                                                                                          | 135        |
| 2.3.1. Extração dos lipídeos totais.....                                                                                                                                                                               | 135        |
| 2.3.2. Metilação dos ácidos graxos .....                                                                                                                                                                               | 135        |
| 2.3.3. Identificação dos ácidos graxos.....                                                                                                                                                                            | 135        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                 | <b>136</b> |

|                                                                                            |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.1. Crescimento e produção de biomassa seca por <i>C. glabrata</i> (UCP 1002 e 1556)..... | 136        |
| 3.2. Quantificação de lipídeos totais .....                                                | 138        |
| 3.3. Identificação dos ácidos graxos.....                                                  | 140        |
| <b>4. CONCLUSÕES .....</b>                                                                 | <b>141</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS .....</b>                                                                | <b>141</b> |
| <b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>                                                              | <b>145</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                         | <b>146</b> |

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1** – Identificação morfológica macróscopica de *Candida glabrata*..... 28
- Figura 2**- Representação esquemática dos grupos hidrofílico e hidrofóbico do surfactante ..... 29
- Figura 3**- Via dos carboidratos..... 33
- Figura 4** - Esquema das forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido. .... 34
- Figura 5**- Representação esquemática do comportamento de um surfactante em solução aquosa após atingir a CMC. .... 35
- Figura 6** - Representação de diferentes comprimentos de onda (nm) e a respectiva penetração na pele humana: estrato córneo, epiderme e derme..... 42

### CAPÍTULO II

- Figure 1.** A) Growth curve and pH of *C. glabrata* UCP 1002 amid consisting of whey and corn steep liquor during the production of biosurfactant, B) Growth curve and pH of *C. glabrata* UCP 1556 amid consisting of whey and corn steep liquor during the production of biosurfactant. .... 79
- Figure 2.** Stability of the biosurfactant determined by the surface tension of cell-free metabolic *Candida glabrata* (UCP 1002). (A) different concentrations of NaCl, (B) different pH values and (C) at different temperatures. .... 80
- Figure 3.** Stability of the biosurfactant determined by the surface tension of cell-free metabolic *Candida glabrata* (UCP 1556). (A) different concentrations of NaCl, (B) different pH values and (C) at different temperatures. .... 80

### CAPÍTULO III

- Figura 1** - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para o 1º planejamento fatorial do tipo (DCC)  $2^2$ , tendo como fatores o (SL) e (M) e como variável resposta a tensão superficial..... 94
- Figura 2** - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para o 2º planejamento fatorial do tipo (DCC)  $2^2$ , tendo como fatores o (SL) e (M) e como variável resposta a tensão superficial.....94
- Figura 3**- Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para o 3º planejamento fatorial do tipo (DCC)  $2^2$ , tendo como fatores o (SL) e (M) e como variável resposta a tensão superficial..... 95
- Figura 4** – Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por *C. glabrata* ..... 98

**Figura 5** - Curva de crescimento, pH, tensão superficial e consumo de glicose para biossurfactante isolado a partir de *C. glabrata* cultivadas em meio otimizado com SL (40%) e M (20%) como substratos, durante 168 horas. .... 99

**Figura 6** – Influência do pH (A), temperatura (B) e NaCl (C) na estabilidade das emulsões pelo biossurfactante produzido por *C. glabrata*. .... 101

**Figura 7** - Atividade dispersante para o óleo motor observado como: (A) óleo motor com Triton-X e (B) óleo motor com biossurfactante produzido por *C. glabrata*. .... 103

## CAPÍTULO IV

**Figura 1** - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para planejamento fatorial do tipo (DCC)  $2^2$ , tendo como fatores o soro de leite e milhocina, como variável resposta a produção de biomassa. .... 122

**Figura 2** - (A) Determinação consumo de glicose, (B) pH e produção de biomassa de *C. glabrata* (UCP 1556) nos meios controle e no meio de produção otimizado a base de resíduos agroindustriais. .... 122

**Figura 3** - Cromatogramas. (A) solução padrão de CoQ<sub>10</sub> na concentração de 1mg/mL; (B) amostra contendo extrato purificado de CoQ<sub>10</sub> produzida pela *C. glabrata* na mesma concentração. .... 123

## CAPÍTULO V

**Figura 1** - Determinação do pH e da produção de biomassa das linhagens de *C. glabrata* UCP 1002 (A) e UCP 1556 (C) nos meios controle e *C. glabrata* UCP 1002 (B) e UCP 1556 (D) nos meios de produção a base de resíduos agroindustriais ..... 137

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1-</b> Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos produtores .....                                | 31 |
| <b>Tabela 2-</b> Relevância do biossurfactante em indústria de cosméticos.....                                             | 37 |
| <b>Tabela 3 –</b> Principais ácidos graxos presentes na natureza .....                                                     | 49 |
| <b>Tabela 4 -</b> Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina..... | 54 |

### CAPÍTULO II

|                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1 -</b> Results of fermentation of <i>Candida glabrata</i> using experimental design (CCRD) of 2 <sup>2</sup> with four replications of the center point after 72 hours of cultivation, using surface tension as the response variable, and emulsification index..... | 79 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1 -</b> Níveis dos três planejamentos experimentais (DCC) 2 <sup>2</sup> .....                                        | 88 |
| <b>Tabela 2 -</b> Níveis codificados e os resultados da tensão superficial dos três planejamentos (DCC) de 2 <sup>2</sup> ..... | 93 |
| <b>Tabela 3 –</b> Análise de variância ANOVA para o segundo planejamento fatorial .....                                         | 97 |

### CAPÍTULO IV

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1 -</b> Níveis do planejamento experimental (DCC) 2 <sup>2</sup> .....                                                    | 117 |
| <b>Tabela 2 -</b> Resultados do planejamento (DCC) 2 <sup>2</sup> para produção de biomassa por <i>C. glabrata</i> (UCP 1556) ..... | 121 |

### CAPÍTULO V

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1 -</b> Cinética de crescimento de <i>C. glabrata</i> (UCP 1002 e 1556) em meio controle e em meio a base de resíduos agroindustriais ..... | 138 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 2</b> - Resultados do rendimento de biomassa e produção de lipídeos totais pela <i>C. glabrata</i> (UCP 1002 e 1556) em meio controle e no meio de produção a base de resíduos agroindustriais por 72h..... | 139 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 3</b> - Composição dos ácidos graxos de <i>C. glabrata</i> (UCP 1002 e 1556) ..... | 140 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

CoQ<sub>10</sub> - Coenzima Q<sub>10</sub>

CMC - Concentração micelar crítica

DCC - Delineamento Composto Central

AG - Ácidos graxos

PUFAs - Ácidos graxos poliinsaturados

TAG - Triacilglicerídeos

CL - Corpos lipídicos

EE - Esteril ésteres

Tg - Tempo de geração

$\mu_{\text{max}}$  - Velocidade máxima de crescimento

SL - Soro de leite

M - Milhocina

MSI - Meio de Sais Inorgânicos

$\omega 3$  - ômega 3

$\omega 6$  - ômega 6

## RESUMO

Avanços tecnológicos buscam recursos naturais adequados e disponíveis para obtenção de produtos sustentáveis e economicamente viáveis. Neste trabalho foi estudada a produção de metabólitos como os biossurfactante, lipídeos e Coenzima Q<sub>10</sub> por *Candida glabrata* (UCP 1002 e 1556), por processo biotecnológico. O cultivo foi realizado em meio de baixo custo a base de resíduos agroindustriais (milhocina e soro de leite). Inicialmente neste estudo foi realizado um processo de produção de biossurfactante por *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556), utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio em substituição ao meio sintético, sendo observado que as duas linhagens produziram similares quantidades de biossurfactante. Foi realizado um processo de otimização do meio a base de resíduos agroindustriais por Delineamento Composto Central (DCC) 2<sup>2</sup>. Os resultados obtidos evidenciaram que no segundo planejamento com 40% de soro de leite e 20% de milhocina foi mais eficiente na produção de biossurfactante utilizando a *C. glabrata* 1556, com uma redução da tensão superficial de 72 para 28,8mN/m. O biossurfactante foi caracterizado e classificado como lipoproteína e além disso demonstrou se seu caráter aniônico. O meio otimizado empregou se na produção e caracterização da CoQ<sub>10</sub> por *C. glabrata* (UCP 1556), ficando evidenciado a presença significativa do composto e sua ação antioxidante. Neste meio foi testado o potencial das duas linhagens de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) na produção de lipídeos e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e uma quantidade elevada de ácido  $\gamma$ -ácido linolênico ( $\omega$ 6) e  $\alpha$ -ácido linolênico ( $\omega$ 3) foi detectada. Os resíduos agroindustriais são substratos nutritivos que representam uma redução econômica para a produção compostos limpos que podem ser aplicados na indústria de cosmética e farmacêutica.

**Palavras-chaves:** *Candida glabrata*, resíduos agroindustriais, otimização, biossurfactante, PUFAs, CoQ<sub>10</sub>.

## ABSTRACT

Technological advances seek appropriate natural resources and available for achieving of sustainable products and viable economically. In this work was studied the production of metabolites as biosurfactant, Coenzyme Q<sub>10</sub> and lipids by *Candida glabrata* (UCP 1002 and 1556) for biotechnological process. The cultivation was carried in medium of low cost the base of agroindustrial waste (whey and corn steep liquor). Initially this study was performed a process of biosurfactant production by *C. glabrata* (UCP 1002 and 1556), using agroindustrial residues as a carbon source and nitrogen replacing the synthetic medium, it was observed that both strains produced similar amounts of biosurfactant. It was performed a optimization process of the medium the base of agroindustrial waste by Central Composite Design (CCD) 2<sup>2</sup>. The results showed that the second planning with 40% of whey and 20% of corn steep liquor it was more efficient in the biosurfactant production using *C. glabrata* (UCP 1556), with a reduction in surface tension from 72 to 28,8mN/m. The biosurfactant was characterized and classified as lipoprotein and furthermore it was demonstrated its anionic character. The optimized medium was performed in the production and characterization of CoQ<sub>10</sub> by *C. glabrata* (UCP 1556), getting evidenced the significant presence of the compound and its antioxidant action. In this medium was tested the potential of two strains of *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) in the production of lipids and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and a high quantity of  $\gamma$ -linoleic acid ( $\omega$ 6) and  $\alpha$ -linoleic acid ( $\omega$ 3) was detected. The agroindustrial wastes are nutritious substrates which represent an economic cost reduction in the production of clean compounds that it can be applied in cosmetic and pharmaceutical industry.

**Keywords:** *Candida glabrata*, Agroindustrial Wastes, Optimization, Biosurfactant, PUFAs, CoQ<sub>10</sub>.

# Capítulo I

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

Com o advento da biotecnologia, os limites de aplicação dos aditivos para alimentos, cosméticos e medicamentos, expandiram-se, e novos produtos foram desenvolvidos baseados na capacidade biossintética dos micro-organismos. Estas perspectivas, relacionadas com os produtos de elevado interesse industrial, têm conduzido nos últimos anos a investigação e desenvolvimento de modelos que constituem as bases das novas tecnologias na produção de metabólitos secundários como biossurfactantes, Coenzima Q<sub>10</sub> e  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 para produção e aplicação industrial (SILVA e FERRARI, 2011; SINGH e SAINI, 2014).

A *Candida glabrata* é uma levedura haplóide que tem sido relatada como um micro-organismo com elevado potencial biotecnológico na produção de metabólitos secundários como os biossurfactantes, Coenzima Q<sub>10</sub> e  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 (BIALKOVA e SUBIK, 2006; LUNA et al., 2009; INGLIS et al., 2012).

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana, caracterizados por apresentar em sua estrutura uma região hidrofóbica e outra hidrofílica capazes de reduzir a tensão superficial. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto que a porção polar, pode ser iônica, aniônica, catiônica e não-iônica ou anfotérica. Baseado na sua natureza, os surfactantes podem atuar entre duas interfaces de fluidos de diferentes polaridades tais como óleo/água ou água/ar (BANAT et al., 2010; SEKHON et al., 2011).

Dentre suas características, os biossurfactantes apresentam vantagens especiais sobre surfactantes químicos como baixa toxicidade, biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis, capacidade de modificação estrutural através de engenharia genética ou técnicas bioquímicas, apresentam estabilidade em valores extremos de pH, temperatura e salinidade, tornando-o um biopolímero industrial potencialmente competitivo economicamente para atender a demanda gerada pelo mercado mundial (RIBEIRO et al., 2012; JARA et al., 2013).

Os lipídeos nos micro-organismos são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. Nas leveduras são encontrados como componentes de membrana da parede celular, de material de reserva e, em alguns casos como compostos extracelulares. A composição, qualidade e quantidade de lipídeos variam de espécie para espécie de acordo com as condições de

cultivo, disponibilidade de nutrientes e com o estágio de crescimento (BEOPOULOS et al., 2011).

Dentre os variados tipos de lipídeos, estão os ácidos graxos que possuem principalmente função estrutural. Dentro da diversidade dos ácidos graxos, existem aqueles que o homem tem capacidade de síntese, porém outros não. Esses ácidos graxos cuja biossíntese é inadequada são denominados essenciais: ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3) e ácido  $\gamma$ -linolênico ( $\omega$ -6) e, são considerados precursores dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de cadeia longa: ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (PAPANIKOLAOU et al., 2008; SITEPU et al., 2013). A deficiência dos ácidos graxos essenciais continua sendo associada a vários problemas dérmicos e outras síndromes que podem levar até a morte (DAS, 2008; CUERVO e GALOFRÉ, 2009).

A Coenzima Q<sub>10</sub> apresenta atividade antioxidante, variando a sua quantidade e a função, sendo utilizada para inibir a formação de radicais livres, bem como diminuir o dano potencial provocado pelos mesmos, resultantes da peroxidação de ácidos graxos insaturados (gorduras) na célula (OLIVEIRA et al., 2011). Os níveis dessa coenzima são reduzidos com a idade e em pacientes com doenças crônicas (cardíacas, distrofias musculares, Parkinson, câncer, diabetes e HIV-Aids). Com o aumento global da procura desse antioxidante, sua produção vem sendo estimulada através de processos sintéticos, semi-sintéticos e biotecnológicos (LIPSHTUTZ et al., 2002; PARK et al., 2004).

Hoppe et al., (1999) e Bergamim et al., (2008), demonstraram que CoQ<sub>10</sub> pode ser utilizada como aditivo em cosméticos na pele como creme, elimina os radicais livres e retarda o envelhecimento celular. Constataram ainda que a CoQ<sub>10</sub> penetrou nas camadas da epiderme viável e reduziu o nível de oxidação. Além disso, uma redução na profundidade das rugas após a utilização da CoQ<sub>10</sub> também foi mostrado.

O crescimento do setor industrial aumenta o índice de produtividade levando ao rápido decréscimo dos recursos naturais e ao mesmo tempo, à geração de grandes quantidades de resíduos, dar um destino correto a estes subprodutos constitui um grande desafio. No entanto, a produção de biossurfactantes, CoQ<sub>10</sub> e  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 por processos biotecnológicos, utilizando resíduos agroindustriais, viabiliza economicamente o custo total do processo de produção e reduz os problemas ambientais (CÔRTES et al., 2011; ACCORSINI et al., 2012).

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral produzir por processo biotecnológico biossurfactante, Coenzima Q<sub>10</sub> e  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 por *Candida glabrata* (UCP 1002 e UCP 1556), utilizando como substratos solúveis resíduos agroindustriais como fontes alternativas de carbono e nitrogênio para viabilizar a produção de biomoléculas economicamente sustentáveis.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) e seu potencial na produção de biossurfactante a partir do meio tradicional;
- Otimizar o meio de produção do biossurfactante pela linhagem selecionada de *Candida glabrata* (UCP 1556), utilizando os resíduos agroindustriais (milhocina e soro de leite);
- Identificar as principais propriedades do biossurfactante produzido por *Candida glabrata* (UCP 1556) através da tensão superficial, emulsificação, viscosidade e dispersão de compostos hidrofóbicos;
- Isolar e caracterizar o biossurfactante produzido por *C. glabrata* (UCP 1556);
- Investigar o rendimento da produção de biomassa por *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556), para produção da CoQ<sub>10</sub> e  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 no meio otimizado;
- Identificar a ocorrência da produção de CoQ<sub>10</sub> por *C. glabrata* (UCP 1556) e  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 produzidos por *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556);
- Avaliar a citotoxicidade da CoQ<sub>10</sub> produzida por *C. glabrata* (UCP 1556);
- Determinar potencial antioxidante da CoQ<sub>10</sub> produzida por *C. glabrata* (UCP 1556);
- Validar estatisticamente os resultados obtidos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

---

#### 3.1. BIOTECNOLOGIA MICROBIANA: aspectos gerais

A Biotecnologia é definida como o conjunto de princípios científicos aplicados a procedimentos para a produção de bens e serviços mediante a utilização de agentes biológicos. Está também integrada a um conjunto de técnicas que utilizam substâncias vivas (ou parte delas) para modificar ou fabricar um produto. As aplicações da biotecnologia são múltiplas: vão desde o aumento da produtividade da terra cultivável até a produção de novos medicamentos, vacinas e materiais de diagnóstico, passando pela conservação da biodiversidade genética e a restauração de elementos como a água, o ar e o solo. Desse modo, a biotecnologia permite que as tecnologias sejam aplicadas nos mais diversos setores industriais, os quais se distinguem três atividades: a engenharia genética, a engenharia de proteínas e a engenharia de metabólitos (BUENO, 2008).

As principais forças indutoras e direcionadoras para o desenvolvimento em biotecnologia são: a demanda econômica direcionada pela indústria, as políticas nacionais e internacionais que frequentemente são influenciadas pela pressão pública, e os avanços em ciência, tecnologia e inovação. Juntos, estes componentes catalisam o desenvolvimento da biotecnologia, com a geração de novos mercados, solução de problemas crônicos e emergentes e a melhoria da eficiência e custos de processos industriais. Biotecnologia é um exemplo de inovação radical, no sentido em que proporciona a utilização de tecnologias inteiramente novas para atividades industriais existentes e permite a geração de novos insumos (BULL et al., 2000; GOMES e BORÉM, 2013).

Portanto, a biotecnologia é reconhecida como uma das tecnologias-capacitadoras para o século XXI, frente às suas características que busca estratégias radicais, impacto atual e potencial frente a problemas globais (doenças, nutrição e poluição ambiental) (KATE e LAIRD, 1999) e à promessa de desenvolvimento industrial sustentável (utilização de recursos renováveis, 'tecnologia limpa' e redução do aquecimento global) (BULL et al., 2000). A contribuição que os micro-organismos têm dado para o desenvolvimento biotecnológico abrange diversas aplicações como: a produção de compostos químicos (etanol, ácido acético, biogás, plásticos biodegradáveis, bioconversores na indústria de alimentos e farmacêutica), produtos para agricultura (bioinseticidas e inoculantes agrícolas), enzimas para diversos setores industriais, com

destaque para indústria de alimentos e compostos de interesse médico e veterinário (antibióticos, antitumorais, hipocolesterlêmicos, imunossuppressores, inibidores enzimáticos, antiparasitários) (BARNUM, 1998).

A base para o desenvolvimento biotecnológico é o material biológico, que após ser adequadamente recuperado e avaliado pela presença de atributos desejáveis culmina com o desenvolvimento de um processo ou produto comercial (BULL et al., 2000).

O Brasil sendo considerado um dos doze países com grande diversidade, os quais juntos concentram 70% da diversidade biológica do planeta, poderá garantir uma posição de vanguarda no desenvolvimento dessas tecnologias dependendo, portanto, de investimentos nessa área (STRELEC, 2006).

Desta forma, as indústrias cosméticas, em parceria com a indústria de alimentos, colocou uma nova categoria de produtos que prometem melhorar a aparência da pele, dos cabelos e unhas. Esses produtos são formulados com vitaminas C e E, ácidos graxos ( $\omega$ -3 e  $\omega$ -6), coenzima Q<sub>10</sub>, entre outras substâncias, prometendo prevenir o envelhecimento da pele, a queda dos cabelos, o fortalecimento de unhas e até a diminuição da celulite (RONA e BERARDESCA, 2008; DRAELOS, 2010; ANUNCIATO, 2011).

### 3.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS: *Candida sp*

As leveduras são fungos unicelulares de formato e dimensões (desde 1 a 5 $\mu$  de largura e 5 a 30 $\mu$  de comprimento) variados em função da espécie, nutrição e idade. Entre outros fatores, não possuem flagelos ou outros órgãos de locomoção, são imóveis. A reprodução é assexuada por brotamento multilateral e polar ou por fissão, e sexuada por meio de esporos. A esporulação em leveduras é um fator importante por constituir a base de um método de reprodução, desempenhar uma função de produção de novos híbridos e por manter a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente. As características morfológicas das leveduras determinadas por microscopia mostram formas esféricas e ovóides, pêra, cilíndrica e mesmo alongadas em pseudomicélio. Em geral, as células de leveduras são maiores do que das bactérias, mas as menores leveduras não são tão grandes como as maiores bactérias (FERREIRA et al., 2012; TORTORA et al., 2012).

Geralmente, as espécies de *Candida* apresentam o dimorfismo, podendo aparecer microscopicamente na forma de levedura apresentando células ovaladas ou

alongadas, na forma de micélio apresentam-se sob a forma de pseudohifas ou podem formar hifas verdadeiras. No caso da *C. glabrata* a ocorrência natural de hifas ainda não foi descrita, apresenta crescimento por pseudohifas só durante a privação de nitrogênio (CSANK e HAYNES, 2000; FERREIRA et al., 2012; TORTORA et al., 2012). Apresentam ainda como características colônias úmidas, cremosas, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada (MONGELO, 2012).

O Gênero *Candida* compreende um grupo de fungos leveduriformes que podem ser encontrados em diversos ecossistemas como rios e solos, e em casos especiais, em seres humanos e animais. As espécies deste gênero compreendem organismos eucariotos, não fotossintéticos, constituídos por organelas citoplasmáticas, parede celular e uma membrana plasmática rica em esteróis, principalmente o ergosterol (ANDRADE, 2010; MONGELO, 2012).

Quanto à composição química, as leveduras apresentam de 68% a 83% de água, além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais entre outros. Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio e minerais (PELCZAR et al., 1997; TORTORA et al., 2012)

As leveduras são classificadas como fungos pertencentes à divisão Eumycota (Eumycetes), classe Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes. Leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas produzem esporos e apresentam um ciclo sexual já conhecido. As leveduras deuteromicéticas, também conhecidas como leveduras imperfeitas, não possuem ciclo sexual conhecido ou descrito, apresentando características morfológicas semelhantes às leveduras ascomicéticas ou basidiomicéticas (CLAUDINO, 2007; JUNIOR et al., 2011).

### 3.2.1. *Candida glabrata*

O gênero *Candida* é formado por micro-organismos muito usados em processos biotecnológicos na indústria alimentícia e cosmética para a produção de biomassa e de várias substâncias. São também usadas como organismos modelo de manipulação genética, pesquisa molecular e biológica. A este respeito, *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie mais conhecida, mas a situação atual na medicina e na indústria requer o uso de outras espécies. A *Candida glabrata* se apresenta de forma viável nesse mercado como

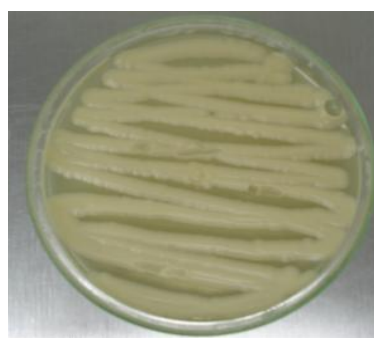
um micro-organismo com potencial para satisfazer as necessidades das indústrias (BIALKOVA e SUBIK, 2006; INGLIS et al., 2012; NAM et al., 2013).

De acordo com Kurtzman e Fell (2000), esta levedura classifica-se como pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subdivisão Ascomycotina, Classe, Ascomycetes, Subclasse Hemiascomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, Gênero *Candida* e Espécie *glabrata*.

A *C. glabrata* apresenta como característica macroscópica, uma coloração opaca, de branco a creme (Figura 1), consistência cremosa e lisa possuindo em sua estrutura microscópica apenas os blastoconídeos que são ovais, 1-4 $\mu$  de diâmetro, apresentando nenhuma diferença entre as formas comensais e patogênicas desta espécie de levedura (PELCZAR et al., 1997). A *C. glabrata* assimila apenas glicose e trealose, representando, assim, um número reduzido de açúcares em comparação com *S. cerevisiae* ou *C. albicans* (HAZEN, 1995; BRANDT e LOCKHART, 2012). O metabolismo da trealose é interessante não só do ponto de vista dos processos energéticos, mas também o papel que desempenha a trealose nas condições de estresse ambiental (jejum, a flutuação da pressão osmótica, choque térmico) (MACKENZIE et al., 1988; BRANDT e LOCKHART, 2012).

**Figura 1** – Identificação morfológica macróscopica de *Candida glabrata*.

Fonte: Autor



Bialkova e Subik (2006), compararam a relação evolutiva dentro do gênero *Candida*, com base na homologia da sequência do rRNA 18s, foram analisadas abundância de pares C-G e A-T, número de genes, pseudogenes, duplicações de genes, similaridade entre os genes para RNA funcionais, a redundância total de DNA e outras propriedades. Concluiu-se que a *C. glabrata* é evolutivamente mais relacionada com a

*S. cerevisiae* do que para outros fungos. Todas estas informações foram salientadas por análise genética que resultou de um estudo da sequência completa do genoma da *C. glabrata* por Dujon et al., (2004).

### 3.3. SURFACTANTES

#### 3.3.1. Estrutura molecular

A palavra surfactante deriva da expressão "surface active agents" (agentes de atividade superficial) por apresentarem atividade nas superfícies e interfaces dos líquidos. Esta propriedade é dada aos surfactantes devido à sua estrutura química, a qual possui duas partes distintas, a primeira delas é uma região hidrofílica, usualmente chamada de cabeça e a segunda região hidrofóbica, chamada de cauda (COLIN, 2012) (Figura 2).

**Figura 2-** Representação esquemática dos grupos hidrofílico e hidrofóbico do surfactante.



O grupo hidrofóbico ou região apolar da molécula do surfactante é usualmente constituída por hidrocarbonetos (SABATINI et al., 2006), possuindo a cadeia hidrocarbônica de 10 a 20 átomos de carbono, que para Chu e Chan (2003) podem ser aromáticos ou alifáticos, em linha reta ou ramificada e carbonos reduzidos. Embora não seja o grupo que caracteriza o surfactante, o grupo hidrofóbico influencia na concentração micelar crítica (CMC), uma propriedade das moléculas tensoativas (FERREIRA, 2004).

O grupo hidrofílico categoriza o surfactante, podendo ser iônico (catiônico ou aniônico), não-iônico ou anfotérico (BANAT, 1995). Os catiônicos são constituídos por sais de amônio, enquanto os aniônicos possuem a parte hidrofílica constituída por grupo carboxilato, hidroxí, sulfato ou fosfato. Surfactantes não-iônicos não contêm grupos com carga e, nos surfactantes denominados anfotéricos, a parte hidrofílica é constituída

por grupos que contêm uma carga negativa e uma positiva, o que lhes confere propriedades Zwitteriônicas, dependendo do pH (WOODS e CHARLES, 2004).

Quase todos os surfactantes atualmente utilizados são quimicamente derivados do petróleo. Entretanto, o interesse por surfactantes biológicos tem aumentado nos últimos anos, devido às suas inúmeras características: possibilidade de produção através de fermentações, potenciais aplicações em áreas como a proteção ambiental, recuperação de resíduos e indústrias de processamento de alimentos e cosméticos (CASTIGLIONE e CARMAN, 2009; SAHARAN et al., 2011; JAMAL et al., 2012; PATHAK e KEHARIA, 2014).

### **3.3.2. BIOSSURFACTANTES**

Os biossurfactantes foram descobertos na década de 60 como compostos extracelulares anfífilos em pesquisas de fermentações de hidrocarbonetos (MATSUURA, 2004). São produzidos, principalmente, pelo crescimento aeróbio de micro-organismos como leveduras, fungos filamentosos e por bactérias. A produção microbiológica de biossurfactantes é considerada promissora devido ao curto tempo de geração quando comparados ao crescimento de plantas e animais (PARTHASARATHI et al., 2014).

Os biossurfactantes são capazes de reduzir as forças de repulsão entre fases diferentes, interface ou superfície, e permitem que as duas fases se misturem mais facilmente. Assim sendo, quanto menor a força de atração existente entre as moléculas do líquido menor será a tensão superficial ocorrendo menor viscosidade e maior tendência a espalhar-se (SHARMA e SAHARAN, 2014). O tipo de biossurfactante é muito específico podendo variar de espécie para espécie de micro-organismo (NIE et al., 2010; JARA et al., 2013).

#### **3.3.2.1. Classificação**

Diferentemente dos surfactantes quimicamente sintetizados, que são classificados de acordo com a natureza do seu grupamento polar, os biossurfactantes são classificados pela sua composição química e origem microbiana (RAHMAN e HARGREAVES, 2002). As principais classes destes metabólitos secundários com baixo peso molecular incluem os glicolipídeos, os lipopeptídeos e os fosfolipídeos. Por outro lado, os biossurfactantes de alto peso molecular incluem os polissacarídeos, as

proteínas, os lipopolissacarídeos, as lipoproteínas ou os complexos de misturas desses biopolímeros (Tabela 1) (SINGH, 2012).

**Tabela 1** - Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos produtores

Fonte: Desai e Banat (1997)

| <b>Tipo de Biossurfactante</b>                         | <b>Micro-organismo</b>                                                    |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>Glicolipídeos</b>                                   |                                                                           |
| - ramnolipídios                                        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                             |
| - soforolipídios                                       | <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i> , <i>Candida glabrata</i> |
| - trehalolipídios                                      | <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.                |
| <b>Lipopeptídios e lipoproteínas</b>                   |                                                                           |
| - Peptídio-lipídio                                     | <i>Bacillus licheniformis</i>                                             |
| - Viscosina                                            | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                                            |
| - Serrawetina                                          | <i>Serratia marcescens</i>                                                |
| - Surfactina                                           | <i>Bacillus subtilis</i>                                                  |
| - Subtilisina                                          | <i>Bacillus subtilis</i>                                                  |
| - Gramicidina                                          | <i>Bacillus brevis</i>                                                    |
| - Polimixina                                           | <i>Bacillus polymyxa</i>                                                  |
| <b>Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios</b> |                                                                           |
| - Ácidos graxos                                        | <i>Corynebacterium lepus</i>                                              |
| - Lipídios neutros                                     | <i>Nocardia erythropolis</i>                                              |
| - Fosfolipídios                                        | <i>Thiobacillus thiooxidans</i>                                           |
| <b>Surfactantes poliméricos</b>                        |                                                                           |
| - emulsan                                              | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>                                        |
| - biodispersan                                         | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>                                        |
| - liposan                                              | <i>Candida lipolytica</i>                                                 |
| - carboidrato-lipídio-proteína                         | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                                            |
| - manana-lipídio-proteína                              | <i>Candida tropicalis</i>                                                 |
| <b>Surfactantes particulados</b>                       |                                                                           |
| - vesículas                                            | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>                                        |
| - células                                              | Várias bactérias                                                          |

### 3.3.2.2. Síntese do biossurfactante: metabolismo microbiano

Os biossurfactantes são produzidos principalmente durante o crescimento aeróbio ou em fase estacionária do desenvolvimento dos micro-organismos, em meios de cultura a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura destes (ÚBEDA, 2004; PIRÔLO, 2006).

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

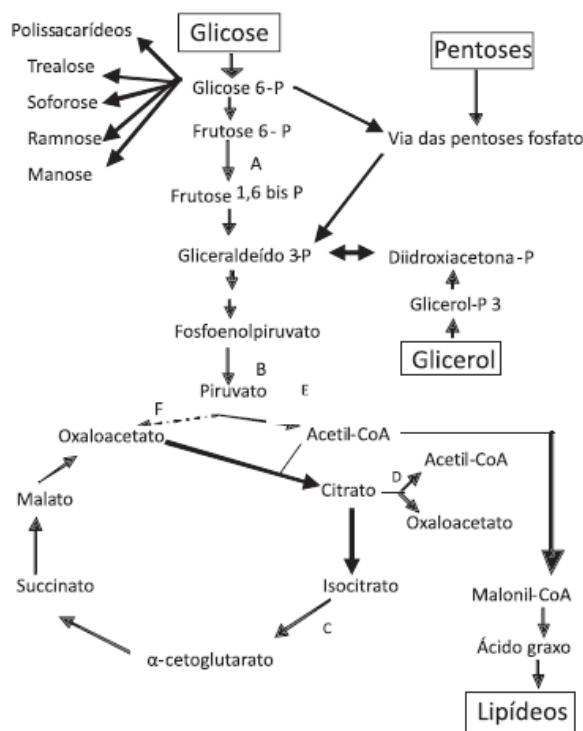
crescimento microbiano, auxiliam o transporte e transposição de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999).

Em alguns casos, o micro-organismo mantém o biossurfactante produzido associado à parede celular, facilitando a penetração dos compostos de carbono na área periplasmática da célula (BANAT et al., 2010). Os biossurfactantes conhecidos são produzidos em substratos solúveis e insolúveis em água, como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, cultivados em diferentes fontes de carbono (BANAT, 1995). Por esta diversidade de substratos solúveis ou não, esses compostos são sintetizados por duas vias metabólicas responsáveis pela síntese dos grupos hidrofóbico e hidrofílico da molécula: a via dos hidrocarbonetos e a via dos carboidratos (FONTES et al., 2008).

Os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo micro-organismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante. Quando se utiliza carboidratos como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de biossurfactantes, as vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção é realizada de modo que o fluxo de carbono é regulado pelas vias lipogênicas (formação de lipídeos) e de formação da porção hidrofílica (através da via glicolítica) (Figura 3).

**Figura 3 - Via dos carboidratos.**

Fonte: Fontes et al., (2008)



### 3.3.2.3. Propriedades dos biossurfactantes

As aplicações dos surfactantes estão diretamente relacionadas com suas propriedades físico-químicas. Algumas das principais propriedades dos surfactantes como redução da tensão superficial e interfacial, Concentração Micelar Crítica (CMC) e emulsificação estão diretamente relacionadas com a sua importância em aplicações industriais nas mais diversas áreas (SAHARAN et al., 2011; JAMAL et al., 2012; SARAFIN et al., 2014).

#### 3.3.2.3.1. Tensão superficial

A tensão superficial é uma análise qualitativa podendo ser definida como o trabalho necessário para aumentar a área da superfície usualmente expressa em milinewtons por metro (mN/m), no Sistema Internacional de Unidades (SI) (DEL PINO e NETO, 1996). As forças coesivas entre as moléculas no interior de um líquido são compartilhadas com os átomos vizinhos. As moléculas presentes na superfície não têm

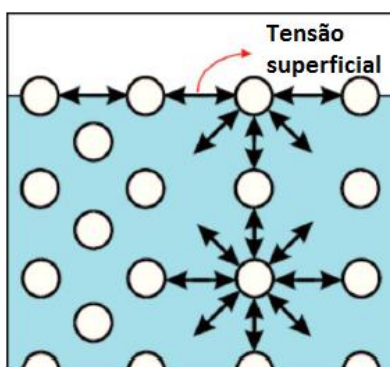
átomos vizinhos acima delas e exibem uma força atrativa mais forte sobre as moléculas vizinhas próximas a superfície. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamada tensão superficial (HEWITT, 2002).

A tensão superficial permite avaliar a produção de surfactantes através da medida da redução da tensão superficial em relação à tensão da água (72mN/m). De acordo com a literatura as tensões nas faixas de 35mN/m a 40mN/m, indicam que o micro-organismo é promissor na produção de biossurfactantes e abaixo de 35mN/m, indica que o micro-organismo pode ser considerado um eficiente produtor (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; MULLIGAN, 2005; LUNA et al., 2011).

A tensão superficial tem sua efetividade dimensionada através da energia livre por unidade de área requerida para trazer a molécula da fase líquida para a superfície (MULLIGAN, 2005). Quanto menor trabalho é requerido para trazer a molécula para a superfície, mais a tensão superficial é reduzida. Quando um surfactante é adicionado à água, suas moléculas tendem a se arranjar de modo a minimizar a repulsão entre os grupos hidrofóbicos e a água. Os grupos polares ficam na solução aquosa, próximo à superfície, e os grupos apolares ficam na interface água-ar, minimizando o contato com a água (Figura 4). Esse fato gera uma diminuição na tensão superficial da água ao provocar um desarranjo em sua superfície (APARNA et al., 2012).

**Figura 4** - Esquema das forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido.

Fonte: Pirrôlo (2006)



#### 3.3.2.3.2. Emulsificação

A emulsificação é a dispersão de um líquido em outro. A formação da emulsão é possível porque o surfactante é capaz de reduzir as forças de repulsão entre líquidos com diferentes graus de polaridade permitindo que as duas fases se misturem. Em

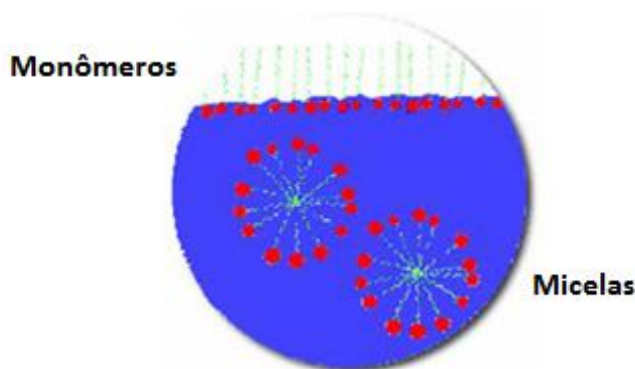
indústrias de cosméticos e alimentos esta propriedade de formar e estabilizar emulsões é especialmente útil (MUTHUSAMY et al., 2008; RUFINO et al., 2014).

### 3.3.2.3.3. Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC também é dependente da redução da tensão superficial, que é definida como a concentração mínima de surfactantes utilizados para que se inicie o processo de micelização ou formação de micelas (PIRRÔLLO et al., 2006; TIMMA et al., 2014), como observado na Figura 5.

**Figura 5-** Representação esquemática do comportamento de um surfactante em solução aquosa após atingir a CMC.

Fonte: autor



Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma monomérica. Desta forma, a intensidade de adsorção do surfactante à superfície depende de sua concentração, ocasionando uma variação na ordenação destas moléculas sobre a superfície. Em concentrações muito baixas de surfactantes, o mesmo se distribui na superfície e tende a se orientar paralelamente a esta. Quando ocorre um aumento da concentração de surfactante, observa-se uma diminuição da área disponível para as moléculas iniciando o processo de ordenação das mesmas à superfície (TIMMA et al., 2014). As micelas podem ter diversos formatos, os quais dependendo da concentração do surfactante podem ser desde formatos esféricos, cilíndricos e até formatos mais complexos como lamelares ( $-\text{OSO}_3^-$ ), ou grupo nitrogênio quaternário ( $\text{NR}_4^+$ ), ou grupo polioxetilênico ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ )<sub>n</sub>H (SANTOS et al., 2007).

#### **3.3.2.4. Vantagens de utilização dos biossurfactantes em relação aos sintéticos**

As principais vantagens dos biossurfactantes em relação aos sintéticos é a de não apresentarem efeitos danosos ao ambiente e não serem tóxicos aos micro-organismos. As demais características consistem em:

- Maior eficiência na redução da tensão superficial devido à necessidade do uso de pequenas concentrações de biossurfactantes (BOGNOLO,1999);
- Apresentam maior estabilidade térmica, de pH e força iônica podendo ser utilizado em ambientes distintos (LIMA et al., 2007);
- Os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo, tornando-os adequado para aplicação em processos de biorremediação e tratamento de resíduos (LIMA et al., 2007);
- Apresentam menor toxicidade, representando uma excelente alternativa em substituição aos surfactantes quimicamente sintetizados devido os efeitos alérgicos causados pelos produtos artificiais. Além disso, a baixa toxicidade dos biossurfactantes permite a sua utilização em cosméticos, produtos farmacêuticos e em alimentos (LIMA et al., 2007).

#### **3.3.2.5. Principais aplicações dos biossurfactantes**

##### **3.3.2.5.1. Cosméticos**

Segundo Carolei e Gutz (2005), alguns biossurfactantes possuem ação de detergência e propriedade espumante. Estas propriedades os tornam aplicáveis em sabonetes líquidos e xampus. São responsáveis pelas características e propriedades almejadas destes produtos, dentre as quais podemos destacar:

- Facilidade de aplicação: está relacionada à viscosidade do produto, ou seja, um produto viscoso não escorre da mão antes da sua aplicação e às vezes nem mesmo sai do frasco;
- Capacidade espumante: depende da característica e quantidade dos surfactantes presentes. Apesar de não ser totalmente verdadeira a afirmação, o desempenho do produto está relacionado à quantidade de espuma formada;
- Sensação de limpeza: esta sensação ocorre quando a camada lipofílica da pele ou do cabelo é removida de maneira adequada, sem deixar resíduos ou provocar ressecamento;
- Enxague: o produto deve permitir um fácil enxague;
- Baixa irritabilidade: as matérias-primas utilizadas não devem provocar irritações;

- Estabilidade: o produto deve ser estável, sem apresentar grandes alterações por um período de tempo prolongado, geralmente o período de uso.

Baseado na importância destes, a determinação dos biossurfactantes torna-se fundamental, já que a qualidade e a eficácia do produto está relacionada às exatas quantidades dos mesmos. Dentre os biossurfactantes, os soforolipídeos, raminolipídeos e lipídeos manosilerititol tem apresentado excelentes propriedades e estão sendo produzidos para utilização em cosméticos (Tabela 2). No entanto, os soforolipídeos estão demonstrando propriedades únicas resultando em maior uso nas indústrias (LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009).

**Tabela 2** - Relevância do biossurfactante em indústria de cosméticos.

Fonte: Lourith e Kanlayavattanakul, 2009.

| Biossurfactante             | Micro-organismo<br>produtos                       | Atividade                                          | Aplicação em<br>cosméticos                                                                |
|-----------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Soforolipídeos              | <i>Candida glabrata</i><br><i>Candida apicola</i> | Antibacteriano,<br>antioxidante,<br>emulsificante, | Loções, sabonetes,<br>batons, produtos anti-<br>ruga, tratamento de<br>acne, desodorantes |
| Raminolipídeos              | <i>Pseudomonas</i><br><i>aeruginosa</i>           | Antimicrobiano,<br>emulsificante                   | Produtos anti-ruga e<br>anti-envelhecimento                                               |
| Lipídeos<br>manosilerititol | <i>Candida antartica</i>                          | Emulsificante e<br>dispersante                     | Hidratante de pele e<br>produtos anti-ruga                                                |

### 3.3.2.5.2. Aplicações biomédicas

O uso e o potencial de aplicações comerciais de biossurfactantes no campo da medicina têm aumentado durante a última década. Suas atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral os tornam moléculas relevantes para aplicações no combate de muitas doenças. Sua capacidade de partição nas interfaces podem afetar as propriedades de adesão de células aos micro-organismos. Além disso, os biossurfactantes são geralmente considerados mais seguro do que fármacos sintéticos, devido à sua origem biológica (BANAT et al., 2010; RODRIGUES e TEIXEIRA, 2010).

### 3.3.2.5.3. Indústria de alimentos

Os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas. Os agentes tensoativos encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras. O bioemulsificante produzido por *C. utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas. Exemplos de emulsões naturais são o leite e a gema de ovo. Exemplos de alimentos processados em forma de emulsões são: creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos para salada, salsicha, lingüiça, sorvetes, bolos, chocolate, recheios e produtos instantâneos (SHEPHERD et al., 1995).

### 3.3.2.5.4. Aplicações ambientais

Os biossurfactantes são utilizados também em processos de descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos devido à capacidade de degradação de substâncias tóxicas derivadas do petróleo e tem sido de grande interesse em ambientes recalcitrantes (OSAMU et al., 2002). No entanto, na escolha do melhor biossurfactante, alguns fatores devem ser levados em consideração, sendo analisados com atenção determinadas características, para se obter sucesso no processo de biorremediação (SINGH, 2012; TIMMA et al., 2014).

Normalmente as eficiências de remediação são comprometidas em função da baixa solubilidade e alta tensão interfacial que os contaminantes orgânicos do solo possuem em ambientes aquosos. Entretanto, a utilização de biossurfactantes pode aumentar a taxa de remediação sob dois mecanismos: primeiro pela redução da tensão interfacial entre a água e os contaminantes, e em segundo, pela formação de agregados micelares que solubilizam os compostos orgânicos hidrofóbicos (PATHAK e KEHARIA, 2014; SINGH e SAINI, 2014).

Uma alternativa para limpeza de solos contaminados com óleo cru ou petróleo tem sido o uso de biossurfactantes (SIVAPATHASEKARAN et al., 2010; KIRAN et al., 2010; SATPUTE et al., 2010). O uso destes biopolímeros em aplicações ambientais é bastante promissor devido a sua biodegradabilidade, tanto em água como em solos, e por serem menos tóxicos que os tensoativos químicos (MESQUITA, 2004; MULLIGAN, 2005).

### 3.4. COENZIMA Q<sub>10</sub>

A ubiquinona foi isolada pela primeira vez de mitocôndrias de coração de vaca por Frederick Crane em 1957 que lhe atribui o nome de coenzima Q<sub>10</sub> e verificou que esse composto era parte integrante da cadeia respiratória mitocondrial mediando o transporte de elétrons entre as desidrogenases (NADH e succinato) e o citocromo (CRANE et al., 1957). No mesmo ano, o professor Morton isolou este composto de um fígado de rato, a partir da vitamina A, e atribuiu-lhe pela primeira vez, o nome de ubiquinona (MORTON, 1958). No final da década de 50, Folkers e colegas determinaram a estrutura química precisa da ubiquinona, 2,3dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona, sendo pela primeira vez sintetizada e produzida por fermentação (WOLF et al., 1958).

Em meados dos anos 60, pesquisadores japoneses usam pela primeira vez a coenzima Q<sub>7</sub> (um composto relacionado) no tratamento de doenças humanas, na insuficiência cardíaca congestiva. Em 1966, Mellors e Tappel mostraram que a CoQ<sub>6</sub> reduzida era um antioxidante eficaz. Em 1972, Gian Paolo Littarru juntamente com o professor Karl Folkers documentaram um déficit de CoQ<sub>10</sub> na doença do coração humano. Por meados da década de 70, os japoneses aperfeiçoaram a tecnologia industrial para produzir CoQ<sub>10</sub> pura em quantidades suficientes para ensaios clínicos maiores (HARMAN, 2009; SANTOS, 2011).

Ubiquinonas, incluindo a CoQ<sub>10</sub>, são cofatores obrigatórios na transferência de elétrons respiratório aeróbio para geração de energia, produção de ATP. Assim, esta molécula encontra-se em maior quantidade nos órgãos com maior necessidade energética, como o coração, o fígado e os rins (LITTARRU e LAMBRECHTS, 2011). Coenzima Q sendo uma molécula solúvel em lipídeos e contém um ativo redox e uma cauda hidrofóbica. O predomínio da forma de coenzima Q nos seres humanos é a CoQ<sub>10</sub>, composto por um grupo benzoquinona e uma cadeia lateral que contém dez unidades isoprenóides na cauda. É também solúvel e móvel no hidrofóbico núcleo da bicamada fosfolipídica da membrana interna da mitocôndria, e ainda é um co-fator essencial na cadeia de transporte de elétrons dos complexos I e II em eucariontes (YEN e SHIH, 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

A oxidação é a transferência de elétrons de um átomo a outro, sendo essencial à vida aeróbia e ao metabolismo humano, uma vez que o oxigênio é o último aceptor no fluxo de elétrons (HERNADEZ e NAHAS, 2009; SANTOS, 2011). Durante alguns

anos, CoQ<sub>10</sub> no ser humano era conhecida por seu papel-chave na bioenergética mitocondrial e estudos posteriores demonstraram a sua presença em outras frações subcelulares e no plasma. Contudo atualmente, tem sido extensivamente investigada a sua função antioxidante. A CoQ<sub>10</sub> é eficiente na proteção da peroxidação de fosfolipídios da membrana e também o DNA mitocondrial contra danos oxidativos (HOPPE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2011).

Essas duas funções constituem a base sobre a qual a investigação que suporta o uso clínico de CoQ<sub>10</sub> seja procedente. Também ao nível da membrana interna mitocondrial, é reconhecida como um cofator obrigatório para a função de proteínas de desacoplamento e um modulador do poro de transição. Além disso, dados recentes revelaram que CoQ<sub>10</sub> afeta a expressão de genes envolvidos na sinalização de células humanas, metabolismo e transportes, sendo essa coenzima o único antioxidante lipídico solúvel sintetizada endogenamente (LITARRU e TIANO, 2007; DUBERLEY et al., 2012). Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano.

Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001% a 0,01%), ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento, como a compatibilidade com o alimento e fácil aplicação, estabilidade nas condições de processo e armazenamento, e o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento. Além disso, na escolha de um antioxidante devem-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (DÔSSIE, 2009).

A diminuição da elasticidade do epitélio era associada à rigidez proteica da matriz extracelular, resultante da polimerização do colágeno com a elastina. Porém, estudos recentes *in vitro* realizados com o uso de microscopia atômica-AFM (Atomic Force Microscopy) atribuíram à rigidez excessiva das células epiteliais ao aumento da densidade das fibras do citoesqueleto com o decorrer da idade (BERDYEEVA et al., 2005). Entretanto, um das principais razões apontadas pelos pesquisadores como responsável pelo processo de envelhecimento é o desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante de nosso organismo (MAGALHÃES, 2000).

### 3.4.1. Uso tópico da CoQ<sub>10</sub>

Os primeiros trabalhos realizados por Chipault (1952, 1955), foram os precursores de muitos estudos da atividade antioxidante, com potencial de aplicabilidade como conservante de alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica (SANTOS, 2011).

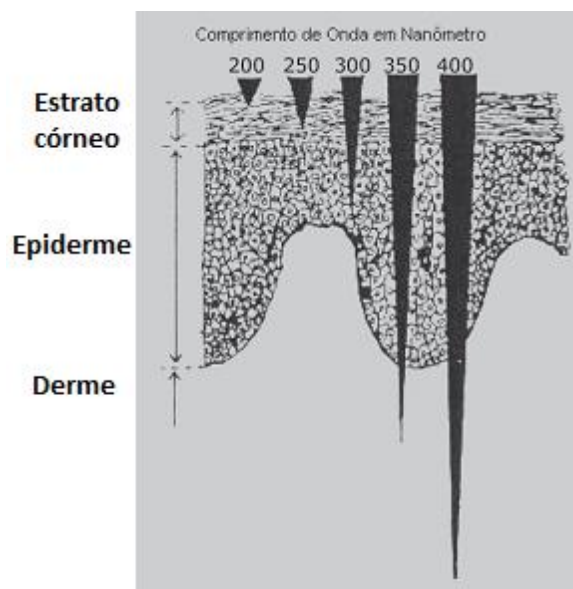
Em consequência do aumento da expectativa do tempo de vida observado nas últimas décadas e a busca da qualidade de vida durante o processo de envelhecimento, existe hoje uma grande demanda de produtos para o rejuvenescimento. De acordo com o IBGE, a esperança de vida ao nascer em 1940 era de 40,5 anos, aumentando para 70,4 anos em 2007, de modo que a população de idosos atinge cerca de 15 milhões de pessoas, crescimento colocando o país, dentro de duas décadas, entre os dez com maior população idosa. Os estudos das propriedades antienvhecimento das substâncias ativas vêm despertando muito interesse dos pesquisadores. Desta forma, é preocupação constante da cosmetologia prevenir e atenuar o envelhecimento cutâneo por meio da busca e do estudo de substâncias antioxidantes eficazes, que são oferecidas em produtos cosméticos aos consumidores (SILVA e FERRARI, 2011).

Os raios solares contêm a radiação ultravioleta A, B e C. Os raios UVC incidem num comprimento de onda entre 180 nm e 290nm, os UVB entre 290 e 320 nm e os UVA entre 320 e 400 nm (Figura 6). A radiação UVC praticamente não atinge a superfície terrestre, sendo retida pela camada de ozônio. Estima-se que cerca de 80% dos sinais visíveis causados no envelhecimento são provocados pelos raios ultravioletas A e B e pelos radicais livres formados devido à exposição a estes (BUCHLI, 2002). Sabe-se que juntas são mais danosas que isoladamente e que o estresse oxidativo provocado por elas nas camadas da pele depende da penetração dos raios, como exibido na figura 6 (SHAATH, 1997; CARDOSO, 2009).

A aplicação tópica de antioxidantes reduz os danos oxidativos induzidos pela radiação UV. Porém, essa proteção será mais eficaz se ocorrer penetração destas substâncias antioxidantes em camadas mais profundas do estrato córneo. Acredita-se que os antioxidantes ajudam na prevenção do desenvolvimento de doenças crônicas como o câncer, doenças cardíacas, derrame, Mal de Alzheimer, artrite reumatóide e catarata (SCOTT et al., 2007).

**Figura 6** - Representação de diferentes comprimentos de onda (nm) e a respectiva penetração na pele humana: estrato córneo, epiderme e derme.

Fonte: Shaath, 1997



Hoppe et al., (1999) e Bergamim et al., (2008) foram capazes de demonstrar que CoQ<sub>10</sub> pode ser utilizada como aditivos em cosméticos, na pele como creme, elimina os radicais livres e retarda o envelhecimento celular. Eles constataram que a CoQ<sub>10</sub> penetrou nas camadas da epiderme viável e reduziu o nível de oxidação medida por emissão de fóton fraco. Além disso, uma redução na profundidade das rugas após a utilização da CoQ<sub>10</sub> também foi demonstrado. A coenzima foi determinada para ser eficaz contra os raios UVA estresse oxidativo mediado em queratinócitos humanos em termos de esgotamento tiol, ativação de quinases fosfotirosina específicos e prevenção de danos oxidativos do DNA. Também foi capaz de suprimir significativamente a expressão da collagenase em fibroblastos dérmicos humanos após irradiação UVA. Estes resultados indicam que CoQ<sub>10</sub> tem a eficácia de evitar muitos dos efeitos prejudiciais do fotoenvelhecimento.

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na produção e aplicação da CoQ<sub>10</sub> como um medicamento ou na promoção da saúde em aditivo para alimentos e cosméticos. Com o aumento global da procura desse antioxidante, sua produção vem sendo estimulada através de processos sintéticos (NEGISHI et al., 2002), semi-sintéticos (LIPSHTUTZ et al., 2002) e biotecnológicos (PARK et al., 2004).

### 3.4.2. Obtenção da CoQ<sub>10</sub>

A coenzima Q<sub>10</sub> pode ser obtida através da alimentação ou de suplementos, bem como pode ser produzida pelo organismo pela mesma via que é sintetizado o colesterol, cuja produção é reduzida com o avanço da idade. Quando suplementada, a coenzima Q<sub>10</sub> é absorvida pelo intestino delgado, no entanto, esta absorção é muito pequena, aproximadamente 60% da coenzima ingerida é eliminada na forma inalterada pelas fezes. Estudos recentes comprovaram que a coenzima Q<sub>10</sub> pode estimular a produção e o aproveitamento energético celular; corrigir falhas do sistema imunológico (sistema de defesa do organismo), por apresentar propriedades antioxidantes, bem como reduzir os efeitos tóxicos de drogas, favorecendo o organismo durante o processo de envelhecimento (QUINZI et al., 2008).

As principais fontes naturais de coenzima Q<sub>10</sub> incluem a carne bovina, amendoim, salmão, sardinha e espinafre. Como suplemento, a coenzima Q<sub>10</sub> pode ser encontrada na forma de comprimidos, cápsulas ou em soluções, isolada ou associada a outras vitaminas ou minerais em diversos suplementos nutricionais. Porém, devido às interações negativas que podem ocorrer entre as próprias vitaminas, bem como entre as vitaminas e os minerais, o uso de suplementos que contêm a combinação destes nutrientes em uma única cápsula ou comprimido não é recomendado, pois um acaba comprometendo a absorção do outro por competirem, muitas vezes, pelo mesmo local de absorção (ABRUTYN, 2011).

### 3.4.3. Micro-organismos produtores de CoQ<sub>10</sub>

Bule e Singhal (2009), mostraram em seu trabalho uma abordagem integrada da utilização de técnicas estatísticas e precursoras, que meios naturais, poderiam aumentar a produção de CoQ<sub>10</sub> por *Pseudomonas diminuta*. O estudo indicou que tanto o suco de cenoura como o suco de tomate pode atuar como precursores naturais para a produção de CoQ<sub>10</sub>, embora os melhores resultados tenham sido obtidos com o suco de cenoura.

HA et al., (2009), selecionaram minerais que tenham um efeito estimulante sobre o conteúdo específico da CoQ<sub>10</sub>, a suplementação com Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> aumentou a produção de CoQ<sub>10</sub> em cerca de 22,4% para dar o maior conteúdo de CoQ<sub>10</sub>, em cultura de *Agrobacterium tumefaciens*. A suplementação com Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> auxilia o aumento da CoQ<sub>10</sub> específica, que por sua vez, diminuiu o estresse oxidativo para proteger a membrana contra a peroxidação lipídica. Os resultados melhoraram a compreensão da biossíntese

CoQ<sub>10</sub> em *Agrobacterium tumefaciens* e devem contribuir para uma melhor produção industrial de CoQ<sub>10</sub> por processos biológicos.

Yen e Shih (2009), realizaram experimentos utilizando biorreator *airlift*, com cultivo aérobio-escuro de *Rhodobacter sphaeroides*. Neste estudo, o melaço foi utilizado como meio de produção. Os resultados sugeriram que uma operação em lotes alimentados em biorreator *airlift* acompanhados de diferentes medidas de aeração poderão ser adequados para a maior produção de CoQ<sub>10</sub>.

Kawamukai (2010), realizou experimentos utilizando as leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* na produção de Coenzima Q<sub>10</sub>. Neste trabalho teve como foco os aspectos bioquímicos e comerciais de CoQ em levedura.

### 3.5. LIPÍDEOS

Lipídeos são ésteres orgânicos de ácidos graxos e alcoóis. São substâncias bastante heterogêneas que caracterizam-se por serem solúveis nos solventes orgânicos (álcool, benzeno, éter, clorofórmio, etc.) e insolúveis em água. O termo lipídeo, tradicionalmente, tem sido usado para descrever uma variedade de compostos naturais, incluindo os ácidos graxos e seus derivados, esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliares. Compostos que apresentam cadeias orgânicas com um elevado número de carbonos, o que lhes confere o caráter hidrofóbico, podendo apresentar apenas átomos de carbono e hidrogênio ou grupos funcionais com heteroátomos como alcoóis, fenóis, ácidos carboxílicos, ésteres, entre outros (FAHY et al., 2005; JAVIER e ANTONIO, 2011).

Os lipídeos constituem o material de reserva em animais, plantas e micro-organismos. E não só apresentam relevância para o armazenamento de energia, mas também está massivamente envolvido nos processos de transdução de sinal, cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares (MURALIKRISHNA et al., 2006; JULVE et al., 2010).

Na dieta humana, os lipídeos são responsáveis por liberarem a maior parte da energia necessária para a manutenção das vias metabólicas (cerca de 9 kcal/g), fornecendo duas vezes mais energia que outras fontes como carboidratos e proteínas (OYAMA et al., 2001; BAUMANN, 2014).

Os lipídeos são classificados como simples, quando são constituídos por ácidos graxos e álcoois, podem ser glicerídeos ou cerídeos. Este último é formado por cadeias longas abertas de álcool. Podem ser classificados como conjugados ou complexos, podendo ser constituídos por outros grupos na molécula, além de ácidos graxos e álcoois, fosfatos, nitrogênio e os lipídeos derivados são as substâncias obtidas por hidrólise dos lipídeos simples e compostos (NELSON e COX, 2011; VOET et al., 2014).

De acordo com Moore-Landecker (1996), os lipídeos podem estar agregados a outros compostos, tais como: proteínas, aminoácidos e polissacarídeos. Geralmente os (TAG) triacilglicerol e seus ácidos graxos compreendem uma grande fração dos lipídeos produzidos por fungos.

### **3.5.1. Produção de lipídeos por leveduras**

As leveduras são utilizadas em muitos processos industriais, tais como a produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, poliálcoois, pigmentos, lipídeos e glicolipídeos. Alguns destes produtos são produzidos comercialmente, enquanto outros são potencialmente valiosos em processos biotecnológicos (ADRIO e DEMAINE, 2003; CASTANHA, 2012).

O papel dos lipídeos, dos seus precursores e derivados, em células eucarióticas, está sendo cada vez mais reconhecido. Os avanços tecnológicos na análise de lipídeos e na engenharia genética estão atraindo cada vez mais interesse para o estudo do metabolismo lipídico em vários organismos. Entre os micro-organismos, leveduras sendo unicelulares, desprovidas de endotoxinas, passíveis de melhoramento genético e apropriadas para fermentações em grande-escala. São particularmente atraentes para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas (BEOPOULOS et al., 2011).

Os lipídeos produzidos por micro-organismos apresentam composição similar e valor energético aos óleos vegetais e animais, mas como produtores de lipídeos os micro-organismos não competem por recursos alimentares, especialmente se a fonte de carbono for de baixo custo como matérias-primas, subprodutos e excedentes. Apresenta ainda grande rapidez de geração e sua produção não é sujeita a variações climáticas e sazonais cíclico. Além disso, sua produção requer menor área de produção e melhor controle da produção e do produto (LI et al., 2008; ROSSI et al., 2011).

Para reduzir os custos do óleo microbiano têm sido exploradas outras fontes de carbono ao invés de glicose. Foram relatados que xilose, arabinose, manose, glicerol e outros resíduos agrícolas e industriais podem ser usados como fonte de carbono para o acúmulo de óleo em leveduras (TSIGIE et al., 2011).

As leveduras têm sido estudadas como micro-organismos produtores de lipídeos devido à sua capacidade de acumular alta quantidade de lipídeos intracelulares, sua alta taxa de crescimento e à semelhança dos seus triacilgliceróis com as frações de óleos vegetais (RATLEDGE, 1988).

As leveduras oleaginosas mais conhecidas incluem os gêneros de *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporon* e *Yarrowia*. Em média, estas leveduras acumulam lipídeos para um nível correspondente a 40% de sua biomassa, entretanto, em condições de limitação de nutrientes, elas podem acumular lipídeos para níveis que excedem 70% de sua biomassa. No entanto o conteúdo lipídico e o perfil diferem entre as espécies (BEOPOULOS et al., 2009; TANIMURAA et al., 2014).

Atualmente, diversos pesquisadores desenvolvem estudos para crescimento com os mais diversos tipos de leveduras, utilizando meio alternativo constituído por resíduos industriais para promover a produção de lipídeos por processos biotecnológicos (DELABIO et al., 2013; JUSZCZYK, et al., 2013).

### 3.5.2. Síntese de lipídeos por leveduras

Óleos e gorduras são as mais importantes matérias-primas renováveis da indústria química. Elas tornam disponíveis ácidos graxos em tal pureza que podem ser usados para conversões químicas e para a síntese de compostos quimicamente puros. Os oleoquímicos básicos são quimicamente convertidos para uma grande variedade de moléculas que são utilizados para a produção de cosméticos, lubrificantes, revestimentos, surfactante e muitos outros produtos úteis (METZGER e BORNSCHEUER, 2006).

O metabolismo de carbono de micro-organismos é estimado para ser baseado principalmente em carboidratos. A presença de lipases permite que muitos micro-organismos passem a utilizar fontes de carbono "não convencionais", tais como TAG e outros lipídeos com ligações ésteres (NAJJAR et al., 2011).

A formação de lipídeos depende da fisiologia do micro-organismo, começando sua produção de lipídeos durante a fase exponencial tardia e continua durante a fase

estacionária. Sob condições limitantes e na presença de uma fonte de carbono em excesso os micro-organismos iniciam o armazenamento de lipídeos, assim uma alta taxa de carbono/nitrogênio, em torno de 100, é um requisito básico para o acúmulo de lipídeos (BEOPOULOS et al., 2009). Micro-organismos que podem acumular lipídeos em mais do que 20% de sua biomassa são definidos como espécies oleaginosas (RATLEDGE e WYNN, 2002).

Leveduras sob limitação de nutrientes passam por três fases de crescimento: o primeiro é a proliferação celular (fase exponencial de crescimento), então o crescimento é reduzido quando nutrientes tornam-se limitantes e as células começam a acumular lipídeos, e, finalmente, células entram na fase estacionária onde o acúmulo de lipídeos continua. Entretanto nessa fase a  $\beta$ -oxidação também se inicia em um esforço para remobilizar o carbono armazenado, até que as células não podem mais produzir metabólitos essenciais e interrompem a maioria das atividades metabólicas (BEOPOULOS et al., 2011).

Durante o processo de crescimento microbiano/acúmulo de reservas lipídicas, o fenômeno dominante que define a composição do lipídeo intracelular é, em primeiro passo, o processo específico de incorporação de ácidos graxos dentro das células microbianas e, em segundo, as mudanças endocelulares dos ácidos graxos, definida pela capacidade enzimática do micro-organismo. Os ácidos graxos também serão degradados por necessidade de crescimento ou como substrato dos processos de bio-transformações endocelulares, levando à mudança de concentração e produção de “novos” ácidos graxos, os quais não existiam previamente no substrato (AGGELIS et al., 1995, ZHAO et al., 2008).

O acúmulo de lipídeos pode ocorrer por duas vias metabólicas diferentes: (1) Síntese de lipídeos ‘de novo’ envolvendo a produção, em condições definidas, de ácidos graxos precursores, como acetil e malonil-CoA e sua integração dentro da via biossintética de estoque de lipídeos onde o graxo acil-CoA, se reúnem para formar (TAG) e esteril ésteres (EE). Os lipídeos neutros são armazenados dentro dos corpos lipídicos (CL) para servir como reservas de energia. (2) Síntese de lipídeos ‘ex novo’ via metabólica envolvendo a quebra de ácidos graxos, óleos e triglicerídeos a partir de meio de cultura e seu acúmulo em uma forma não alterada ou modificada dentro da célula. Esta via requer hidrólise de substrato hidrofóbico e incorporação/transporte de ácidos graxos na forma de tioésteres-CoA dentro da célula, os quais alimentam as vias

de estoque de lipídeos dentro de CL, para gerar acúmulo de lipídeos neutros (BEOPOULOS et al., 2009; BEOPOULOS et al., 2011).

Os ácidos graxos produzidos pela primeira via metabólica ou pela segunda são esterificados utilizando moléculas de glicerol ou em uma molécula de esteroide para formar os TAGs e EE, respectivamente. O processo completo é conhecido como a via lipídica de armazenamento, e os seus produtos finais formam a fração lipídica neutra da célula, empacotada no interior dos CL (BEOPOULOS et al., 2011).

Os lipídeos neutros armazenados nos CL podem ser mobilizados para atender às necessidades celulares de esteróides e ácidos graxos. A hidrólise dos TAG por lipases fornece diacilglicerol e ácidos graxos livres para biossíntese da membrana lipídica e da complementação das necessidades de energia da célula. Ácidos graxos, uma vez hidrolisados são direcionados à síntese de fosfolípidos ou para o peroxissomo onde ocorre a degradação através de  $\beta$ -oxidação (BEOPOULOS et al., 2011).

### 3.5.3. Ácidos graxos

Os ácidos graxos (AG) correspondem a uma cadeia carbônica apolar e um grupo carboxila polar, sendo representados pela fórmula geral RCOOH. Podem possuir de 4 a 36 átomos de carbonos e nenhuma ramificação. Os mais comumente encontrados são os que apresentam 16 e 18 átomos de carbonos. Na natureza, os AG são encontrados na forma saturada constituída apenas de ligações simples e cadeias planas, ou nas formas insaturadas constituídas por uma ou mais dupla ligações podendo apresentar uma curva em sua cadeia carbônica. As ligações duplas são sempre separadas por um grupo metileno ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) e possuem um sistema de classificação simplificado indicando o número de átomos de carbonos, número de ligações duplas e a localização das mesmas (Tabela 3) (NELSON e COX, 2011).

A presença de AG saturados e insaturados na membrana citoplasmática dos organismos tem fundamental importância quanto à determinação da fluidez, para compostos presentes na região externa à membrana, contudo, adaptando-se ao meio circundante, cumprem ainda funções energéticas e de reservas metabólicas, além de formarem hormônios e sais biliares (VALENZUELA e NIETO, 2003). Os AG poliinsaturados são aqueles que possuem mais de uma dupla ligação e estão subdivididos em famílias de acordo com sua derivação biossintética (NELSON e COX, 2011).

**Tabela 3** – Principais ácidos graxos presentes na natureza.

Fonte: Solomons e Fryhle (2006).

| Nome oficial                                | Nome usual         | Símbolo        | Ponto de fusão (°C) |
|---------------------------------------------|--------------------|----------------|---------------------|
| Ácido butanóico                             | Ácido butírico     | C4:0           | -8,0                |
| Ácido hexanóico                             | Ácido capróico     | C6:0           | -3,0                |
| Ácido octanóico                             | Ácido caprílico    | C8:0           | 16,5                |
| Ácido decanóico                             | Ácido cáprico      | C10:0          | 31,0                |
| Ácido dodecanóico                           | Ácido láurico      | C12:0          | 44,0                |
| Ácido tetradecanóico                        | Ácido mirístico    | C14:0          | 54,0                |
| Ácido hexadecanóico                         | Ácido palmítico    | C16:0          | 63,0                |
| Ácido cis-hexadec-9-enóico                  | Ácido palmitoleico | C16:1(9)       | 0,0                 |
| Ácido octadecanóico                         | Ácido esteárico    | C18:0          | 70,0                |
| Ácido cis-octadec-9-enóico                  | Ácido oleico       | C18:1(9)       | 13,0                |
| Ácido cis,cis-octadec-9,12-dienóico         | Ácido linoleico    | C18:2(9,12)    | - 5,0               |
| Ácido cis,cis,cis-octadec-9,12,15-trienóico | Ácido linolênico   | C18:2(9,12,15) | - 11,0              |
| Ácido eicosanóico                           | Ácido araquídico   | C20:0          | 75,0                |

Dentro da diversidade dos AG, existem aqueles que o organismo tem capacidade de síntese, porém outros não. Esses AG cuja biossíntese é inadequada são denominados AG essenciais: ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ 3) e ácido  $\gamma$ -linoléico ( $\omega$ 6). Para suprir a demanda orgânica, os mesmos devem estar em quantidades suficientes na alimentação. Vários estudos apontam que sua utilização traz benefícios para a saúde humana, prevenindo enfermidades cardiovasculares, câncer de cólon, doenças imunológicas e favorecendo o desenvolvimento cerebral e da retina (GONZÁLES, 2002). O  $\omega$ 3 e o  $\omega$ 6 são considerados precursores dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL): ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaheptaenóico (DHA) (JANEIRO, 2011).

Os AG essenciais são componentes estruturais importantes de todas as membranas, tanto revestindo uma célula quanto no seu interior. A composição lipídica da dieta e o adequado consumo de AG do tipo *cis* estão diretamente relacionados à composição da membrana celular, uma vez que esses ácidos atuam como elementos de comunicação entre as células, sendo precursores de certas prostaglandinas, além de controlarem o nível de colesterol e favorecerem a permeabilidade da pele. Dietas pobres em AG podem ocasionar dermatites, demora na cura de ferimentos, redução na resistência a infecções, alopecia e trombocitopenia (GURR, 1992; JANEIRO, 2011).

Os AG, principalmente na forma de fosfolipídeos, são encontrados entre os vários elementos que compõem as células do sistema imunológico, apresentando os linfócitos e macrófagos alto teor de ácido araquidônico. Este ácido, presente na membrana celular, após estimulação por mitógenos, linfocinas e antígenos, atua sobre diversas fases da resposta imunológicas através da produção de prostaglandinas e leucotrienos, que atuam como potentes mediadores inflamatórios (GURR, 1992; SILVA, 2010).

#### **3.5.3.1. Importância dos ácidos graxos no uso tópico**

Os AG são moléculas de natureza lipídica, como parte de fosfolípideos e glicolípideos e estão envolvidos em várias funções biológicas. Além disso, alguns AG desenvolvem uma função reguladora, esta função participa diretamente nas quatro fases de cicatrização da pele: a coagulação do sangue, inflamação, formação de tecido novo e remodelação do tecido (MANHEZI et al., 2008; JANEIRO, 2011).

A investigação sobre a utilização de AG essenciais na regeneração epitelial e na prevenção de úlceras crônicas em pacientes tem sido pouco descritas e observadas e, por conseguinte, não existem muitos estudos que descrevem a nível molecular o efeito benéfico da utilização tópica de ácidos graxos. Recentemente, tem sido demonstrado em animais de laboratório que ácidos oléico e linoléico desenvolvem um efeito pró-inflamatório, que facilita a regeneração de feridas e a estimulação da produção de citocinas (VEGF e IL-1) através da estimulação dos neutrófilos, formação de novos vasos sanguíneos e, assim, acelerar o processo de cicatrização. Além disso, quando o ácido linoléico é aplicado, a pele absorve diretamente e incorpora ceramidas mantendo junto o estrato córneo, o que aumenta a sua coesão celular (MARTINEZ et al., 2004; SOUTO e MULLER, 2008).

De acordo com Torra et al., (2003) e Martinez et al., (2004) os produtos compostos por AG essenciais apresentam propriedades que são caracterizadas por:

- Aumentar a microcirculação sanguínea, diminuindo o risco de isquemia;
- Facilitar a renovação das células da pele;
- Potencializar coesão celular da epiderme;
- Aumentar a resistência da pele contra os agentes causadores de úlceras de pressão;
- Impedir a desidratação da pele;

- Proteger contra o atrito;
- Reduz a fragilidade da pele;
- Diminuir o efeito dos radicais livres.

### **3.6. ESTRATÉGIA BIOTECNOLÓGICA: uso de resíduos agroindustriais**

Ao longo de sua existência, o homem sempre utilizou os recursos naturais do planeta e gerou resíduos com pouca ou nenhuma preocupação, já que os recursos eram abundantes e a natureza aceitava passivamente os despejos realizados. A partir do século XIX, com o surgimento da “onda industrial”, o modelo ou estratégia de desenvolvimento das nações consolidou suas bases técnicas e sociais. Este modelo gerou impressionantes excedentes de riqueza econômica, mas trouxe consigo grandes problemas sociais e ambientais, entre eles os resíduos (CASAGRANDE et al., 2008, FONSECA et al., 2011).

A contínua necessidade, por parte do mercado, de produtos dotados de propriedades funcionais sempre melhores, tem notadamente estimulado a pesquisa em direção à aplicação de materiais de baixo custo. Nos últimos anos, muitos foram os estudos que analisaram a possibilidade de reciclagem de uma vasta gama de resíduos agroindustriais (CÔRTEZ et al., 2011; LEONEL, 2011). As abordagens ambientais mais recentes apontam para o desenvolvimento sustentável como principal solução, minimizando assim o descarte de materiais pelo reaproveitamento dos resíduos gerados nos diversos setores da economia (ACCORSINI et al., 2012; BECKER, 2013).

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que minimiza os impactos negativos à natureza. O resíduo agroindustrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois, além de criar problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos no controle da poluição. Muitos trabalhos estudam a bioutilização de resíduos tais como: bagaço de cana-de-açúcar, manipueira, milhocina, óleo de refinaria, melaço, soro de leite, como substrato para o cultivo de diferentes tipos de micro-organismos, visando uma produção secundária, rentável economicamente, de baixo custo (PELIZER et al., 2007; LEONEL, 2011).

Os resíduos agroindustriais podem ser reutilizados como substratos na produção de processos fermentativos com diferentes tipos de micro-organismos, evitando a

contaminação de ambientes naturais e viabilizando economicamente a produção de metabólitos de valor comercial (CERQUEIRA e COSTA, 2009; ACCORSINI et al., 2012).

### 3.6.1. Soro de leite

O soro de leite é um subproduto extraído da porção aquosa do leite, gerada durante o processo de fabricação do queijo. Apresenta sabor ácido ou doce e sua constituição depende da técnica de coagulação e fabricação do queijo, cuja composição química apresenta quantidades consideráveis de lactose, proteínas solúveis e sais minerais. Durante muito tempo o soro foi considerado um resíduo de baixo ou nenhum valor comercial usado na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem qualquer tratamento (PAULA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012), provocando a destruição da flora e da fauna devido ao seu alto valor de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que é cerca de 30.000 a 50.000 mg.L<sup>-1</sup>. Tal índice é aproximadamente 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico e, considerando uma produção média de 10.000L de soro por dia, esta teria o poder poluente equivalente ao de uma população de 5.000 habitantes (MACHADO et al., 2001).

Portanto, a legislação ambiental exige cada vez mais das indústrias de laticínios um plano de tratamento ou reaproveitamento deste soro de leite. Acredita-se que aproximadamente 50% de todo o soro líquido produzido não é aproveitado, sendo este número ainda maior se forem consideradas as micro e pequenas empresas (BECKER, 2013; MORRIL, 2012). A conversão do resíduo soro de leite para insumo é considerada como uma inovação tecnológica na cadeia de produção agroindustrial do leite, de caráter predominantemente tecnológico, pois segundo Cónsoli e Neves (2006), este tipo de inovação prioriza ações que objetivam desenvolver novos processos de fabricação, novas matérias-primas e produtos de concepção inovadora.

As proteínas do soro do leite apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem certo grau de estabilidade estrutural. As frações, ou peptídeos do soro, são constituídos de: beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropéptídeos (GMP). Essas frações podem variar em tamanho, peso molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais (AIMUTIS, 2004; HARAGUCHI et al., 2006).

As proteínas do soro podem exibir diferenças na sua composição de macro e micronutrientes, dependendo da forma utilizada para sua obtenção. Segundo Araujo et al., (2011), 100g de concentrado protéico do soro do leite possui, em média, 414kcal, 80g de proteína, 7g de gordura e 8g de carboidratos. De acordo com Zubiolo et al., (2012), a composição média de aminoácidos é de 4,9mg de alanina, 2,4mg de arginina, 3,8mg de asparagina, 10,7mg de ác. aspártico, 1,7mg de cisteína, 3,4mg de glutamina, 15,4mg de ác. glutâmico, 1,7mg de glicina, 1,7mg de histidina, 4,7mg de isoleucina, 11,8mg de leucina, 9,5mg de lisina, 3,1mg de metionina, 4,2mg de prolina, 3,9mg de serina, 4,6mg de treonina, 1,3mg de triptofano, 3,4mg de tirosina e 4,7mg de valina, por grama de proteína. Segundo o autor, esses valores estão acima da média, quando comparados àqueles de outras fontes protéicas, fornecendo às proteínas do soro importantes propriedades nutricionais. Em relação aos micronutrientes, possui, em média, 1,2mg de ferro, 170mg de sódio e 600mg de cálcio por 100g de concentrado protéico.

Pesquisas recentes demonstraram a eficácia do permeado da ultrafiltração do soro de leite como fator de crescimento em meios de cultura de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, probióticos utilizados na formulação de alimentos funcionais. Verificou-se que o soro de leite funcionou como importantes fatores de crescimento para esses micro-organismos. Por outro lado, existe um grande descarte do soro de leite, sendo este produto servido como substrato para produção de ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* (HARAGUCHI et al., 2006; THAMER e PENA, 2006).

### 3.6.2. Milhocina

A milhocina é um produto gerado durante o processo de maceração por via úmida do milho, é utilizada principalmente como suplemento alimentar na fabricação de ração de ruminantes, fonte de nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas de moscas das frutas e fontes de nutrientes para micro-organismos em processo de fermentação industrial, visando a produção de subprodutos de importância comercial. É considerada uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os micro-organismos por conter em sua composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais. A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos (DOMINGOS, 2009; ZANOTTO, 2012).

O micro-organismo, quando crescido em meio contendo milhocina, produz ainda mais exopolímeros, o que facilita muito a adesão das células microbianas à semente de milho (ZANOTTO, 2012). De acordo com Silveira (2001), a milhocina pode substituir o extrato de levedura, com excelentes resultados. A milhocina, entretanto, é de difícil conservação e seu uso, dependente do valor do produto a ser obtido (Tabela 4).

**Tabela 4** - Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.

Fonte: Silveira, 2001.

| Aminoácidos (%) |       | Vitaminas (mg/Kg) |         | Minerais (mg/ Kg) |       | (%)  |
|-----------------|-------|-------------------|---------|-------------------|-------|------|
| Alanina         | 9,83  | Biotina           | 0,3     | Cálcio            | -     | 0,14 |
| Arginina        | 3,68  | Colina            | 3.500,0 | Cobre             | 15,0  | -    |
| Ác. aspártico   | 5,82  | Inositol          | 6000,0  | Ferro             | 100,0 | -    |
| Cisteína        | 2,20  | Niacina           | 80,0    | Manganês          | 20,0  | -    |
| Ác. glutâmico   | 18,07 | Piridoxina        | 9,0     | Manganês          | -     | 0,60 |
| Triptofano      |       | Riboflavina       | 6,0     | Potássio          | -     | 2,80 |
| Glicina         | 5,27  | Tiamina           | 3,0     | Sódio             | -     | 0,10 |
| Histidina       | 3,72  | Ácido             | 15      | Fósforo           | -     | 1,18 |
|                 |       | Pantotêmico       |         |                   |       |      |
| Isoleucina      | 3,07  | -                 | -       | Selênio           | 0,3   | -    |
| Leucina         | 8,28  | -                 | -       | Zinco             | 60,0  | -    |
| Lisina          | 4,75  | -                 | -       | Enxofre           |       | 0,60 |

Machado et al., (2010), promoveu a produção de inseticidas no controle de pragas agrícolas, por *Lecanicillium lacanii*, utilizando no meio de crescimento, a milhocina (MACHADO et al., 2010). Outros autores realizaram a produção de biossurfactante, utilizando a milhocina como fonte de nitrogênio no meio de cultivo, observando resultados positivos com leveduras e bactérias (FONTES et al., 2008; ANTUNES et al., 2013). Na produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus*, a milhocina se tornou bastante promissora no meio de cultivo, devido aos resultados positivos na produção (SILVA, 2007).

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABRUTYN, E.S. Antioxidantes na prevenção de rugas. **Cosmetics & Toiletries**, v. 23, p. 38-40, 2011.

ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Biossurfactantes produção por leveduras utilizando óleo de soja e glicerina como substrato de baixo custo. **Braz. J. Microbiol.**, v.43, n.1, p. 116-125, 2012.

ADRIO, J.L.; DEMAINE, A.L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, Barcelona, v. 6, p. 191–199, 2003.

AGGELIS, G.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S.; PAPADOPOULOS, G. A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. II Study of cellular lipids of *Mucor circinelloides* during growth on a vegetable oil. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 46, p. 245-250, 1995.

AIMUTIS, W.L. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. **J. Nutr.**, v. 134, n. 4, p. 989-95, 2004.

ANDRADE, R.F.S. **Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes de *Candida glabrata* e *Candida lipolytica* utilizando resíduos industriais como substratos alternativos**. 2010. Dissertação (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil.

ANTUNES, A.A.; ARAÚJO, H.W.C.; SILVA, C.A.A.; ALBUQUERQUE, C.D.C. CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arq. Inst. Biol.**, v. 80, n. 3, p. 334-341, 2013.

ANUNCIATO, T.P. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. **J Cosmet Dermatol.**, v. 11, n. 1, p. 51-4, 2011.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; HEGDE, S. Isolation, Screening and Production of Biosurfactant by *Bacillus clausii*. **Research in Biotechnology**, v. 3, p. 49-56, 2012.

ARAUJO, A.J.S.; BUENO, N.B.; GOMES, F.A.; CORREIA, H.J.A.; CORREIA, A.G.S.; LÚCIO, G.M.A. **Avaliação da composição nutricional de preparações enriquecidas com soro de leite implantadas na unidade de alimentação e nutrição do IFAL – Campus Satuba**. Anais do CONNEPI, 2011.

BANAT, I. M. Biosurfactant production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v.51: p.1-12, 1995.

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. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.

BARNUM, S. **Biotechnology: an Introduction**. Wadsworth Publishing Company, Beolmont. 225 p, 1998.

BAUMANN, K. Cell cycle: Changing lipids. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 151, p. 125-145, 2014.

BECKER, C.R. **Tratamento de soro de queijo por método físico-químico e por método biológico aeróbio**. 2013. Dissertação (Mestrado), Centro Universitário UNIVATES, Rio Gande do Sul, Brasil.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.H.; JOUVE, C.M.; NICAUD, J.M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 48, p. 375–387, 2009.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 1193-1206, 2011.

BERDYEEVA, T.K.; WOODWORTH, C.D.; SOKOLOV, I. Human epithelial cells increase their rigidity with aging in vitro: direct measurements. **Phys. Med. Biol.**, v. 50, n. 1, p. 81-92, 2005.

BERGAMIN, C.S.; ROLIM, L.C.; DIB, S.S.; MOISÉS, R.S.; Pseudo-obstrução intestinal em paciente com diabetes mitocondrial que apresentou boa resposta ao tratamento adjunto com coenzima Q<sub>10</sub>. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 8, p. 1345-1349, 2008.

BIALKOVÁ, A; ŠUBÍK, J. Biology of the Pathogenic Yeast *Candida glabrata*. **Folia Microbiol.**, n. 51, p. 3–20, 2006.

BOELSMA, E.; HENDRIK, H.F.J.; ROZA, L. Nutricional skin care: health effects of micronutrientes and fatty acids. **Am J Nutr.**, v.73, p.853-64, 2001.

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

BRANDT, M.E.; LOCKHART, S.R. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. **Curr Fungal Infect Rep.**, v. 6, p. 170–177, 2012.

BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 54-57, 2002.

BUENO, M.S. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

BULE M.V.; SINGHAL, R.S. Use of carrot juice and tomato juice as natural precursors for enhanced production of ubiquinone-10 by *Pseudomonas diminuta* NCIM 2865. **Food Chemistry**, v. 116, p. 302–305, 2009.

BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 573–606, 2000.

CARDOSO, F.M.O. **Nutrição e longevidade**. 2009. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Porto, Portugal.

CAROLEI, L.; GUTZ, I.G.R. Simultaneous determination of three surfactants and water in shampoo and liquid soap by ATR-FTIR. **Talanta**, v. 66, n. 1, p. 118-124, 2005.

CASAGRANDE, M.C.; SARTORA, M.N.; GOMESA, V.; DELAA, V.P.; HOTZAA, H.; OLIVEIRA, A.P.N. Reaproveitamento de Resíduos Sólidos Industriais: Processamento e Aplicações no Setor Cerâmico. **Revista cerâmica industrial**, n. 13, p. 34-42, 2008.

CASTANHA, R.F. **Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas**. 2012. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

CASTIGLIONE, L.G.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A. Produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, p. 292-295, 2009.

CERQUEIRA, V.S.; COSTA, J.A. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 395-400, 2009.

CLAUDINO, A.L.R. **Caracterização de isolados de *Candida* sp de cavidade bucal quanto aos aspectos fenotípicos e moleculares e obtenção de mutantes**

**heteroresistentes á antotericina B e fluconazol.** 2007. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial Surfactants and Their Use in Field Estudios of Soil Remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

CHU, W.; CHAN, K.H. The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic organics. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 307, p. 83-92, 2003.

COLIN, V.L. Technology of Biosurfactants for the Development of Environmental Remediation Processes. **Single Cell Genomics Proteomics**, v. 1, p.100-7, 2012.

CÔNSOLI, M.A.; NEVES, M.F. Estratégias para o leite no Brasil. **Atlas**, São Paulo, 2006.

CÔRTES, P.L.; FILHO, A.P.A.; RUIZ, M.S.; TEIXEIRA, C.E. A deposição de resíduos industriais organoclorados no litoral do estado de São Paulo: um estudo de caso. **Revista de inovação e administração**, v. 8, n. 2, p. 132-163, 2011.

CRANE, F.L.; HATEFI, Y.; LESTER, R.L.; WIDMER, C. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, v. 25, p. 220–221, 1957.

CSANK, C.; HAYENS, K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. **Microbiol. Lett.**, v. 189, p. 115–120, 2000.

CUERVO, M.; GALOFRE, E. The effectiveness of hyperoxygenated fatty acids in the care of skin perilesional, the prevention of the pressure ulcers, vascular ulcers and diabetic foot. **Gerokomos**, v. 20, n. 1, p. 41-45, 2009.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polymeric hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosph**, v. 72, p. 1229-1234, 2008.

DELABIO, A.S.; REMÉDIO, R.R.; CAZASSA, S.; MONTEIRO, R.T.R.; HARDER, M.N.C. Seleção de leveduras para a produção de lipídios como matéria-prima para biodiesel. **Bioenergia em revista: diálogos**, n. 2, p. 26-38, 2012.

DEL PINO, J.C.; ZAGO NETO, O.G. **Trabalhando a Química dos Sabões e Detergentes**. 1996. Seção Materiais Didáticos (Site da AEQ), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DOMINGOS, M. **Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação**. 2009. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, São Paulo, Brasil.

DRAELOS, Z. D. Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 400-408, 2010.

DUBERLEY, K.E.C.; ABRAMOV, A.Y.; CHALASANI, A.; HEALES, S.J.; RAHMAN, J.; HARGREAVES, I.P. Human neuronal coenzyme Q<sub>10</sub> deficiency results in global loss of mitochondrial respiratory chain activity, increased mitochondrial oxidative stress and reversal of ATP synthase activity: implications for pathogenesis and treatment. **J Inherit Metab Dis.**, v. 10, p. 1-11, 2012.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISHER, G.; DURRENS, P.; CASAREGOLA, S.; LAFONTAINE, I.; DE MONTIGNY, J.; MARCK, C.; NEUVEGLISEN, C.; TALLA, E. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, p. 35-44, 2004.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H.A.; GLASS, C.K.; MERRILL, A.H.; MURPHY, R.C.; RAETZ, C.R.H.; RUSSEL, D.W.; SEYAMA, Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, T.; SPENER, F.; VAN- MEER, G.; VAN-NIEUWNHIZE, M.S.; WHITE,

S.H.; WITZTUM, J.L.; DENNIS, E.A. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipids**, v. 46, n. 839, 2005.

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

FERREIRA, L.O.; PIMENTA, C.J.; SANTOS, G.; RAMOS, T.M.; PEREIRA, P.A.P.; PINEHIRO, A.C.P. Adição de soro de leite e café na qualidade do doce de leite pastoso. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1314-1319, 2012.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante Por levedura. **Quim. Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-99, 2008.

FONSECA, A.L.; SILVA, A.S.; BISPO, E.R.; PEIXOTO, E.B.; VOLPI, J.R.; FERREIRA, W.D.L.; TEODORO, M.J.F. Desenvolvimento sustentável, uma nova era para a indústria no Brasil. **Revista Expressão**, n. 2, p. 63-82, 2011.

GOMES, W.S.; BORÉM, A. Biotecnologia: novo paradigma do agronegócio brasileiro. **Revista de economia e agronegócio**, n. 1, vol. 11, p. 115-136, 2013.

GONZÁLES, M.I. Ácidos grasos omega 3: benefícios y fuentes. **Interciencia**, v. 27, p. 128-36, 2002.

GURR, M.I. **Role of fats in food and nutrition**. Elsevier Applied Science, London, 1992.

HA, S.; KIM, S.; SEO, J.; JEYA, M.; ZHANG, Y.; RAMU, T.; KIM, I.; LEE, J. Ca<sup>2+</sup> increases the specific coenzyme Q<sub>10</sub> content in *Agrobacterium tumefaciens*. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 32, p. 697–700, 2009.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; PAULA H. Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. **Revista de nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HARMAN, D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history. **Biogerontology**, v. 10, n. 6, p. 773-81, 2009.

HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 462–478, 1995.

HERNANDEZ, A.J.; NAHAS, R.M. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 3, p. 2-12, 2009.

HEWITT, P.G. **Física Conceitual**. Ed. Bookman, São Paulo, Brasil, 2002.

HOPPE, U.; BERGEMANN J.; DIEMBECH, W.; ENNEN, J.; GOHLA, S.; HARRIS, I.; JACOB, J.; KIELHOLZ, J.; MEI, W.; POLLET, D.; SCHACHTSCHABEL, D.; SUERMANN, G.; SCHREINER, V.; STAB, F.; STECKEL, F. Coenzyme Q, a cutaneous antioxidant and energizer. **Biofactors**, v. 9, p.371–378, 1999.

INGLIS, D.O.; ARNAUD, M.B.; BINKLEY, J.; SHAH, P.; SKRYPEK, M.S.; WYMORE, F.; BINKLEY, G.; MIYASTO, S.R.; SIMISON, M.; SHERLOCK, G. The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 667-674, 2012.

JAMAL, P.; WAN, M.F.; WAN, N.; ZAHANGIR, A. Optimum Medium Components for Biosurfactant Production by *Klebsiella pneumonia* WMF02 Utilizing Sludge Palm Oil as a Substrate. **J. of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p.100-108, 2012.

JANEIRO, A.I. **Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides**. 2011. Tese (Doutorado), Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

JARA, A.M.A.T.; ANDRADE, R.F.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated

from petroleum-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.101, p. 315-318, 2013.

JAVIER, P.B.F; ANTONIO, N.R.J. Análisis de Clases de Lípidos por Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución. **Invurnus**, v. 6, n. 2, p. 38-43, 2011.

JULVE, J.; ESCOLA-GIL, J.C.; ROTLLAN, N.; FIEVET, C.; VALLEZ, E.; DE LA, T.C.; RIBAS, V.; SLOAN, J.H.; BLANCO-VACA, F. Human apolipoprotein A-II determines plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high-density lipoprotein proteome. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 30, p. 232–38, 2010.

JUNIOR, D.P.L.; YAMAMOTO, A.C.A.; MARTINS, E.R.; TEIXEIRA, A.F.R; HAHN, R.C. Leveduras do gênero *Candida* isoladas de sítios anatomicamente distintos de profissionais militares em Cuiabá (MT), Brasil. **An. Bras. Dermatologia**, vol. 86 n. 4, p. 675-680, 2011.

JUSZCZYK, P.; TOMASZEWSKA, L.; KITA, A.; RYMOWICZ, W. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. **Bioresour. Technol.**, v. 137, p. 124-131, 2013.

KATE, T.K.; LAIRD, S.A. **The commercial use of biodiversity**. Earthscan Publications Ltd., London. 398p, 1999.

KAWAMUKAI, M. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q<sub>10</sub> by yeasts and other organisms. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 53, n. 4, p. 217–226, 2010.

KIRAN, G.S.; THOMAS, T.A; SELVIN, J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, p. 8-16, 2010.

KURTZMANN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Elsevier Scientific B.V., Amsterdam, Netherlands, 2000.

LEONEL, E. C. **Aproveitamento da glicerina proveniente da produção de biodiesel na obtenção de adsorventes para Cr<sup>3+</sup> de rejeitos industriais**. 2011. Dissertação (Mestrado), Universidade de Franca, São Paulo, Brasil.

LI, Y.H.; ZHAO, Z.B.; BAI, F.W. "High-density cultivation of oleaginous yeasts *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture". **Enzyme Microb. Technol.**, v. 41, p. 312-317, 2008.

LIMA, C.J.B; SÉRVULO, E.F.C; CARDOSO, V.L. Potencialidade de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biossurfactantes. **Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 1, p. 73-79, 2007.

LIPSHUTZ, B.H.; MOLLARD, P.; PFEIFFER, S.S.; CHRISMAN, W. A short, highly efficient synthesis of coenzyme Q<sub>10</sub>. **J Am Chem Soc.**, v. 124, p. 4282–83, 2002.

LITARRU, G.P.; TIANO, L. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q<sub>10</sub>: recent developments. **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 1-37, 2007.

LITTARRU, G.P.; LAMBRECHTS, P. Coenzyme Q<sub>10</sub>, multiple benefits is one ingrediente. **OCL**, v. 18, p. 76-82, 2011.

LOURITH. N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 255–261, 2009.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Braz Arch Biol Technol.**, v. 52, p.785-793, 2009.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, n. 4, p. 2463-76, 2011.

MACHADO, R.M.G.; SILVA, P.C.; FREIRE, V.H. Controle ambiental em indústrias de laticínios. **Brasil Alimentos**, n. 7, p. 34-36, 2001.

MACHADO, A.C.R.; MPNTEIRO, A.C.; ALMEIDA, A.M.B.; MARTINS, M.I.E.G. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. **Revista Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45, n. 10, p. 1157-1163, 2010.

MACKENZIE, K.F.; SINGH, K.K.; BROWN, A.D. Water stress plating hypersensitivity of yeast: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 1661–1666, 1988.

MAGALHÃES, J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. **Cosmetologia: com questões de avaliação**, n. 42, v. 145, p. 33-42, 2000.

MANHEZI, A.C.; BACHION, M.M.; PEREIRA, A.L. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Rev Bras Enferm.**, v. 61, n. 5. p. 620-8, 2008.

MARTINEZ, F.; SOLDEVILLA, J.J.; NOVILLO, L.M.; SEGOVIA, T. Prevenção de úlceras de pressão. In: Soldevilla, Torra JE (eds). **Cuidado Integral de feridas crônicas**. Madrid: SPA, 2004.

MATSUURA, A.B.J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. 2004. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

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

DÔSSIE. Os antioxidantes. **Foods Ingredients Brasil**, n. 6, p.1-16, 2009.

METZGER, J.O.; BORNSCHEUER, U. Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 71, p. 13–22, 2006.

MONGELO, A.I. **Validação de Método Baseado em Visão Computacional para Automação da Contagem de Viabilidade de Leveduras em Indústrias Alcooleiras**. 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul, Brasil.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. Prentice Hall, New Jersey, USA. 574p, 1996.

MORRIL, W.B.B.; ROLIM, M.M.; NETO, E.B.; PEDROSA, E.M.R.; OLIVEIRA, V.S.; ALMEIDA, G.LP. Produção e nutrientes minerais de milheto forrageiro e sorgo sudão adubado com soro de leite. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 182–188, 2012.

MORTON, R.A. Ubiquinon. **Nature**, v. 4752, p. 1764–1767, 1958.

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

MURALIKRISHNA, A.R.; HATCHER, J.F.; DEMPSEY, R.J. Lipids and Lipidomics in Brain Injury and Disease. **The AAPS Journal**, v. 3, p. 314-319, 2006.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; KOCHUPAPPY, T.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfs: properties, commercial production and application. **Current science**, v. 94, n 6, p. 736-747, 2008.

NAJJAR, A.; ROBERT, S.; GUÉRIN, C.; VIOLET-ASTHER, M.; CARRIÈRE, F. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 89, p. 1947–1962, 2011.

NAM, X.; LIMING, L.; WEI, L.; JIE, L.; QIANG H.; JIAN, C. Reconstruction and analysis of the genome-scale metabolic network of *Candida glabrata*. **Mol. BioSyst.**, v. 9, p. 205-216, 2013.

NEGISHI, E.; LIOU, S.Y.; XU, C.; HUO, S. A novel, highly selective, and general methodology for the synthesis of 1,5-diene-containing oligoisoprenoids of all possible geometrical combinations exemplified by an iterative and convergent synthesis of coenzyme Q<sub>10</sub>. **Org Lett.**, v. 4, p. 261–264, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehnhinger: Princípios da Bioquímica**. Sorvier, São Paulo. 965p, 2002.

NIE, M.; YIN, X.; REN, C.; WANG, Y.; XU, F.; SHEN, Q. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 635-643, 2010.

OLIVEIRA, R.S.; CASTRO, A.S.; RIBAS, J.L.L. Action of coenzyme Q-complex under the effect of á-lipoic acid (ALA) in the treatment of fibromyalgia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 71-76, 2011.

OYAMA, L.M.; ESTADELLA, D.; SILVA, M.S.; SILVA, M.H.G.G.; NASCIMENTO, C.M.O. Metabolismo lipídico. In: DÂMASO, A. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Editora Medsi, Rio de Janeiro, p. 81-88, 2001.

OSAMU, Y.; KOIZUMI, Y.I.; OHSHIRO, T.; IZUMI, Y.; MARUHASHI, K. Enhancement and stabilization of desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by feeding ethanol and sulfur components. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 447-452, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKASB, S.; FICKA, M.; CHEVALOTA, I.; GALIOTOU-PANAYOYOUN, M.; KOMAITISH, M.; MARCA, I.; AGGÉLIS, 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, n. 1, p. 60-71, 2008.

PARK, Y.C.; KIM, S.J.; CHOI, J.H.; LEE, W.H.; PARK, K.M.; KAWAMUKAI, M.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. Batch and fed-batch production of coenzyme Q<sub>10</sub> in recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans*. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 67, n. 2, p. 192-196, 2004.

PAULA, L.; ROLIM, M.M.; NETO, E.B.; SOARES, T.M.; PEDROSA, E. M. R.; SILVA, E.F.F. Crescimento e nutrição mineral de milho forrageiro em cultivo hidropônico com soro de leite bovino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 9, p. 931–939, 2011.

PARTHASATATHI, R.; ELANGO, R.; JOICE, P.A. Isolation and identification of potential biosurfactant producers from mangrove ecosystems. **Golden Research Thoughts**, v. 3, n. 7, p. 1-6 , 2014.

PATHAK, K.V.; KEHARIA, H. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). **Biotech.**, v. 4, n. 1, p. 41-48, 2014.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Makron Books do Brasil, São Paulo. 524p, 1997.

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, p. 118-127, 2007.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, Brasil.

QUINZII, C.M.; LOPEZ, L.C.; VON MOLTKE, J.; KRISHNA, A.N.S.; SCHULEKE, M.; SALVIATI, L.; NAVAS, P.; DIMAURO, S.; HIRANO, S. Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ<sub>10</sub> deficiency. **The FASEB J.**, v. 22, n. 6, p. 1874-1885, 2008.

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, Characterisation and Biosurfactant – Review. **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 360-370, 2008.

RATLEDGE, C. **Biochemistry, stoichiometry, substrate and economics**. In: MORETON, R.S. (Ed.). Single cell oil. London: Longman, p. 33-70, 1988.

RATLEDGE, C.; WYNN, J.P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 51, p. 1—51, 2002.

RIBEIRO, D.L.R.; ANDRADE, R.F.S.; ANTUNES, A.A.; SILVA, A.M.; MAX, Y. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by *Rhodotorula glutinis* UCP 1555 using industrial wastes. **Microbes In Applied Research: Current Advances and Challenges**, Ed. Mendez-Vilas, p. 55-59, 2012.

RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; MEI, H.C.; VAN DER; OLIVEIRA, R. Isolation and Partial Characterization of Biosurfactant Produced by a *Streptococcus thermophilus* A. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 105-112, 2006.

RONA, C.; BERARDESCA, E. Aging skin and food supplements: the myth and truth, **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 641-647, 2008.

ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMOND, S.; LEONARD, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. **Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies**, Ed. Dr. Margarita Stoytcheva, p. 71-92, 2011

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SARUBBO, L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1-5, 2014.

SABATINI, D.A.; McINERNEY, M.J.; YOUSSEF, N.; NGUYEN, T. Evaluation of submicellar synthetic surfactants versus biosurfactants for enhanced LNAPL recovery. **Final Report**, p. 1-57, 2006.

SAHARAN, B.S.; SAHU, R.K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives Genetic Engineering. **Biotechnology Journal**, v. 2011, p. 1-39, 2011.

SANTOS, F.K.G.S.; ALVES, J.V.A.; DANTAS, T.N.C. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. In: **4º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás (PDPETRO)**, 2007

SANTOS, S.R.N. **Aspectos Bioquímicos e Moleculares da Coenzima Q<sub>10</sub>**. 2011. Dissertação (Mestrado), Universidade Fernando Pessoa, Aveiro, Portugal.

SARAFIN, Y.; DONIO, M.B.S.; VELMURUGAN, S.; MICHAELBABU, M.; CITARAS, T. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 12, p. 1-9, 2014.

SATPUTE, S.K.; BANAT, I.M.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANPURKAR, A.G.; CHOPADE, B.A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnol. Adv.**, v. 28, p. 436–450, 2010.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.C.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 155-166, 2007.

SEKHON, K.K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S.S. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. **Microbial Cell Factories**, v.10, p. 1-10, 2011.

SHAATH, N.A. The chemistry of sunscreens. **Cosmetic science and technology series**, v. 15, p. 263-283, 1997.

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **J. Biotechnol.**, v. 40, p. 7-17, 1995.

SILVA, A.C. **Produção de quitina e quitosana em cultura submersa de *Rhizopus arrhizus* nos meios de milhocina e sintético para *Mucorales***. 2007. Dissertação (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil.

SILVA, A.M. **Produção de quitosana *Absidia corymbifera* em meio de baixo custo e aplicação na descoloração de efluente industrial**. 2010. Dissertação (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil.

SILVA, W.J.M.; FERRARI, C.K.B. Mitochondrial metabolism, free radicals and aging. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SILVEIRA, M.M.; WISBECK E.; HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 55, p. 442-45, 2001.

SINGH, V. Biosurfactant - Isolation, Production, Purification and Significance. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, n. 7, p.1-4, 2012.

SINGH, P.B.; SAINI, H.S. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals. **Exploitation of Agro-Industrial Wastes to Produce Low-Cost Microbial Surfactants**, v. 5, p. 445-471, 2014.

SITEPU, I.R.; SESTRICC, R.; IGNATIAA, L.; LEVINIC, D.; GERMANA, J.B.; GILLIESD, L.A.; ALMADAA, A.G.; BOUNDY-MILLSA, K.L. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 360–369, 2013.

SIVAPATHASEKARAN, C.; MUKHERJEE, S.; RAY, A.; GUPTA, A.; SEN, R. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 2884–2887, 2010.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica 1 e 2**. L.T.C., Rio de Janeiro, 2006.

SOUTO, E.B.; MULLER, R.H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 1, p. 157-165, 2008.

STRELEC, T. **Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes Ramnolipídeos e polihidroxialcanoatos a avaliação da relação metabólica no**

**processo de síntese.** 2006. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

TANIMURA, A.; TAKASHIMAB, M.; SUGITAC, T.; ENDOHB, R.; KIKUWAA, M.; YAMAGUCHIA, S.; SAKURADAIND, E.; OGAWAD, J.; SHIMAA, J. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 230–235, 2014.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de Bebidas Lácteas Funcionais Fermentadas por Probióticos e Acrescidas de Prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

TIMMA, L.; SAMS, K.; VALTERE, S.; VILGERTS, J.; BLUMBERGA, D. Full Factorial Design of Screening Experiments for Biosurfactant Enhanced Remediation of Hydrophobic Substances in Soil. **Journal of Clean Energy Technologies**, v. 2, p. 51-56, 2014.

TORRA, I.; BOU, J.; RUEDA, J.; SEGOVIA, G.; BERMEJO, M. A aplicação tópica de um composto de ácido graxo hyperoxygenated. Efeitos preventivos e curativos em úlceras de pressão. **Papel Enferm Rev.**, v. 26, n. 1, p. 3-11, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Artmed, Porto Alegre. 934p, 2012.

TSIGIE, Y.A.; WANG, C.Y.; TRUONG, C.T.; JU, Y.H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, p. 216–222, 2011.

ÚBEDA, B.T. **Estudo da Produção de Biossurfactante pela Bactéria *Kocuria rhizophila***. 2002. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

VALENZUELA, A.B.; NIETO, S.K. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importância em el desarrollo del sistema nervioso y visual. **Rev Chil Pediatr.**, v. 74, p. 149-57, 2003.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. Artmed, Porto Alegre. 1168p, 2014.

WOLF, D.E.; HOFFMAN, C.H.; TRENNER, N.R.; ARISON, B.H.; SHUNK, C.H.; LINN, B.D.; MCPHERSON, J.F.F.; FOLKERS, K. Structure studies on the coenzyme Q group. **J Am Chem Soc.**, v. 80, p. 47-52, 1958.

WOODS J.R.; CHARLES E. **Examination of the effects of biosurfactant concentration on natural gas hydrate formation in seafloor porous media**. 2004. Dissertação (Mestrado), Mississippi State University, Mississippi, United State.

YEN, H.W.; SHIH, T.Y. Coenzyme Q<sub>10</sub> production by *Rhodobacter sphaeroides* in stirred tank and in airlift bioreactor. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 32, p. 711–716, 2009.

ZANOTTO, C. **Caracterização de resíduo da indústria de beneficiamento de milho**. 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil.

ZHAO, X.; KONG, X.; HUA, Y.; FENG, B.; ZHAO, Z.K. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 5, p. 405–412, 2008.

ZUBIOLO, C.; RODRIGUES, M.A.S.; OLIVEIRA, M.C.; NUNES, M.L.; CASTRO, A.A. Estudo do desenvolvimento de bebida láctea funcional com adição de polpa de mamão e aveia. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2012.

## Capítulo II

**Biosurfactants production by *Candida glabrata* strains using industrial wastes as carbon and nitrogen sources**

Manuscrito publicado no livro: **Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 701-705, 2012.

---

## Biosurfactants production by *Candida glabrata* strains using industrial wastes as carbon and nitrogen sources

R. A. Lima<sup>\*1,2</sup>; R. F. Silva Andrade<sup>1,4</sup>; A. A. Antunes<sup>4</sup>; H. A. Casullo<sup>2</sup>; A. M. A. T. Jara<sup>3</sup>; L. R. R. Berger<sup>1,4</sup> and G. M. de Campos-Takaki<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Química, Universidade estadual da Paraíba, PB, Brasil

<sup>3</sup> Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

<sup>4</sup> Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, 50050-900, Recife, PE, Brasil.

\*Corresponding author: e-mail: Roberto\_biologia@hotmail.com, Phone: +81 34217385

Biosurfactant production by two strains of *Candida glabrata* (UCP 1002 and UCP 1556) was performed using a biotechnological process using industrial wastes as sources of carbon and nitrogen. The first fermentation occurred in the control medium, and the second fermentation in the same way, replacing glucose by whey (carbon source), and corn steep liquor by peptone (nitrogen source) following the conditions used in the experimental design (DCCR). The best results obtained for biosurfactant production in both strains were observed in the assay 8 (25% whey and corn steep liquor 11.02%), the surface tension reduction was from 70 to 31.2 mN / m in *C. glabrata* (UCP 1002). For the rate of emulsification, the best results in both strains were obtained in the assay 7 (25% whey and corn steep liquor 4%), with a better rate of emulsification of 90% in *C. glabrata* (UCP 1556). The biosurfactant showed greater stability, determined by surface tension and was produced by *C. glabrata* (UCP 1556) against to a wide range of salt concentrations and at different pHs.

**Keywords:** Corn steep liquor; whey; *Candida glabrata*; biosurfactant

### 1. Introduction

Biotechnology is defined as any technological applications that use biological systems, living organisms or derivatives there for make or modify products or processes for specific uses. In this sense, the fermentation processes allow the use of by products and waste from industries and agricultural industries as food sources for microorganisms [1-2].

The use of carbon and nitrogen source for microbial growth and production of metabolites is essential because it is closely related to the metabolism of microorganisms. The use of agro-industrial residues for the production of biosurfactants feasible, economically, and the process and reduced to the pollution caused by these wastes when released into the environment [3]. The whey and corn steep liquor, wastes are generated in industry corn and dairy, respectively, and are excellent sources of nitrogen and carbon for the microorganisms in the medium composition and containing amino acids, vitamins and minerals. Several studies demonstrated the influence of the sources of carbon and nitrogen in the medium of production considered important parameters in the production of biosurfactants [2-4].

The biosurfactants are metabolites secondary produced by microorganisms excreted extracellular, in its structure that have a hydrophilic and a hydrophobic region acting at the interface of fluid phases with different degrees of polarity. This polymer has received great interest due to the characteristics that make them advantageous compared to the chemical surfactants, because they act to reduce surface tension, have for the most part, effective stability at different temperatures and pHs, low toxicity, biodegradability and synthesis of material from renewable [5].

This paper describes the evaluation of the biotechnological potential of two strains of *Candida glabrata* (UCP 1002 and 1556) in the production of biosurfactants using low-cost way, based on industrial wastes, using an experimental design like the Central Composite Rotational Design (CCRD).

### 2. Materials and methods

Microorganisms: *Candida glabrata* (UCP 1556), isolated from soil in semi-arid region of Pernambuco, and *C. glabrata* (UCP 1002) isolated from mangrove sediments (town of Rio Formoso, PE, Brazil) was kindly provided from collection of cultures of the Nucleus of Research in Environmental Sciences (NPCIAMB) Catholic University of Pernambuco, and registered at the World Federation Culture for Collection- WFCC. The culture was maintained on Sabouraud Dextrose Agar medium [6].

The substrates used were corn steep liquor, a bioproduct from corn processing industry, and whey from the dairy industry of São Bento do Una (PE), used as a means of biosurfactant production.

We conducted an experimental design like the Central Composite Rotational Design (CCRD), 2<sup>2</sup>.

The medium composition used as control was described by Natori et. al [7] modified, constituted by yeast extract (1g/mL), peptone (1g/mL), glucose (2g/mL), CaCO<sub>3</sub> (0, 12g/mL) and MgSO<sub>4</sub> (0.03 g / mL). This medium was modified by replacement of peptone by corn steep liquor and glucose by whey.

The production of biosurfactant by *Candida glabrata* was performed the following steps:

Growth: cells of *C.andida glabrata* (UCP 1002 and 1556) were grown on YMA - Yeast Mold Agar (yeast extract 0.3 g / mL, malt extract 0.3 g / mL, tryptone 0.5 g / mL, D- glucose 1g/mL and agar 5g/mL) and incubated for 48h at 28 °C.

Pre-inoculums: The inoculums were prepared from young cells transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 ml of Sabouraud broth (3 g meat peptone, 20 g glucose and distilled water 1000 mL), incubated aerobically for 24 h, 28 °C and 150 rpm in orbital shaker at.

Submerged fermentation: two fermentations were carried out, the first using the control proposed by Natori et. al [7] modified, for the production of biosurfactant by *C. glabrata* (UCP 1002 and 1556, respectively). The pre-inoculums corresponded to 5% of the cells suspensions corresponding to 10<sup>7</sup> cells / mL obtained from the growth on Sabouraud dextrose broth. The Erlenmeyer flasks of 250 mL of capacity containing 100 mL of medium the proposed as control. The flasks were kept under orbital agitation of 150 rpm, incubated for 72 hours at a temperature of 28<sup>0</sup>C. After this period the culture was centrifuged at 4000 rpm and filtered (120 silkscreen nylon mesh) to separate cells from fluid metabolism. The cell-free metabolic liquid was subjected to the determination of surface tension. The second fermentation was performed in the same growing conditions and the substrates were added according to the concentration established by factorial design (CCRD), 2<sup>2</sup>. It was determined pH, emulsification index and surface tension as a response variable.

Kinetics of growth: the growth of strains of *Candida glabrata* (UCP 1002 and 1556) was accompanied by technique Pour-Plate and results were expressed in UCF/ mL. Aliquots were collected each 4 h in total duration of 12 h, and then were collected at 24 h, and total of 168 h.

Determination of pH: was used Orion (model 310) for measuring the pH of aliquots collected from the means of production.

Determination of surface tension: the cell-free metabolic liquid containing the biosurfactant after 72 hours of culture was measured in an automatic tensiometer (model Sigma 70-KSV Ltd., Finland) using the ring DU NUOY, dipping in liquid, recording the force required to pull it through the air-liquid interface [8].

Determination of emulsification index: was performed in all conditions of the experimental design (CCRD). The samples were centrifuged at 4000rpm at a temperature of 100C for 20 minutes and the supernatant was analyzed by the method of Cooper and Goldenberg [9].

Stability: The condition of biosurfactant selected (CCRD) experimental design was evaluated for stability according to the surface tension-free metabolic cells with different pHs (2,4,6,8,10 and 12), different concentrations of NaCl (2%, 4%, 6%, 8%, 10% and 12%) and different temperatures (0 °C, 5 °C, 70° C, 100 °C and 120 °C) for 10 minutes.

### 3. Results and discussions

#### 3.1 Production of biosurfactant by *Candida glabrata* (UCP 1002 and 1556)

In order to stimulate the production of biosurfactants aggregate cost reduction process, it stimulated production of these biopolymers using industrial wastes. In this context, the production of biosurfactants was investigated by two strains of *Candida glabrata* (UCP 1002 and 1556) using the control medium, proposed by Natori et. al [7] modified. In control medium, the strains of *C. glabrata* (UCP 1002 and 1556) showed similar values on reducing the surface tension of 70 mN / m of water to 45.53 mN / m and 47.28 mN / m, respectively. In the second fermentation (replaced corn steep liquor by peptone and glucose by whey) performed in accordance with the requirements for planning (CCRD) of 2<sup>2</sup>, after 72 hours of culture, the occurrence of maximum production of biosurfactant was observed. A significant reduction of surface tension of water from 70 mN / m to 31.2 mN / m *C. glabrata* (UCP 1002) and 32.15 mN / m *C. glabrata* (UCP 1556), the assay 8 of planning CCRD (Table 1) were observed. The carbon source determined the type and properties of biosurfactants as the source of nitrogen directly influences cell growth [10]. Yeasts, even those of the same species have different responses to the biosurfactant production in the face of various culture media media [4-11-12-13]. The biopolymers produced showed similar ability to reduce the surface tension of the biosurfactant *Candida lipolytica* (32 mN / m) [14] and

showed higher values of surface tension reduction of biosurfactant with *Candida antarctica* (35 mN / m) [15] and *Yarrowia lipolytica* (50 mN / m) [16].

Table 1. Results of fermentation of *Candida glabrata* using experimental design (CCRD) of 2<sup>2</sup> with four replications of the center point after 72 hours of cultivation, using surface tension as the response variable, and emulsification index.

| Conditions | Whey (%) | Corn steep liquor (%) | Index emulsification Oil burning engine (%) |          | Surface tension (%) |          |
|------------|----------|-----------------------|---------------------------------------------|----------|---------------------|----------|
|            |          |                       | UCP 1002                                    | UCP 1556 | UCP 1002            | UCP 1556 |
| 1          | 10.0     | 5.0                   | 75                                          | 75       | 37.3                | 46.9     |
| 2          | 10.0     | 10.0                  | 70                                          | 80       | 40.2                | 44.8     |
| 3          | 40.0     | 5.0                   | 79                                          | 77       | 45.2                | 46.9     |
| 4          | 40.0     | 10.0                  | 75                                          | 75       | 41.7                | 39.2     |
| 5          | 3.85     | 7.5                   | 76                                          | 80       | 38.2                | 43.4     |
| 6          | 46.15    | 7.5                   | 80                                          | 70       | 43.9                | 41.2     |
| 7          | 25.0     | 4.0                   | 80                                          | 90       | 43.4                | 42.5     |
| 8          | 25.0     | 11.02                 | 71                                          | 80       | 31.2                | 32.15    |
| 9          | 25.0     | 7.5                   | 75                                          | 75       | 35.1                | 36.8     |
| 10         | 25.0     | 7.5                   | 74                                          | 81       | 36.6                | 39.7     |
| 11         | 25.0     | 7.5                   | 71                                          | 75       | 39.6                | 37.1     |
| 12         | 25.0     | 7.5                   | 76                                          | 75       | 36.8                | 39.5     |

The bioemulsifiers are surfactants that have the ability to form and stabilize emulsions [17]. In this context, it was determined the rate of emulsification, quantitative test to assess the occurrence of the formation and stabilization of emulsions. After 24 hours, there was stabilization of emulsions in all conditions, with significant results in condition 7 (Table 1) of the two strains studied experimental design (CCRD), with values of 80% *C. glabrata* (UCP 1002) and 90% *C. glabrata* (UCP 1556), using as substrate hydrophobic oil burning engine. These results demonstrate that the biosurfactants produced have significant emulsifying properties, since Willumsen and Karlson [17] consider significant values above 50% of emulsification. Luna et. al [18] obtained similar results by *Candida Sphaerica*, getting about 90% of emulsificação hydrophobic substrate using engine oil.

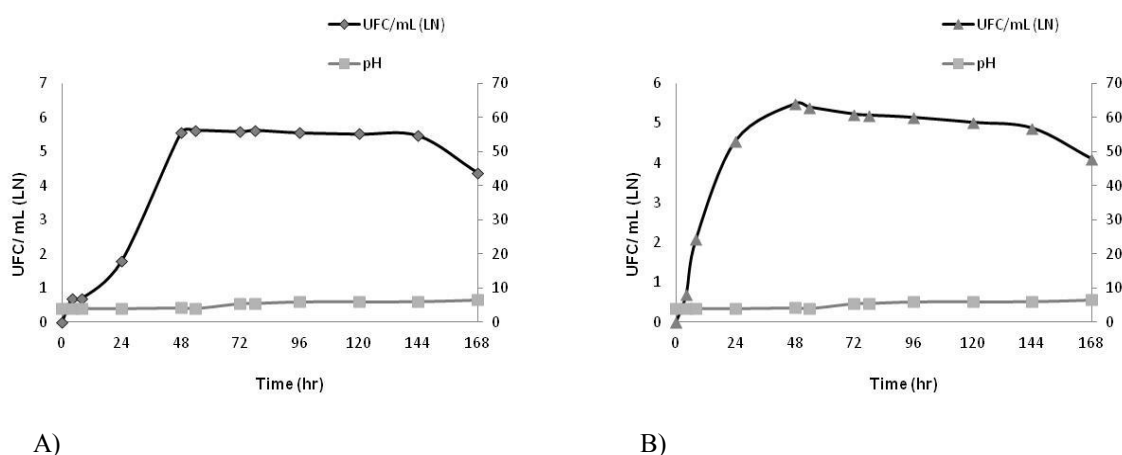


Figure 1. A) Growth curve and pH of *C. glabrata* UCP 1002 amid consisting of whey and corn steep liquor during the production of biosurfactant, B) Growth curve and pH of *C. glabrata* UCP 1556 amid consisting of whey and corn steep liquor during the production of biosurfactant.

The growth of *C. glabrata* (UCP 1002 UCP and 1556) are shown in Figures 2A and 2B, the strains of *C. glabrata* (UCP 1002 and 1556) showed similar growth in the first 4 hr of cultivation, and from this

point to *C. glabrata* (UCP 1556) achieved faster growth than the strain *C. glabrata* (UCP 1002). However, the strains reached the exponential phase until 48hr of cultivation. After this period, the strains of *C. glabrata* remained in stationary phase to the 144hr. The pH of production in the fermentations with two strains of *C. glabrata* acid remained over 144 hrs and after this period showed neutral character. The maximum production of biosurfactant occurred in the stationary phase of growth in acid pH ranges between 5.0 and 5.5 in both strains. These studies are corroborated by Gerorgiou et al. [19] (1992), confirming that most biosurfactants are produced in the stationary phase of growth of the microorganism.

### 3.2 Stability of the biosurfactant produced by *Candida glabrata* (UCP 1002 and 1556)

The biosurfactants produced by *Candida glabrata* (UCP 1002 and 1556), selected in the best condition of planning (Table 1) was evaluated in cell-free metabolic liquid and their stability under different pHs, NaCl concentrations and temperatures, according with the determination of surface tension. The selected biosurfactant produced in strain (UCP 1002) was stable in all NaCl concentrations tested, indicating that regardless of NaCl concentration used, the biosurfactant remains effective in reducing the surface tension (Figure 2A). The occurrence of significant values for surface tension reduction was observed only at pH 8 (Figure 2B). Regarding the influence of temperature (Figure 2C) was observed significant amounts of thermal stability on the surface tension of only 4°C. The selected biosurfactant produced in strain (UCP 1556) also showed stability in all NaCl concentrations tested (Figure 3A). The occurrence of significant values for surface tension reduction was observed in all pH ranges tested (Figure 3B). Regarding the influence of temperature (Figure 3C) was observed stable values of surface tension at temperatures of 4°C and 70°C. Andrade et.al [11], demonstrated that the biosurfactant produced by *Candida lipolytica*, has effective stability on the surface tension, at elevated temperatures.

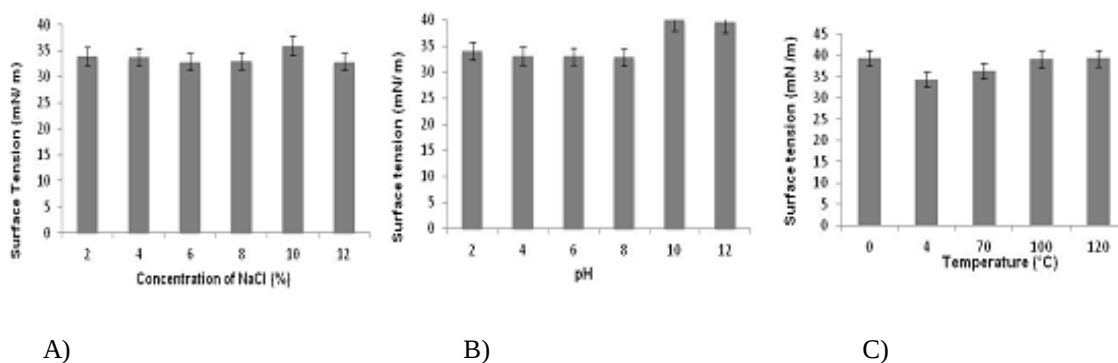


Figure 2. Stability of the biosurfactant determined by the surface tension of cell-free metabolic *Candida glabrata* (UCP 1002). (A) different concentrations of NaCl, (B) different pH values and (C) at different temperatures.

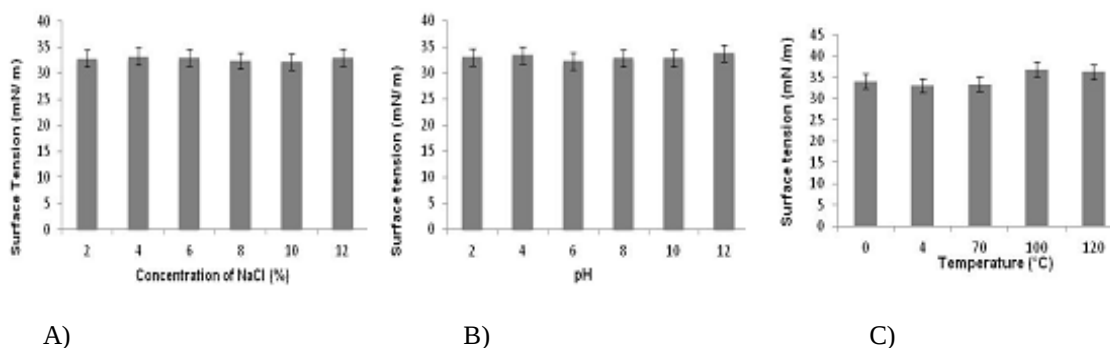


Figure 3. Stability of the biosurfactant determined by the surface tension of cell-free metabolic *Candida glabrata* (UCP 1556). (A) different concentrations of NaCl, (B) different pH values and (C) at different temperatures.

The ability of strains of *Candida glabrata* (UCP 1002 and 1556) for biosurfactant production was demonstrated in this work, using industrial wastes as potential sources of carbon and nitrogen. The

biosurfactants produced by two strains of *C. glabrata* showed significant reductions in surface tension and emulsifying properties similar. The polymers produced in this study, using waste as sources of nutrients industries reduce production costs, lead to economic gains and reduce environmental impacts.

**Acknowledgements** The authors are grateful to financial support CAPES, CNPq, FACEPE, and Catholic University of Pernambuco.

#### 4. References

- [1] Aspectos Relevantes da Política de Desenvolvimento da Biotecnologia. The ARPDB PUC-SP page. Available at: <http://revistas.pucsp.br/red>. Accessed october 09, 2011.
- [2] Bieger, A; Rinaldi, RN. Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. *Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural Porto Alegre*. 2009;47:1-14.
- [3] Castiglione, LG; Bertolin, TE; Costa, JA. Produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Química Nova*. 2009;32:292-295.
- [4] Silveira, M.M.; Wilsbeck, E.; Hoch, I.; Jonas, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001;55:442-445.
- [5] Cerqueira VS, Costa JA. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químicos e biológicos. *Química nova*. 2009;32:400-408.
- [6] Camargo, FP; Alves, IA; Parlow, MS; Goulart, LS. Isolamento de *Candida* sp. da mucosa vaginal de mulheres atendidas em um serviço público de ginecologia do município de Santo Ângelo – RS. *NewsLab*. 2008;87:96-104.
- [7] Natori, Y; Nagasaki T; Kobayashi, A; Fukawa, H. Production of coenzyme Q10 by *Pseudomonas* N842. *Agric. Biol. Chem.* 1978;42:1799-1800.
- [8] Kuyukina, MS; Ivshina, IB; Philp, JC; Christofi, N; Dunbar, SA; Ritchkova, MI. Recovery of *Rhodococcus* sp biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*. 2001;46:109-120.
- [9] Cooper, DG; Goldenberg, BG. Surface active agents from two *Bacillus* species, *Applied and environmental Microbiology*. 1987;53:224-229.
- [10] Fontes, GCF; Amaral, PFF; Coelho, MAC. Produção de biossurfactante por levedura. *Química Nova*. 2008;31:8.
- [11] Andrade, RFS; Luna, JM; Rufino, RD; Albuquerque, CD; Sarubbo, LA; Takaki, GMC. Surface active agent produced by *Candida lipolytica* using cassava flour wastewater as substrate. *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2009; 1: 701-705.
- [12] Antunes, AA; Silva, MLRB; Silva, CAA; Campos-Takaki, GM. Characterization of *Chromobacterium violaceum* isolated from Paca River, Pernambuco, Brazil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 2006;1:48-55.
- [13] Li, F; Zhang, Z; Feng, J; Cai, X; Xu, P. Biodesulfurization of fenantrene in tetradecane and crude oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium goodii* X7B. *Journal of Biotechnology*. 2007;127:222-228.
- [14] Rufino, R.D; Sarubbo, LA; Campo-Takaki, GM. Enhanced stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007;23:734-74.
- [15] Adamczak, M; Bednarski, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida Antarctica*. *Biotechnology Letters*. 2000;22:313-316.
- [16] Amaral, PFF; Silva, JM; Lehocky, M; Barros-Timmons, AV; Coelho, MAZ; Marrucho, IM; Coutinho, JAP. Produced and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*. 2006;41:1894-1898.
- [17] Willumsen, PA; Karlson, U. Screening of bacteria, isolated from PAH contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 1997;7:415-423.
- [18] Luna, JM; Rufino, RD; Sarubbo, LA; Campos-Takaki, GM. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. *Exacta*. 2008;6: 209-215.
- [19] Georgiou, G; Lin S; Sharma, MM. Surface-active compounds from microorganisms. *Bio/Technology*. 1992;10:60-65.

## Capítulo III

**Resíduos agroindustriais como substrato não convencional para crescimento de uma linhagem de *Candida glabrata* e produção de um biossurfactante lipopeptídico**

## RESUMO

A levedura *Candida glabrata* UCP/WFCC1556 isolada do solo da Caatinga de Pernambuco (Brasil), demonstrou potencial na produção de biossurfactante utilizando meio de sais inorgânicos (MSI), suplementado com soro de leite (SL) e milhocina (M) como substratos. Por essa razão, este estudo teve como objetivo avaliar a produção de biossurfactante em meio otimizado por bioprocessos utilizando planejamento do tipo Delineamento Composto Central (DCC) 2<sup>2</sup>. Os resíduos SL e M são substratos facilmente acessíveis que têm a vantagem de reduzir o custo de produção do biossurfactante em meio econômico. Essa produção foi observada quando a linhagem foi cultivada em substratos solúveis como SL e M no segundo planejamento experimental, quando ocorreu uma correlação entre SL (40%) e M (20%) e a tensão superficial da água reduzida de 72 para 28,8 mN/m. O biossurfactante formou uma estável emulsão com óleos de soja, canola e algodão em temperaturas variando de 0-120°C, pH (2-14) e concentrações de NaCl (2-20%). O rendimento do biossurfactante aniônico purificado foi 5,60 g/ L<sup>-1</sup> e a análise de espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) confirmou a presença de grupos funcionais da lipoproteína. O teste de dispersão do óleo demonstrou a habilidade de aplicação do biossurfactante para dispersar o óleo de motor. A atividade tensoativa e emulsificante observada neste estudo indica que a linhagem de *C. glabrata* (UCP 1556) é uma promissora produtora de biossurfactante.

**Palavras-chave:** *Candida glabrata*, resíduos agroindustriais, otimização, biossurfactante, caracterização, lipoproteína.

## ABSTRACT

The yeast *Candida glabrata* UCP/WFCC1556 isolated from Caatinga soil of Pernambuco (Brazil), showed production of biosurfactant using medium inorganic salt (MSI) supplemented with milk whey (MW) and corn steep liquor (CSL), as substrates. Therefore, this study aimed to evaluate the production of biosurfactant in optimized medium by bioprocesses using sequential experimental Central Composite Design (CCD) 2<sup>2</sup>. The wastes MW and CSL represent easily available substrates which have the advantage of reducing the production cost and help to produce the biosurfactant economically. Such production was observed when the strain was grown on soluble substrates, such as MW and CSL in the second experimental design, when there was a correlation between MW (40%) and CSL (20%), and the surface tension water decreased from 72 to 28.8mN/m. The biosurfactant formed a stable emulsion index with soybean, canola and cotton oils at temperatures ranging from 0-120<sup>0</sup> C, pH (2-14) and NaCl concentrations (2-20%). The purified anionic biosurfactant yield was 5.60 g/ L<sup>-1</sup>, and the Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy analysis confirmed the presence of functional groups of the lipoprotein. The spread oil test showed the ability of the biosurfactant application to disperse engine oil. The surface-active and emulsifying activity observed in this study indicates that the strain of *C. glabrata* (UCP 1556) is a promising producer of biosurfactant.

**Keywords:** *Candida glabrata*, agro-industrial wastes, optimization, biosurfactant, characterization, lipoprotein.

## 1. INTRODUÇÃO

As novas perspectivas industriais de produção apontam para os processos biotecnológicos com micro-organismos e a utilização de resíduos industriais como substratos na formulação de meios alternativos em processos fermentativos para produção de metabólitos secundários visando diminuir o custo de produção (ACCORSINI et al., 2012; ANTUNES et al., 2013). Além disto, este mercado se mostra promissor por atrair o interesse pelo estudo dos biossurfactantes que podem ser usados como matéria-prima em aplicações na indústria de alimentos, agroquímica, cosméticos e farmacêutica (MORIKAWA et al., 2000; LUNA et al., 2009; SOUSA et al., 2014).

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas compostas de uma região hidrofóbica e uma região hidrofílica. Possui em sua estrutura uma cadeia de hidrocarbonetos na porção apolar, enquanto a porção polar pode ser iônica, aniônica, catiônica e não iônica ou anfóterica. As principais classes de biossurfactantes incluem glicolipídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, lipídeos neutros, ácidos graxos hidroxilados (DA et al., 2008; NAYAK et al., 2009; SHARMA e SAHARAN, 2014).

Como relatado por Copper e Goldenberg (1987), para justificar a substituição de surfactantes sintéticos por moléculas biológicas, é necessário encontrar um processo de produção mais econômico. A produção dos biossurfactantes pode ser influenciada pelo tipo e concentração do substrato empregado, podendo aumentar ou reduzir a síntese do biopolímero, e até mesmo modificá-lo estruturalmente. As leveduras, mesmo aquelas da mesma espécie, apresentam respostas diferentes à produção de biossurfactante frente aos diversos meios de cultivo (FONTES et al., 2008). Entre as leveduras, *Candida glabrata* tem sido reportada como um micro-organismo com alto potencial biotecnológico na produção de metabólitos secundários e tem potencial para atender a demanda do mercado (BIALKOVA et al., 2006; LUNA et al., 2009).

Os biossurfactantes são um grupo de estruturas moleculares com diversas propriedades, capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, e possui habilidade para misturar e dispersar substratos insolúveis em soluções aquosas (BENINCASA et al., 2004; CAMEOTRA et al., 2010; PARTHASARATHI et al., 2014). Os biossurfactantes oferecem várias vantagens sobre surfactantes de origem química, como baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, estabilidade em uma ampla faixa de pH, temperatura, salinidade e aceitabilidade ecológica. Estas propriedades os tornam adequados para uma vasta gama de aplicações industriais envolvendo

detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade de formar espuma, umectante, solubilização e dispersão de fases (BANAT et al., 2000; MULLIGAN, 2005).

A otimização através de planejamento fatorial é uma prática comum na biotecnologia para selecionar os melhores compostos do meio e das condições de cultivo, considerando que os meios são responsáveis por cerca de 30% do valor da produção total (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

Este trabalho teve como objetivo a metabolização dos resíduos do soro do leite e milhocina, como fontes de carbono e nitrogênio por *C. glabrata* (UCP 1556) para produção de biossurfactante utilizando meio otimizado de baixo custo e a caracterização físico-química e biológica para aplicações industriais.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo e condições de cultivo**

A linhagem de *Candida glabrata* (UCP 1556) foi gentilmente fornecida pelo banco de cultura do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), registrado na Federação Mundial de Coleções de Culturas (WFCC). A *C. glabrata* foi cultivada em Yeast Mold Agar (YMA) [extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, triptona 0,5%, glicose 1%, ágar 5,0% e água destilada 100 mL]. O inóculo foi padronizado transferindo as células de *C. glabrata* para Cald Yeast Mold (CYM), com a mesma composição do (YMA) sem adição do ágar, incubado por 24 h, 150 rpm a 28° C para obtenção de 10<sup>7</sup> células/mL.

### **2.2. Substratos**

Os substratos utilizados foram resíduos agroindustriais: a milhocina (M), subproduto do beneficiamento da indústria do milho e soro de leite (SL) proveniente da indústria de laticínios de São Bento do Una (PE).

### **2.3. Produção de biossurfactante**

A produção do biossurfactante foi realizada utilizando o meio descrito por Natori et al., (1978): extrato de levedura 1%, glicose 1%, peptona 2%, carbonato de cálcio 0,12g, sulfato de magnésio 0,03g. Posteriormente, este meio foi modificado substituindo a glicose e peptona por resíduos industriais, SL e M, na mesma

concentração. Erlenmeyers contendo 100 mL do meio de produção foram inoculados com 5% do inóculo de *C. glabrata* de uma suspensão celular contendo 10<sup>7</sup> UFC/mL e incubados por 72h, 28°C em agitação orbital de 150 rpm. Após este período as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 minutos e depois filtradas (papel Watman N° 1).

#### 2.4. Otimização da produção do biossurfactante por *C. glabrata* (UCP 1556)

A estratégia de estudos escolhida para otimização foi a formulação de três planejamentos experimentais do tipo Delineamento Composto Central (DCC) 2<sup>2</sup>, formulados com o aumento gradual das concentrações dos resíduos agroindustriais SL, substituindo a glicose como fonte de carbono e M substituindo a peptona como fonte de nitrogênio. Os níveis dos planejamentos experimentais estão apresentados na tabela 1, o extrato de levedura e as concentrações dos minerais no meio se mantiveram constantes em todas as condições dos planejamentos experimentais.

**Tabela 1** - Níveis dos três planejamentos experimentais (DCC) 2<sup>2</sup>

| <b>Primeiro Planejamento fatorial</b> |               |    |      |    |       |
|---------------------------------------|---------------|----|------|----|-------|
| <b>Fatores</b>                        | <b>Níveis</b> |    |      |    |       |
|                                       | - 1,41        | -1 | 0    | 1  | 1,41  |
| <b>Soro de leite (v/v %)</b>          | 3,85          | 10 | 25   | 40 | 46,15 |
| <b>Milhocina (v/v %)</b>              | 4             | 5  | 7,5  | 10 | 11,02 |
| <b>Segundo planejamento fatorial</b>  |               |    |      |    |       |
| <b>Fatores</b>                        | <b>Níveis</b> |    |      |    |       |
|                                       | - 1,41        | -1 | 0    | 1  | 1,41  |
| <b>Soro de leite (v/v %)</b>          | 15,9          | 20 | 30   | 40 | 44,1  |
| <b>Milhocina (v/v %)</b>              | 7,95          | 10 | 15   | 20 | 22,05 |
| <b>Terceiro planejamento fatorial</b> |               |    |      |    |       |
| <b>Fatores</b>                        | <b>Nível</b>  |    |      |    |       |
|                                       | - 1,41        | -1 | 0    | 1  | 1,41  |
| <b>Soro de leite (v/v %)</b>          | 19,87         | 25 | 37,5 | 50 | 55,12 |
| <b>Milhocina (v/v %)</b>              | 12,95         | 15 | 20   | 25 | 27,05 |

A análise estatística foi demonstrada no diagrama de Pareto padronizado para as concentrações usadas de SL e M, utilizando como variável resposta a tensão superficial. As estimativas dos efeitos que foram estatisticamente significativas são indicadas pela linha tracejada, a magnitude de cada um e eficácia é representada pelas colunas e linha transversal correspondente ao valor p=0.5, indicando significância estatística e eficácia. Os níveis do planejamento experimental (DCC) 2<sup>2</sup> foram codificados como -1, +1 e 0

(zero é considerado o ponto central) e os pontos axiais (+1,41 e -1,41), foram calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde  $X_i$  é o valor codificado da variável independente,  $x_i$  é o valor real da variável independente,  $x_0$  é o valor real da variável independente no ponto central e  $\Delta x_i$  é o valor variável. A significância do efeito foi testada por análise de variância (ANOVA), e estatisticamente analisada a partir dos dados do planejamento experimental, incluindo diagrama de Pareto, pelo programa Statistica Stasoft (EUA) versão 7.0.

## 2.5. Determinação da tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

A tensão superficial foi monitorada no líquido metabólico livre de célula após 0h, 4h, 12h e, posteriormente, a cada 24 horas totalizando 168 horas utilizando um Tensiômetro modelo Sigma 70 (KSV Instruments Ltd., Finland), pelo método do anel Du Nouy à temperatura ambiente ( $\pm 28^\circ\text{C}$ ), de acordo com Kuyukina et al., (2001). A CMC foi determinada com o biossurfactante isolado, solubilizado em água nas diferentes concentrações (0,001, 0,01, 0,03, 0,05, 0,1, 1, 1,5, 2 e 2,5%) e depois suas tensões superficiais foram medidas. O alcance da CMC foi atingido depois de observar um valor constante da tensão superficial.

## 2.6. Cinética de crescimento

O crescimento da linhagem de *C. glabrata* (UCP 1556) foi acompanhado através da técnica do Pour-Plate e os resultados foram expressos em UFC/mL. Alíquotas foram coletadas após 4h, 12h e posteriormente a cada 24h totalizando 168h.

### 2.6.1. Determinação de glicose e pH

O consumo de glicose foi avaliado pelo método colorimétrico enzimático (LABTEST) usando D-glicose como padrão e a absorvância a 500nm em espectrofotômetro. Para a determinação do pH foi utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310).

### 2.6.2. Determinação da velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e o tempo de geração ( $T_G$ )

A velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e o tempo de geração ( $T_G$ ) da amostra de *C. glabrata* cultivada no meio otimizado foram determinadas segundo as fórmulas de Pirt (1982). Para velocidade de crescimento foi utilizada a equação:

$$\mu_{\max} = (\ln X - \ln X_0)/(T - T_0) \quad \text{Eq. 2}$$

Onde: X = biomassa final;  $X_0$  = Biomassa inicial; T = Tempo final;  $T_0$  = Tempo inicial.

O tempo de geração ( $T_G$ ) foi determinado pela fórmula:

$$T_G = \ln 2/\mu_m \quad \text{Eq.3}$$

### 2.7. Determinação do índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi analisado após a mistura do líquido metabólico livre de células e dos substratos hidrofóbicos de acordo com a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Os substratos hidrofóbicos testados foram óleos vegetais (soja, algodão e canola). O índice de emulsificação foi calculado dividindo a altura da emulsão formada pela altura total da mistura e multiplicando por 100%.

### 2.8. Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade foram realizados submetendo o líquido metabólico livre de células a diferentes temperaturas (0, 5, 70, 100 e 120° C), pHs (2-12) e concentrações de NaCl (2-12%), e em seguida o índice de emulsificação foi medido.

### 2.9. Isolamento e purificação do biossurfactante

O biossurfactante produzido por *C. glabrata* foi isolado pelo método de precipitação utilizando acetona 1:1 (v/v) adicionada no líquido metabólico livre de células de acordo com Paraszkievicz et al., (2002). O processo de purificação foi iniciado com o biossurfactante bruto (500mg), solubilizado em 4mL de água deionizada. Em seguida, o biossurfactante em solução aquosa foi re-extraído utilizando acetona para remoção máxima dos contaminantes. O processo foi repetido três vezes. O sobrenadante foi descartado e o biossurfactante isolado foi submetido a diálises (sacos de diálises com 25mm e 16mm diâmetro) contra água deionizada durante 72h à 5°C, e cada um foi submetido a mudanças a cada 3h. O biossurfactante purificado foi coletado

e liofilizado. O rendimento foi calculado subtraindo o rendimento inicial (biossurfactante bruto) pelo rendimento final (biossurfactante purificado).

## **2.10. Caracterização do biossurfactante**

A concentração de proteínas totais do biossurfactante isolado foi estimada utilizando o kit Labtest Diagnostica S.A., Brasil. O teor total de carboidratos foi estimado pelo método ácido fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O teor de lipídeos foi determinado de acordo com Manocha et al., (1980). Os ácidos graxos presentes na porção hidrofóbica do biossurfactante foram identificados pela conversão de ésteres metílicos de acordo com o método citado Durham e Kloos (1978). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram ressuspensos em n-hexano e analisados por cromatografia gasosa (CG).

### **2.10.1. Caracterização do biossurfactante por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

A amostra do biossurfactante foi ressuspensa em clorofórmio: metanol (1:1 v/v) e 100µl da amostra foi aplicada em placa TLC de sílica gel (Si 60 F254, 0,25mm, Merck) e desenvolvido um sistema solvente proposto por George e Jayachandran (2009), contendo clorofórmio: metanol: ácido acético (65:15:2 v/v/v). A detecção dos constituintes do biossurfactante foram identificados após a pulverização em placas de TLC com os reagentes ninhidrina, rodamina e antrona. O reagente ninhidrina a 0,05% (metanol e água 1:1 v/v) aquecida à 100°C durante 4 minutos, foi utilizada para detecção de aminoácidos e a rodamina a 0,25% (em etanol 70%) para detectar a presença de lipídeos (YU et al., 2002). O reagente antrona (1g em 5ml de ácido sulfúrico misturado com 95mL de etanol), foi utilizado para detectar biossurfactantes glicolipídicos pela presença de bandas amarelas (YIN et al., 2008). A visualização das bandas correspondentes aos constituintes do biossurfactante foram visualizados em luz UV (YU et al., 2002; YIN et al., 2008).

### **2.10.2. Análise dos grupos funcionais do biossurfactante e carga iônica**

O biossurfactante obtido foi analisado através do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Os resultados foram registrados em aparelho Bruker IFS 66, usando pastilhas KBr e expressos em número de ondas (cm<sup>-1</sup>), variando de 4000

para 400 cm<sup>-1</sup>. A determinação da carga iônica do biossurfactante foi realizada pelo potencial Zeta, utilizando um medidor modelo DG-ZM3, Zeta Meter system 3.0 +.

### **2.10.3. Efeito do biossurfactante na viscosidade**

A determinação do efeito do biossurfactante na viscosidade de óleos vegetais tais como soja, algodão e canola, foram testados após adição em tubos graduados de 6mL dos óleos e 2ml da solução de biossurfactante a 1%. As misturas foram agitadas durante 2 minutos e após 20 minutos de repouso as emulsões foram analisadas em viscosímetro Modelo Brookfield TC-500 à 25 °C usando o spindel N° 41 a 100rpm de acordo com a metodologia de Jara et al., (2013) modificado.

### **2.11. Determinação do potencial do biossurfactante na dispersão de óleo**

Seguindo o método estabelecido por Morikawa et al., (2000), foi possível identificar a ocorrência da produção de biossurfactante por sua especificidade para dispersar compostos hidrofóbicos. Em placas de Petri de 10cm de diâmetro foram adicionados 10ml de água deionizada e subsequentemente, 0,5mL do óleo de motor. No centro da placa de Petri contendo água e óleo, foi adicionado 1mL do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante. A formação de halo (mm) caracterizou-se pelo aparecimento de uma zona clara indicando a presença de compostos tensoativos e sua capacidade de dispersar componentes hidrofóbicos.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Produção de biossurfactante**

Os estudos de produção de biossurfactante foram iniciados com base nos resultados da tensão superficial do meio proposto por Natori et al., (1978) modificado. Neste meio, *C. glabrata* reduziu a tensão superficial de 72 da água para 40,2mN/m. De acordo com Mulligan (2005), biossurfactantes eficientes são capazes de reduzir a tensão superficial para valores inferiores a 30,0mN/m. Neste contexto, os resultados obtidos neste prévio estudo não foram significativos para a redução da tensão superficial.

### **3.2. Otimização Experimental**

Otimizar a composição do meio de cultivo é uma questão importante no desenvolvimento de processos de produção de biossurfactantes economicamente

viáveis. Reduzir o custo total de produção de biossurfactante geralmente depende da melhoria da linhagem, do uso de matérias-primas de baixo custo tal como resíduos agrícolas e industriais como substratos, o uso de processo em larga escala e o uso de técnicas avançadas a base de computadores para processos de controle e otimização (MUTHUSAMY et al., 2008). O SL e M são dois exemplos de resíduos agroindustriais de baixo custo, rico em nutrientes, que podem ser usados para produção de biossurfactante assim como para reduzir os custos do processo de produção. No primeiro planejamento, a condição 8 apresentou o melhor resultado para redução da tensão superficial: 72 da água para 32,1mN/m (Tabela 2), com o meio suplementado com SL em nível intermediário (25%) e M em nível máximo (11,02%) (Tabela 1).

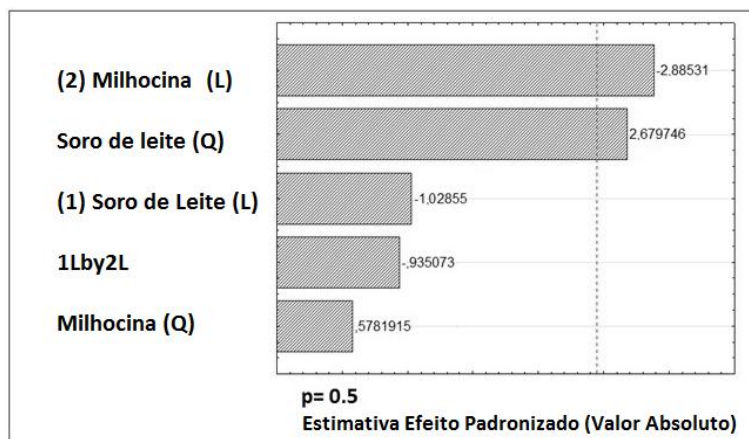
**Tabela 2** - Níveis codificados e os resultados da tensão superficial dos três planejamentos (DCC) de 2<sup>2</sup>.

| Ensaio | Soro  | Milhocina | Tensão superficial mN/m |             |             |
|--------|-------|-----------|-------------------------|-------------|-------------|
|        |       |           | Primeiro PF             | Segundo PF  | Terceiro PF |
| 1      | -1    | -1        | 46,9                    | 34,7        | 37,2        |
| 2      | 1     | -1        | 44,8                    | 35,9        | 38,9        |
| 3      | -1    | 1         | 46,9                    | 35,3        | <b>35,2</b> |
| 4      | 1     | 1         | 39,2                    | <b>28,8</b> | 40,1        |
| 5      | -1,41 | 0         | 43,4                    | 33,0        | 39,2        |
| 6      | 1,41  | 0         | 41,2                    | 32,8        | 41,0        |
| 7      | 0     | -1,41     | 42,5                    | 36,9        | 43,0        |
| 8      | 0     | 1,41      | <b>32,1</b>             | 34,4        | 40,1        |
| 9      | 0     | 0         | 36,8                    | 36,5        | 36,7        |
| 10     | 0     | 0         | 39,7                    | 37,0        | 37,1        |
| 11     | 0     | 0         | 37,1                    | 35,3        | 34,9        |
| 12     | 0     | 0         | 39,5                    | 36,5        | 35,7        |

**PF= Planejamento fatorial**

A análise do diagrama de Pareto demonstra que a concentração da variável independente M em função linear foi estatisticamente significativa com efeito negativo, favorecendo a redução da tensão superficial no líquido metabólico livre de células. As concentrações da variável independente SL na função quadrática foram estatisticamente significativas com efeito positivo indicado pela linha tracejada. No entanto, não favoreceu a redução da tensão superficial. As outras variáveis não foram significativas do ponto de vista estatístico, pois elas não passaram da linha tracejada (Figura 1).

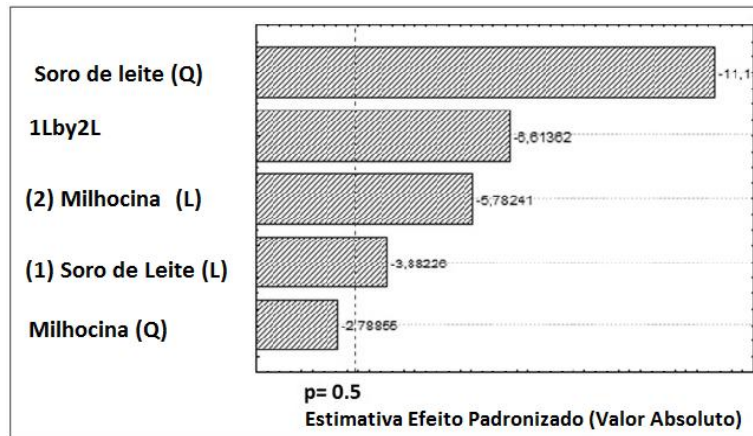
**Figura 1** - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para o 1º planejamento fatorial do tipo (DCC) 2<sup>2</sup>, tendo como fatores o (SL) e (M) e como variável resposta a tensão superficial.



No segundo planejamento (DCC) 2<sup>2</sup> as concentrações de SL e M foram aumentadas como demonstrado na tabela 1, na busca da redução máxima da tensão superficial. Neste planejamento, a condição 4 apresentou o melhor resultado para redução da tensão superficial: 72 da água para 28,8mN/m (Tabela 2) no meio suplementado com os níveis máximos das concentrações de SL (40%) e M (20%) (Tabela 1).

A análise do diagrama de Pareto no segundo planejamento demonstrou que a concentração de SL e M foram estatisticamente significativas em todos os termos, exceto para a M quando analisada na função quadrática. Todas as variáveis independentes, como suas associações, renderam resultados estatísticos significativos com efeito negativo, favorecendo a redução da tensão superficial (Figura 2).

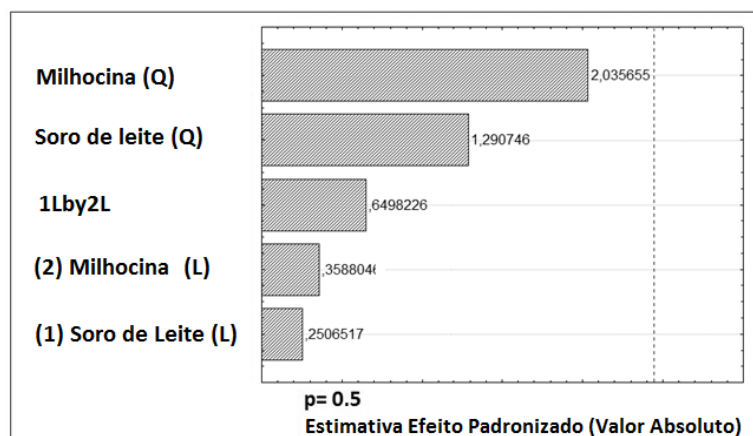
**Figura 1** - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para o 2<sup>o</sup> planejamento fatorial do tipo (DCC) 2<sup>2</sup>, tendo como fatores o (SL) e (M) e como variável resposta a tensão superficial.



No terceiro planejamento (DCC) 2<sup>2</sup> as concentrações de SL e M receberam um acréscimo nas concentrações, como demonstrado na tabela 1, na busca da redução máxima da tensão superficial. Neste planejamento, a condição 3 apresentou o melhor resultado para redução da tensão superficial: 72 da água para 35,2mN/m (Tabela 2), com meio suplementado com os nível máximo de SL (50%) e nível intermediário de M (15%) (Tabela 1).

As concentrações de SL e M usadas no terceiro planejamento não foram estatisticamente significativas para a redução da tensão superficial, pois eles não passaram da linha tracejada (Figura 3).

**Figura 2-** Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para o 3<sup>o</sup> planejamento fatorial do tipo (DCC) 2<sup>2</sup>, tendo como fatores o (SL) e (M) e como variável resposta a tensão superficial.



De acordo com os resultados obtidos da tensão superficial e análises realizadas pelo diagrama de Pareto dos três planejamentos experimentais, ficou evidente que as melhores concentrações comprovadas para obtenção da máxima redução de tensão superficial ocorreu no segundo planejamento no meio constituído por SL (40%) e M (20%). O modelo quadrático gerado pelo segundo planejamento esta representado pela Equação 4, onde Z é a variável resposta para tensão superficial, X e Y são os valores codificados para SL e M, respectivamente.

$$Z = 36.5 - 5.60355331X - 1.8X^2 - 8.34619407Y - 45Y^2 - 1.35XY \quad (\text{Eq. 4})$$

A validação do modelo obtido neste segundo planejamento e a confirmação da significância estatística das concentrações de SL e M para a variável resposta tensão superficial esta representada na Tabela 3. A análise de variância (ANOVA) demonstram os resultados das variáveis independentes pela variação de Fisher (F) e o valor de p. De acordo com a ANOVA, a variável independente SL sob efeito quadrático apresentou os maiores valores de Fisher (valor-F). Isso explica a variação dada nos resultados estimados das variáveis utilizadas na média.

O coeficiente de determinação  $R^2=0,93$  indicou que 93% da variação total do segundo planejamento foi explicada pela equação (Eq. 4) e o coeficiente ajustado de determinação  $R_{adj}^2=0,82$  indica que houve uma adaptação adequada dos dados para a variável resposta tensão superficial.

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA) para o segundo planejamento fatorial.

| Fatores                                       | Soma dos quadrados | Grau de liberdade | Média dos quadrados | Valor-F  | Nível de confiança (p) |
|-----------------------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|----------|------------------------|
| Soro de leite (T,L)                           | 2,51198            | 1                 | 2,51198             | 15,0719  | 0,030270               |
| Soro de leite (T,Q)                           | 20,73600           | 1                 | 20,73600            | 124,4160 | 0,001544               |
| Milhocina (T,L)                               | 5,57272            | 1                 | 5,57272             | 33,4363  | 0,010286               |
| Milhocina (T,Q)                               | 1,29600            | 1                 | 1,29600             | 7,7760   | 0,068502               |
| Assoc.Soro de leite (T,L)/Com milhocina (T,L) | 7,29000            | 1                 | 7,29000             | 43,7400  | 0,000703               |
| Falta de ajuste                               | 1,97530            | 3                 | 0,65843             | 3,9506   | 0,144415               |
| Puro erro                                     | 0,50000            | 3                 | 0,16667             |          |                        |
| Total da soma dos quadrados                   | 38,64000           | 11                |                     |          |                        |

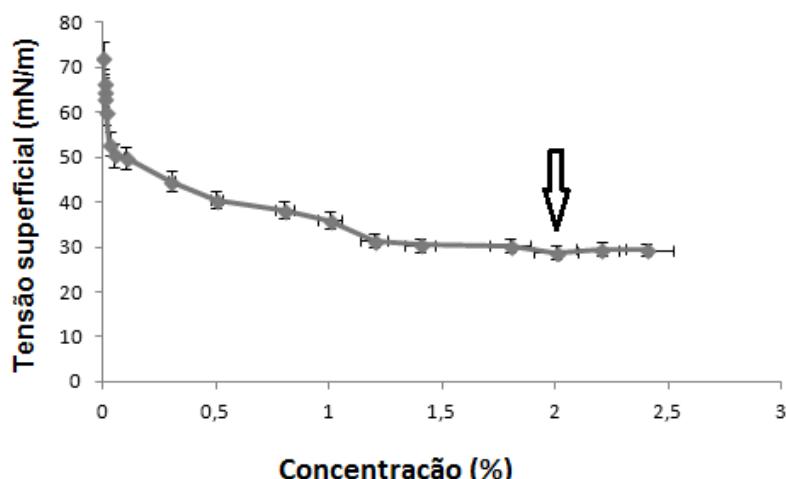
Os subprodutos industriais têm atraído grande atenção para uso como substratos alternativos na produção de biossurfactantes. Os resíduos de destilarias (BABU et al., 1996), soro de leite (DUBEY et al., 2001) e melaço (PATEL e DESAI, 1997), têm sido descritos como possíveis substitutos na formulação de meios para crescimento microbiano e produção de biossurfactante. Parâmetros importantes para a produção de biossurfactante por *Serratia* sp. SVGG16 foram selecionados através do planejamento experimental. Os resultados demonstraram que esta linhagem foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para 34,0mN/m (CUNHA et al., 2004). A substituição do meio sintético por meio alternativo economicamente viável, tal como soro de leite e melaço, seguindo um planejamento experimental, levou a um aumento de cerca de 1,2–1,5 vezes do rendimento do biossurfactante produzido e uma redução de 60–80% dos custos de preparação do meio (SOBRINHO et al., 2008).

### 3.3. Determinação da tensão superficial e CMC

A CMC é a concentração de surfactante necessária para manter constante o valor da tensão superficial. Independentemente do aumento da concentração de surfactante, uma redução ainda maior na tensão superficial não pôde ser observado uma vez que a CMC foi atingida (SARUBBO et al., 2006; GEORGE et al., 2009). O biossurfactante

produzido exibiu uma excelente redução da tensão superficial no meio otimizado (40% SL e 20% M), reduzindo para 28,8mN/m após 72h, mesmo após o aumento da concentração do biossurfactante a 2% (Figura 4). O novo aumento na concentração da solução do biossurfactante não reduziu a tensão da água, indicando que a CMC foi alcançada com está concentração.

**Figura 3** – Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por *C. glabrata*



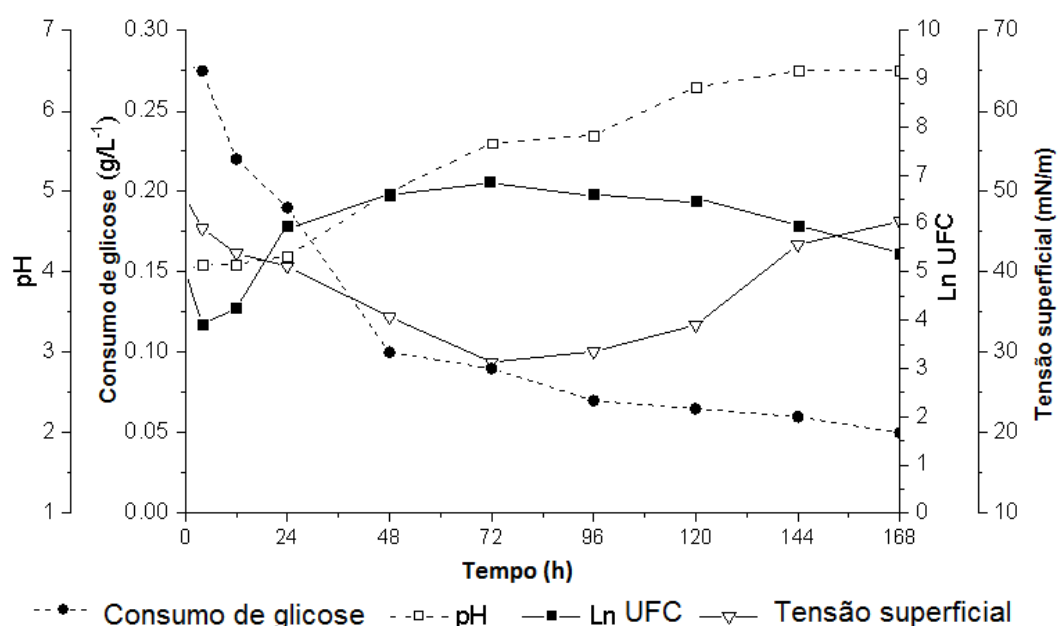
Usando um meio mineral suplementado com 2,5% de resíduo industrial e 2,5% de milhocina para a produção de biossurfactantes, utilizando diferentes espécies de *Candida*, Coimbra et al., (2009) obteve reduções de tensão superficial com *C. sphaerica* (35,0mN/m), *C. glabrata* (34,1mN/m), *C. tropicalis* (43,0mN/m), *C. lipolytica* (35,0mN/m), *C. buinensis* (27,6mN/m) e *C. guilliermondii* (30,0mN/m). O biossurfactante produzido mostrou menor valor de CMC do que outros biossurfactantes produzidos a partir de leveduras descritas na literatura, como valores de 2,5% encontrado para o biossurfactante produzido por *C. glabrata* (LUNA et al., 2009).

### 3.4. Perfil da cinética de crescimento de *Candida glabrata* (UCP 1556)

Na figura 5, observa-se que *C. glabrata* atingiu o máximo crescimento após 72h de cultivo no final da fase exponencial e início da fase estacionária em meio com pH ácido. Após 96h, o consumo da glicose juntamente com o pH mantiveram-se estáveis até o fim do cultivo. A produção de biossurfactante por *C. glabrata* foi iniciada após as primeiras 48h quando houve uma redução da tensão superficial do meio com valores a partir de 72 da água para valores próximos a 35m/Nm em meio com pH 5. Entretanto, a

produção máxima do biossurfactante ocorreu no final da fase exponencial e início da fase estacionária em conjunto com a redução da tensão superficial no meio com pH 5,6, resultando em uma tensão superficial mínima de 28,8 mN/m. Os resultados obtidos mostram que houve uma interação entre a produção de biossurfactante e o crescimento celular em 72h de cultivo em meio composto por SL e M, na condição otimizada.

**Figura 4** - Curva de crescimento, pH, tensão superficial e consumo de glicose para biossurfactante isolado a partir de *C. glabrata* cultivadas em meio otimizado com SL (40%) e M (20%) como substratos, durante 168 horas.



A acidez do meio de produção do biossurfactante foi também um parâmetro analisado por Luna et al., (2009), ao evidenciar a maior produção de biossurfactante por *C. antartida* em pH 5,5. Outros resultados estão de acordo com Georgiou et al., (1992) alegando que a maioria dos biossurfactantes são excretados no meio de cultivo na fase exponencial ou estacionária de crescimento. Os parâmetros cinéticos demonstraram um comportamento de produção, onde a velocidade de crescimento máxima foi  $\mu_{max}$  0,063h<sup>-1</sup> e tempo de geração de Tg 8,9h.

### 3.5. Rendimento do biossurfactante e purificação

O rendimento da produção do biossurfactante bruto por *C. glabrata* foi 8g/L<sup>-1</sup> após 72h de cultivo. Os resultados foram 6,80 g/L<sup>-1</sup> após primeira purificação, 5,80g/L<sup>-1</sup> após segunda purificação e 5,60g/L<sup>-1</sup> após terceira purificação. O rendimento do biossurfactante bruto produzido por *C. glabrata* está de acordo com valores relatados na literatura (MORIKAWA et al., 2000). Rufino et al., (2007), relatou um rendimento de 8g/L<sup>-1</sup> para um biossurfactante bruto produzido por *C. lipolytica* utilizando extrato de levedura e resíduos de óleo de soja de refinaria como substratos. *C. sphaerica* produziu um biossurfactante em um meio a base de resíduos industriais em 144h de cultivo e apresentou um rendimento 4,5g/L<sup>-1</sup> (SOBRINHO et al., 2008).

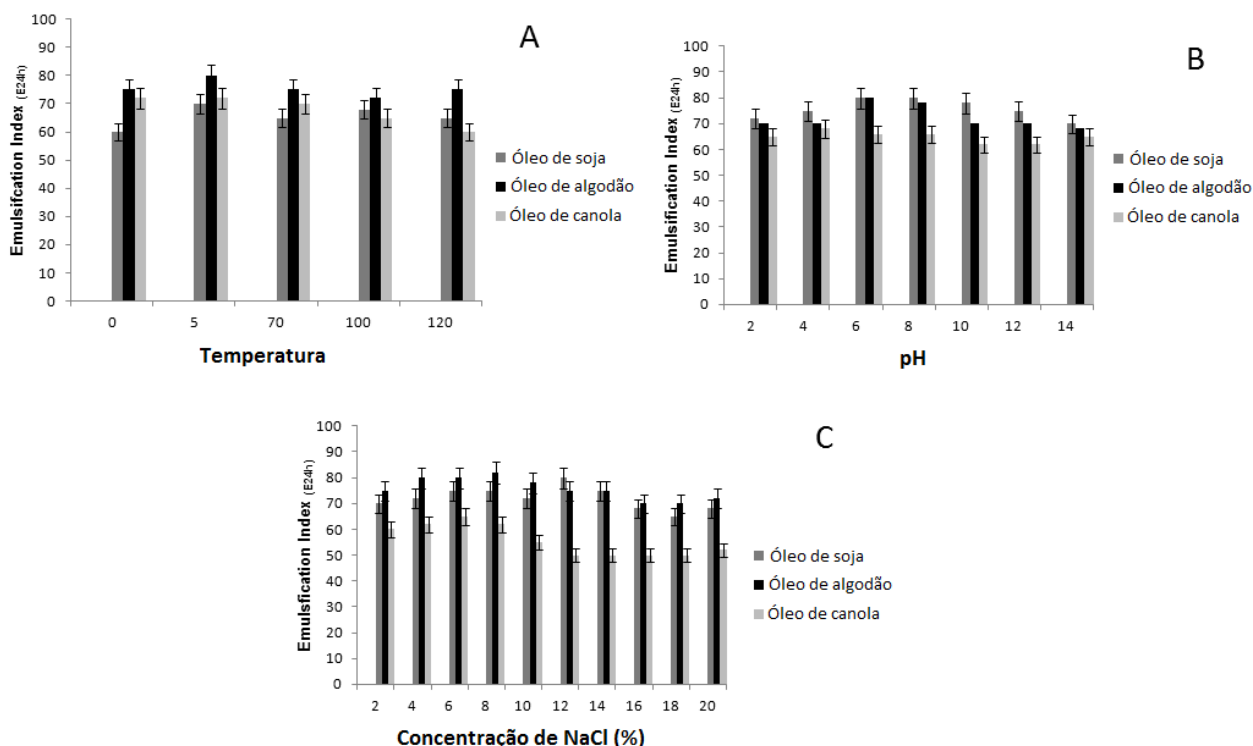
### 3.6. Propriedade emulsificante

Muitos micro-organismos utilizam substratos específicos, solubilizando ou emulsificando diferentes hidrocarbonetos (DESAI e BANAT, 1992). Em nossos estudos, os resultados mostraram a formação de emulsões consistentes utilizando os substratos hidrofóbicos óleo de soja, algodão e canola, com valores de 75%, 90% e 80%, respectivamente. Os dados sugerem que *C. glabrata* é uma linhagem com maior eficiência na formação de emulsões estáveis com óleo de algodão. De acordo com Willumsen e Karlson (1997), os biossurfactantes são surfactantes que têm a capacidade de formar emulsões e considera uma quantidade significativa acima de 50% de emulsificação.

### 3.7. Estudo de estabilidade

O biossurfactante produzido por *C. glabrata* no meio otimizado composto de resíduo agroindustrial (40% SL e 20% M), manteve suas emulsões estáveis em todas as diferentes faixas de pH usando como substratos hidrofóbicos os óleos de soja, algodão e canola, indicando que independentemente dos diferentes pHs testados, suas emulsões permanecem estáveis (Figura 6A). No que diz respeito à influência das diferentes faixas de temperaturas na estabilidade das emulsões, foi observado estabilidade apenas com o óleo de algodão, obtendo valores de emulsificação de 75 a 80% (Figura 6B). A capacidade do biossurfactante em formar emulsões estáveis em diferentes concentrações de NaCl também foi investigado e os resultados demonstraram que a emulsão manteve-se estável nas diferentes concentrações apenas com o óleo de algodão (Figura 6C).

**Figura 5** – Influência do pH (A), temperatura (B) e NaCl (C) na estabilidade das emulsões pelo biossurfactante produzido por *C. glabrata*.



Fatores ambientais tais como pH, salinidade e temperatura também afetam a atividade e estabilidade dos biossurfactantes. Por isso, é importante estudar a influência destes parâmetros quando se considera aplicações específicas para estes compostos (MULLIGAN, 2005). Um biossurfactante produzido por *C. lipolytica* cultivado com resíduo industrial (RUFINO et al., 2007) e um biossurfactante produzido por *C. glabrata* (SARUBBO et al., 2006), mostrou semelhantes resultados de estabilidade térmica quando comparados aos obtidos neste trabalho. Um emulsificante produzido a partir da levedura *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, cultivada em n-hexadecano e milhocina apresentou estabilidade em uma faixa de pH entre 2 a 10, embora uma considerável perda de estabilidade tenha ocorrido em pH 10 (RUFINO et al., 2014). O biossurfactante produzido neste estudo por *C. glabrata* manteve suas emulsões estáveis em elevadas concentrações, considerando que concentrações acima de 2% NaCl são suficientes para inativar o surfactante sintético (LUNA et al., 2009).

### 3.8. Caracterização do biossurfactante

A análise demonstrou que o biossurfactante isolado a partir de *C. glabrata* é constituído de 58% lipídeos e 36% de proteínas. A presença de proteínas e lipídeos indica que o biossurfactante pertence a classe das lipoproteínas. Resultados similares foram observados por Yu et al., (2002). Rufino et al., (2014) utilizando *C. lipolytica*, em meio suplementado com resíduos de refinaria, óleo de soja, ácido glutâmico e extrato de levedura produziram um tipo de biossurfactante da classe das lipoproteínas (50% proteínas e 20% lipídeos).

A presença de proteínas e lipídeos no biossurfactante produzido por *C. glabrata* foi confirmada por FT-IR e por cromatografia em camada delgada (CCD), visualizado com reagentes específicos pelas bandas de identificação. Os resultados demonstraram reações positivas para o grupo amino, utilizando o reagente ninhidrina e para lipídeos utilizando reagente rodamina, mas negativo para glicolipídeos após o uso do reagente antrona.

A análise do espectro FT-IR do biossurfactante produzido por *C. glabrata* revelou picos de absorção a  $2926\text{cm}^{-1}$  indicando a presença do estiramento C-H contendo compostos com ácidos graxos e lipídeos (LAMBERT et al., 2001). O pico  $1745\text{cm}^{-1}$  é a vibração do estiramento de C = O do grupo funcional éster em lipídeos. A presença de peptídeos foi confirmada pelo pico  $1662\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento C = O (FORATO et al., 2013). O pico  $1393\text{cm}^{-1}$  correspondente a vibração do estiramento simétrico do -COO- cadeia lateral de um grupo de aminoácidos e ácidos graxos (NAUMANN, 2000).

De acordo com a análise realizadas pelo Potencial Zeta Meta 3.0 +, obtendo -12,8nV, o biossurfactante mostrou caráter aniônico. Outros tipos de biossurfactantes produzidos por *Candida* sp. também exibem um caráter aniônico quando submetidos ao mesmo teste (LUNA et al., 2013). De acordo com Barbieri (2000), surfactantes aniônicos são amplamente utilizados comercialmente e são subdivididos em ésteres carboxilados e sulfatados utilizados em produtos de limpeza e cosméticos.

O ácido graxo presente na porção hidrofóbica do biossurfactante produzido por *C. glabrata* foi identificado pela conversão para ésteres metílicos. Foram observados os seguintes ácidos graxos: C16:0 (33,6%) como o principal componente e C8:0 (4,1%), C18:0 (28,4%), C18:1 (22,6%) e C18:2 (5,7%) em menores quantidades. O estudo da composição do ácido graxo do biossurfactante isolado produzido por *Candida lipolytica*

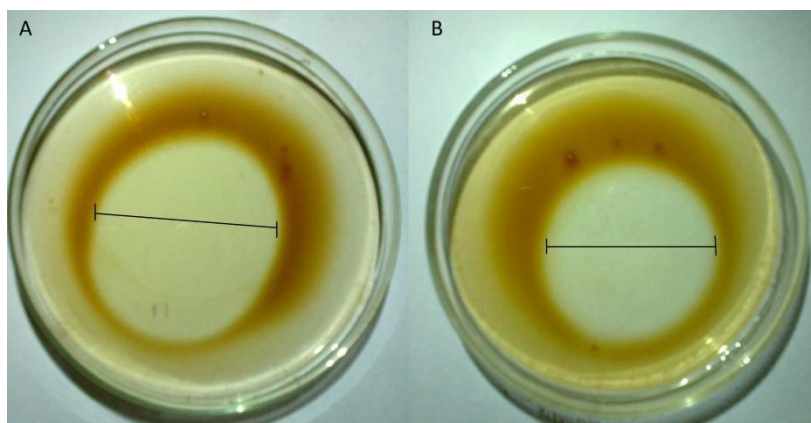
analisado por Cromatografia Gasosa revelou a presença de C12:0 (75,34%), C8:0 (7,96%), C18:1 (6,36%), C16:1 (4,23%), C14:0 (3,85%) e C16:0 (2,25%) (RUFINO et al., 2014).

Referente ao potencial do biossurfactante sobre a viscosidade de substratos hidrofóbicos, o biossurfactante de *C. glabrata* reduziu as viscosidades dos óleos de soja (21,0 para 18,5Cp), algodão (39,5 para 26,4Cp) e canola (34,8 para 29,3Cp). O efeito do biossurfactante na redução da viscosidade de óleos e o alto potencial para formar emulsões indica sua possível aplicação em cosméticos, considerando os baixos valores da viscosidade (NISTCHKE et al., 2002).

### 3.9. Testes de dispersão do óleo

O teste de dispersão do óleo foi realizado para confirmar a presença do surfactante através de sua capacidade de dispersar substratos hidrofóbicos. O Triton- X (controle positivo) dispersou 95,38% do óleo de motor em água resultando na formação do halo de 62mm de diâmetro. No meio otimizado foi visualizado a formação do halo com 53mm de diâmetro e dispersão de 81,54% do óleo de motor em água pelo biossurfactante presente no líquido metabólico livre de células (Figura 7).

**Figura 6** - Atividade dispersante para o óleo motor observado como: (A) óleo motor com Triton-X e (B) óleo motor com biossurfactante produzido por *C. glabrata*.



## 4. CONCLUSÃO

O principal fator limitante na comercialização de biossurfactantes está associada à produção não econômica em larga escala. Para superar os obstáculos e para competir com surfactantes sintéticos, substratos baratos e micro-organismos eficazes estão sendo

utilizados. De acordo com os resultados obtidos, *C. glabrata* (UCP 1556) mostrou potencial para produzir biossurfactante por fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais. Os resíduos agroindustriais utilizados SL e M são considerados substratos promissores para produção de biossurfactante e pode reduzir muitos problemas de processamento e de gestão de resíduos industriais. A interação otimizada entre estes substratos SL e M também estabelece condições promissoras para a produção industrial em larga escala de bioprodutos. Por outro lado, o presente trabalho sugere que o biossurfactante produzido, solubiliza substâncias hidrofóbicas sendo indicado para aplicação na indústria cosmética.

## AGRADECIMENTOS

A pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (308245/2010-5), e pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE (APQ N<sup>o</sup>.1331-2.12/10). Os autores agradecem à CAPES pela bolsa de doutorado e também a Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pelo uso dos laboratórios.

## 5. REFERÊNCIAS

- ACCORRSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Braz J Microbiol.**, v.43, p. 116-125, 2012.
- ANTUNES, A.A.; ARAUJO, H.W.C.; SILVA, C.A.A.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 using corn steep liquor and corn post-frying oil as nutrients. **Arq Inst Biol.**, v. 80, p. 334-341, 2013.
- BABU, P.S.; VAIDYA, A.N.; BAL, A.S.; KAPUR, R.; JUWARKAR, A.; KHANNA, P. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. **Biotechnol Lett.**, v. 18, p. 263-68, 1996.

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

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

BARBIERI, E.; PHAN, V.N.; GOMES, E.V. Efeito do LAS-C12, dodecil denzeno sulfonato de sódio linear, na taxa metabólica e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. **Ecotoxicology Environmental Restoration**, v. 3, p. 69-75, 2000.

BIALKOVA, A.; ŠUBIK, J. Biology of the Pathogenic Yeast *Candida glabrata*. **Folia Microbiol.**, v. 51, p. 3-20, 2006.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure Applied Chem.**, v. 82, p. 97-116, 2010.

COIMBRA, C.D.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. **Curr Microbiol.**, v.58, p. 245-51, 2009.

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

CUNHA, C.D.; ROSÁRIO, M.; ROSADO, A.S.; LEITE, S.G.F. *Serratia* sp. SVGG16: A promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochem.**, v. 39, p. 2277-82, 2004.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polymeric hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosph**, v. 72, p. 1229-1234, 2009.

DESAI, J.D.; BANAT, A. Biosurfactants. In: Kosaric N, editor. Biosurfactants: production, properties and application. **Surfactant science series**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 65–86, 1992.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal Chem.**, v. 28, p. 350–356, 1956.

DUKEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 17, p. 61-69, 2001.

DURHAM, D. R.; KLOOS, W. E. Compartive study of the total cellular fatty acid of *Staphylococcus specieis* of human origin. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 28, p. 223-228, 1978.

FONTES, G.C., AMARAL, P.F.F. COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante Por levedura. **Quim. Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-99, 2008.

FORATO, L.A.; BRITTO, D.; SEREMIN, J.A.; COLNAGO, L.A.; ASSIS, O.B.G. Mechanical and Wetting Properties of Zein Films Extracted From from Corn Gluten Meal. **Polimeros**, v. 23, p. 42-48, 2013.

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Analysis of Rhamnolipid Biosurfactants Produced Through Submerged Fermentation Using Orange Fruit Peelings as Sole Carbon Source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 694-705, 2009.

GEORGIOU, G.; LINS, S.; SHAMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Bio/Technology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

JARA, A.M.A.T.; ANDRADE, R.F.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.101, p. 315-318, 2013.

KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; PHILIP, J.C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S.A.; RITCHKOVA, M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, p. 109-120, 2001.

LAMBERT, J.B.; SHULVELL, H.F.; LIGHTNER, D.A.; COOKS, R.G. Organic Structural Spectroscopy. **Prentice Hall: Upper Saddle River**, v. 568, p. 952–8, 2001.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Braz Arch Biol Technol.**, v. 52, p.7 85-793, 2009.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP 0995 for application in the petroleum industry. **Colloids Surf B.**, v. 102, p. 202–9, 2013.

MANOCHA, M. S., SAN-BLAS. G., CENTENO, S. lipid composition of *Paracciodioids brasilienses*: Possible correlation witer virulence of different strains. **Journal of General Microbioly**, v. 177, p. 147-154, 1980.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-34, 2002.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure–function relationship of the lipopeptide biosurfactants. **Biochim J Biophys Acta**, v. 1488, p. 211-218, 2000.

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

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Curr Science**, v. 94, p. 737–746, 2008.

NAYAK, A.S.; VIJAKUMAR, M.H.; KAREGOUDA, T.B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp., PNK-04 and its application in bioremediation. Intern. **Biodeter and Biodegrad.**, v. 63, p. 73-79, 2009.

NATORI, Y; NAGASAKI T; KOBAYASHI, A; FUKAWA, H. Production of coenzyme Q<sub>10</sub> by *Pseudomonas* N842. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, p.1799–1800, 1978.

NAUMANN, D. **Infrared spectroscopy in microbiology**, In: Encyclopedia of Analytical Chemistry. Meyers, R.A. (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, U.K. 102p, 2000.

NISTCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUGONSKI, J. **Journal Biotechnol.**, v. 92, p. 92-94, 2002.

PARTHASATATHI, R.; ELANGO, R.; JOICE, P.A. Isolation and identification of potential biosurfactant producers from mangrove ecosystems. **Golden Research Thoughts**, v. 3, n. 7, p. 1-6 , 2014.

PATEL, R.M.; DESAI, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Lett Appl Microbiol.**, v. 25, p. 91-94, 1997.

PIRT, S.J. **Principles of microbe and cell cultivation**. Blackwell Scientific press, London. 284p, 1982.

RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as

substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 729-734, 2007.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SARUBBO, L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1-5, 2014.

SARUBBO, L.A.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Eletron J Biotechnol.**, v. 9, p. 400–6, 2006.

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

SOBRINHO, H.B.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LEITE, F.C.L.; SARUBBO, L.A. Utilization of two agro-industrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Process Biochem.**, v.43, p. 912–917, 2008.

SOUSA, J.R.; CORREIA, J.A.C.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B.; CRUZ, A.J.G. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 431-441, 2014.

WILLUSMEN, P.A.; KARLSON, U.; Screening of bacteria, isolated from PAH contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415–233, 1997.

YU, G.Y.; SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L.; BERTGNOLLI, B.L. Production of iturin a by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biol Biochem.**, v.34, p. 955-963, 2002.

YIN, H.; QIANG, J.; JIA, Y.; YE, J.; PENG, H.; QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. **Process Biochemistry**, v. 44, p.302-308, 2008.

.

## Capítulo IV

**Produção de CoQ<sub>10</sub> por *Candida glabrata* (UCP 1556) utilizando meio de baixo custo a base de resíduos agroindustriais**

\* Manuscrito a ser submetido para PATENTE

---

## RESUMO

A CoQ<sub>10</sub> é um agente antioxidante endógeno que está presente em todos os tecidos, variando a sua quantidade e a função, sendo utilizada para combater o estresse oxidativo, comercializada como suplemento alimentar e utilizada em formulações cosméticas. Neste trabalho foi investigado a produção da CoQ<sub>10</sub> por *Candida glabrata* utilizando um meio de cultivo otimizado constituído por resíduos agroindustriais (milhocina e soro de leite), avaliar a produção, seu efeito citotóxico e o potencial antioxidante. A produção da CoQ<sub>10</sub> foi realizada inicialmente em meio controle contendo glicose, extrato de levedura, peptona e sais inorgânicos e meio de produção otimizado pela substituição da glicose pelo soro de leite e peptona pela milhocina como substratos. As concentrações foram estabelecidas por planejamento experimental do tipo (DCC) de 2<sup>2</sup>. A identificação da coenzima foi realizada pela comparação do tempo de retenção do padrão com a amostra e a quantificação realizada após a curva de calibração. A determinação da atividade citotóxica foi realizada pelo método de viabilidade celular utilizando o corante MTT e o potencial antioxidante determinado pelo método do DPPH. O meio otimizado (40% de soro de leite e 20% de milhocina), obteve o maior rendimento de biomassa de 9,1g/L<sup>-1</sup> e produção de CoQ<sub>10</sub> confirmada após análise do tempo de retenção das amostras. O teste de citotoxicidade *in vitro* demonstrou que a CoQ<sub>10</sub> na concentração de 25µg/mL não apresentou atividade citotóxica sobre os macrófagos. Os resultados da atividade antioxidante demonstraram um elevado poder antioxidante de 73%. Sendo assim *C. glabrata* demonstra ser uma excelente produtora de CoQ<sub>10</sub> por processo biotecnológico com perspectivas de sua utilização em processos industriais na área de cosméticos.

**Palavras-chaves:** *C. glabrata*, resíduos agroindustriais, CoQ<sub>10</sub>, potencial antioxidante, citotoxicidade.

## ABSTRACT

CoQ<sub>10</sub> is an endogenous antioxidant that is present in all tissues, varying in quantity and function, and is used to reduce oxidative stress, marketed as a dietary supplement and used in cosmetic formulations. In this work was investigated the production of CoQ<sub>10</sub> by *Candida glabrata* using a culture medium optimized consisting of agro-industrial waste (whey and corn steep liquor), evaluate the production, its cytotoxic effect and antioxidant potential. The production of CoQ<sub>10</sub> was initially performed in control medium containing glucose, yeast extract, peptone and inorganic salts and the production medium optimized by replacement of glucose by whey and peptone by corn steep liquor as substrates. Concentrations were established by experimental planning (DCC), 2<sup>2</sup>. The identification of coenzyme was performed by comparison of the retention time of the standard with the sample and the quantification performed after the calibration curve. Determination of cytotoxic activity was performed by the method of cell viability using the dye MTT and antioxidant potential determined by the DPPH method. Optimized medium (40% whey and 20% corn steep liquor) obtained the higher biomass yield of 9.1g/L<sup>-1</sup> and CoQ<sub>10</sub> production confirmed after analysis of the retention time of the sample. The *in vitro* cytotoxicity assay demonstrated that the concentration of CoQ<sub>10</sub> of 25µg/mL showed no cytotoxic activity on macrophages. The results of antioxidant activity showed a high antioxidant power of 73%. Thus *C. glabrata* demonstrated to be an excellent producer of CoQ<sub>10</sub> for biotechnological process with prospects for their use in industrial processes in the area of cosmetics.

**Keywords:** *C. glabrata*, agro-industrial waste, CoQ<sub>10</sub>, potential antioxidant, cytotoxicity.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento do setor industrial tem trazido muitos benefícios à população, proporcionando considerável melhoria na qualidade de vida no mundo. Entretanto altos índices de produtividade levaram ao rápido decréscimo dos recursos naturais e ao mesmo tempo, à geração de grandes quantidades de resíduos industriais. A reutilização de resíduos, após a detecção de suas potencialidades, vem sendo considerada atualmente a alternativa que pode contribuir para a diversificação de produtos, diminuição dos custos de produção de biomoléculas pelo fornecimento de matérias-primas alternativas através de recursos agroindustriais em processos fermentativos com diferentes tipos de micro-organismos por processos biotecnológicos (ACCORSINI et al., 2012; LANGANKE, 2013).

A produção de metabólitos secundários, por processos biotecnológicos, aplicados à indústria de cosméticos, aliado com o aumento médio de vida da população criam perspectivas para o mercado mundial. Em consequência dessa esperança, existe hoje uma grande demanda de produtos para o rejuvenescimento. Esta procura levou ao aparecimento de novos produtos aplicados na área da cosmetologia, onde substâncias que produzam um efeito biológico de renovação celular no tecido levam a benefícios e consequentemente, satisfaz a grandes demandas da sociedade (SILVA e FERRARI, 2011).

Entretanto, um das principais razões apontadas pelos pesquisadores como responsável pelo processo de envelhecimento é o desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante de nosso organismo provocado pelo estresse oxidativo (NOVAES et al., 2014).

O estresse oxidativo pode ser provocado por diferentes causas extrínsecas como por raios UV ou intrínsecas como os metabólitos gerados no metabolismo celular. Portanto, os cosméticos apresentam propriedades de redução dos sinais do envelhecimento da pele. A CoQ<sub>10</sub> é um agente antioxidante endógeno que está presente em todos os tecidos, variando a sua quantidade e a função, sendo utilizada para combater o estresse oxidativo. Os níveis dessa coenzima são reduzidos com a idade e em pacientes com doenças crônicas (cardíacas, distrofias musculares, Parkinson, câncer, diabetes e HIV-Aids) (BENTINGR et al., 2007; MARISCAL et al., 2014).

A literatura trata apenas da produção da CoQ<sub>10</sub> por processos biotecnológicos. Contudo, o processo de aplicação é restrito e poucas informações podem ser

encontradas sobre CoQ<sub>10</sub> na utilização em cosmético (YEN et al., 2009; HA et al., 2009)

Este trabalho teve como objetivo promover a produção biotecnológica da Coenzima Q<sub>10</sub> por *C. glabrata* (1556), avaliar sua toxicidade e seu potencial antioxidante, utilizando um meio otimizado economicamente viável a base de resíduos agroindustriais (soro de leite e milhocina), como fontes nutricionais (carbono e nitrogênio) para aplicações na indústria de cosméticos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. MATERIAIS**

#### **2.1.1. Micro-organismo**

Micro-organismo: *Candida glabrata* (UCP 1556) isolada do solo do semi-árido (cidade Serra Talhada, Pernambuco), foi gentilmente fornecida pelo banco de cultura do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), registrada no World Federation Culture Collection-WFCC.

#### **2.1.2. Substratos**

Os substratos utilizados foram resíduos agroindustriais: a milhocina (M), subproduto do beneficiamento da indústria do milho e soro de leite (SL) proveniente da indústria de laticínios de São Bento do Una (PE).

#### **2.1.3. Meio de manutenção**

O meio de manutenção da levedura foi o Yeast Mold Ágar (YMA), com a seguinte composição: extrato de levedura 3g; peptona 5g; extrato de malte 3g; glicose 10g; ágar 15g; água destilada 1000mL, pH 5,8 e incubado por 48h a 28°C.

#### **2.1.4. Otimização da produção de biomassa por *C. glabrata* (1556)**

O meio controle utilizado foi o descrito por Natori et al., (1978), composto por: extrato de levedura (1g/mL), peptona (1g/mL), glicose (2g/mL), CaCO<sub>3</sub> (0,12g/mL) e MgSO<sub>4</sub> (0,03g/mL). A estratégia de estudos escolhido para otimização foi a partir da formulação de um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central (DCC) 2<sup>2</sup>, formulados com diferentes concentrações de resíduos agroindustriais SL

substituindo a glicose como fonte de carbono e M substituindo a peptona como fonte de nitrogênio. Os níveis do planejamento experimental estão apresentados na tabela 1. O extrato de levedura e as concentrações dos minerais no meio foram constantes em todas as condições do planejamento experimental.

**Tabela 1** - Níveis do planejamento experimental (DCC) 2<sup>2</sup>

| Fatores           | Planejamento DCC |    |    |    |       |
|-------------------|------------------|----|----|----|-------|
|                   | Níveis           |    |    |    |       |
|                   | -1,41            | -1 | 0  | +1 | +1,41 |
| Soro de leite (%) | 15,9             | 20 | 30 | 40 | 44,1  |
| Milhocina (%)     | 7,95             | 10 | 15 | 20 | 22,05 |

A análise estatística foi demonstrada no diagrama de Pareto padronizado para as concentrações usadas de SL e M, utilizando como variável resposta a produção de biomassa. As estimativas dos efeitos que foram estatisticamente significantivos são indicados pela linha tracejada. A magnitude de cada um e eficácia é representada pelas colunas e linha transversal correspondente ao valor  $p = 0.5$ , indicando significância estatística e eficácia. Os níveis do planejamento experimental (DCC) 2<sup>2</sup> foram codificados como -1, +1 e 0 (zero é considerado o ponto central) e os pontos axiais (+1,41 e -1,41) foram calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde  $X_i$  é o valor codificado da variável independente,  $x_i$  é o valor real da variável independente,  $x_0$  é o valor real da variável independente no ponto central e  $\Delta x_i$  é o valor variável. A significância do efeito foi testada por análise de variância (ANOVA), e estatisticamente analisada a partir dos dados do planejamento experimental, incluindo diagrama de Pareto, pelo programa Statistica Stasoft (EUA) versão 7.0.

## 2.2. Métodos microbiológicos

### 2.2.1. Preparação do inóculo

O inóculo foi padronizado transferindo-se células de *C. glabrata* (UCP 1556), para o Caldo Yeast Mold (CYM), mantido à temperatura de 28°C, durante 24h e 150rpm até a obtenção de 10<sup>7</sup> células/mL.

### 2.2.2. Produção de biomassa por *Candida glabrata* (UCP 1556)

Os cultivos para produção da biomassa foram realizados em frascos Erlenmeyer com 1L de capacidade, um contendo 500 mL do meio controle e outros 12 frascos com 500mL dos meios de produção (soro de leite e milhocina) de acordo com as concentrações do planejamento experimental, inoculados com suspensão de  $10^7$  células/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150rpm, incubados por 72h, à temperatura de 28°C. Após este período foi realizada uma centrifugação a 4.000g, seguida de filtração (membrana de nylon silkscreen 120F) a fim de separar as células do líquido metabólico. A biomassa obtida foi lavada com água deionizada, congelada e liofilizada, sendo mantida em dessecador até peso constante para quantificação de biomassa seca, estimada por gravimetria. Na condição otimizada as alíquotas foram coletadas a cada 4h, 12h e posteriormente a cada 24 horas totalizando 72 horas.

### 2.2.3. Determinação do consumo de glicose e do pH

O consumo de glicose foi avaliado pelo método colorimétrico enzimático (LABTEST) usando D-glicose como padrão e a absorvância a 500nm em espectrofotômetro. Para a determinação do pH foi utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310).

### 2.2.4. Extração da CoQ<sub>10</sub>

A biomassa com peso de 40g foi mantida sob refluxo a 90°C por 20 minutos, tratada com 25mL de água destilada, 75mL de metanol, 2,5g de pirogaloll e 10g de hidróxido de sódio, para saponificação. A biomassa saponificada, após resfriamento com gelo, foi transferida para funil de separação de 500mL de capacidade, submetida à extração com 100mL de hexano, agitando manualmente por 20 minutos, ficando em repouso até separação das duas fases. A fase superior foi colocada em frascos de Erlenmeyer com 250 mL de capacidade e repetiu-se esse processo por mais duas vezes. As fases 1,2 e 3, reunidas foram lavadas três vezes com água destilada e evaporadas até secura (rotaevaporador) sob a temperatura de 40°C. A seguir foram ressuspensas em 2mL de acetona, concentrada a 25% do volume e submetido à cromatografia em camada delgada para pré-purificação (OKADA et al., 1995).

### **2.2.5. Identificação da CoQ<sub>10</sub>**

#### **2.2.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Nesta análise foi utilizada uma placa de 20X20cm de sílica gel e hexano como sistema de solvente para separar a CoQ<sub>10</sub>. O padrão de CoQ<sub>10</sub> e a amostra foram aplicadas na placa com auxílio de um capilar. A identificação da CoQ<sub>10</sub> presente na amostra ficou evidenciada pela comparação do R<sub>f</sub> do padrão com o da amostra. Essa região foi retirada com auxílio de uma espátula e colocada em um becker de 100mL de capacidade, adicionado 20mL de acetona e colocada sob agitação por 30 minutos, ao final desse período, foi centrifugada a 3.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e evaporado a temperatura de 40<sup>0</sup>C. Os extratos contendo a CoQ<sub>10</sub> foi ressuspensão em 0,5mL de acetona e submetidos a HPLC para identificação (OKADA et al., 1995).

#### **2.2.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

A ubiquinona CoQ<sub>10</sub> purificada foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo Alliance 2695 e identificadas por comparação dos tempos de retenção da amostra com o padrão da ubiquinona CoQ<sub>10</sub> e a quantificação realizada após construção da curva-padrão com seis diferentes concentrações (de 0,05 a 0,5µg/mL), usando a área do pico para cálculo da concentração (RODRIGUES-AMAYA, 1999). As análises foram realizadas usando uma coluna SUNFIRE C18 (4,6x250mm), nas seguintes condições: acetonitrila: isopropanol (55%: 45%), vazão: 0,6ml/min, detector de UV: 270nm e temperatura do forno 30<sup>0</sup>C.

### **2.2.6. Determinação da atividade citotóxica da CoQ<sub>10</sub>**

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HEp-2 (carcinoma de laringe humana) e J744.A1 (macrófago murino) mantidas em meio de cultura DMEM. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>.

As células NCI-H292, HEp-2 ( $10^5$  células/mL) e J744.A1 ( $17,5 \times 10^4$  células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (1%) foram adicionadas aos poços em concentração final de 25 µg/mL. O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como padrão. Após 72h de reincubação, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560nm. Os experimentos foram analisados no programa GraphPad Prism5.0. Cada amostra foi testada em triplicata.

### 2.2.7. Determinação de atividade antioxidante "Scavenger" do radical DPPH

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazila) é considerado um radical estável e tem absorbância máxima em 517nm. Quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio de um agente oxidante ou de um radical livre, para se tornar um composto estável, resulta em perda de absorbância, passando de violeta para amarelo. Para determinar o "scavenger" dos radicais DPPH conforme método proposto por Brande-Willians et al., (2005). O flavonóide quercetina foi utilizado como controle positivo do experimento. Adicionou-se 1mL do reagente DPPH 0,3mM somente às amostras. Para controle preparou-se uma solução contendo etanol (2,5mL) e DPPH 3mM (1mL) e como branco controle somente 3,5mL de etanol. Passado 30 minutos, as absorbâncias foram lidas em 517nm e calculadas em percentual de atividade antioxidante usando a equação:

$$AA\% = 100 - (Abs\ Amostra - AbsBranco) \times 100 / (Abs\ controle - Abs\ Branco)$$

O ensaio foi realizado em triplicata e a concentração capaz de inibir 50% do radical DPPH ( $CI^{50}$ ) foi calculada por regressão linear e expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) onde o eixo X representa a concentração e o eixo Y a percentagem de atividade antioxidante (AA%). As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prisma.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Otimização da produção de biomassa por *C. glabrata* (UCP 1556)

O meio controle proposto por Natori et al., (1978) apresentou  $5,1g/L^{-1}$  de biomassa. A estratégia escolhida para estudos de otimização foi formular um

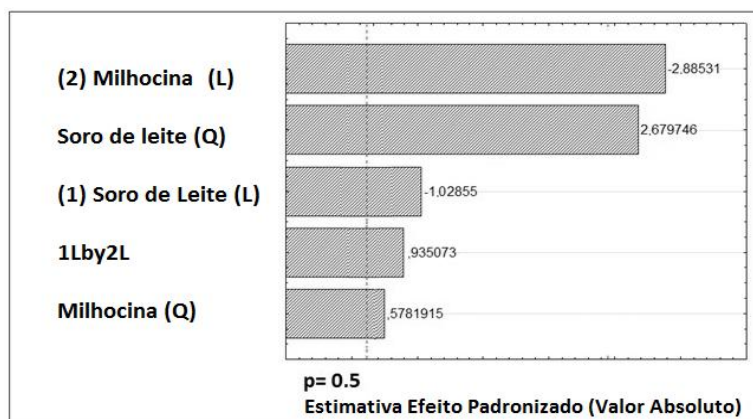
planejamento do tipo DCC 2<sup>2</sup> (Tabela 1). O resultado deste planejamento mostra que na condição 4, o meio com soro de leite (40%) e milhocina (20%), apresentou a melhor produção de biomassa 9,1g/L<sup>-1</sup> (Tabela 2).

**Tabela 2** - Resultados do planejamento (DCC) 2<sup>2</sup> para produção de biomassa por *C. glabrata* (UCP 1556)

| Condições | Soro de leite (%) | Milhocina (%) | Biomassa (g/L <sup>-1</sup> ) |
|-----------|-------------------|---------------|-------------------------------|
| 1         | -1                | -1            | 3,30                          |
| 2         | -1                | 1             | 3,70                          |
| 3         | 1                 | -1            | 6,90                          |
| 4         | 1                 | 1             | <b>9,10</b>                   |
| 5         | -1,41             | 0             | 3,20                          |
| 6         | 1,41              | 0             | 7,50                          |
| 7         | 0                 | -1,41         | 3,61                          |
| 8         | 0                 | 1,41          | 3,98                          |
| 9         | 0                 | 0             | 5,30                          |
| 10        | 0                 | 0             | 5,87                          |
| 11        | 0                 | 0             | 5,61                          |
| 12        | 0                 | 0             | 5,69                          |

Os efeitos do soro de leite e da milhocina sobre a produção da biomassa e da interação entre eles foram analisados e estão apresentados no diagrama de Pareto (Figura 1). Todas as variáveis foram significativas do ponto de vista estatístico, pois passaram a linha tracejada. As variáveis independentes milhocina e soro de leite em função quadrática e as interações entre eles apresentaram-se estatisticamente significativas com efeito positivo, favorecendo a produção da biomassa no meio de cultivo (Figura 1).

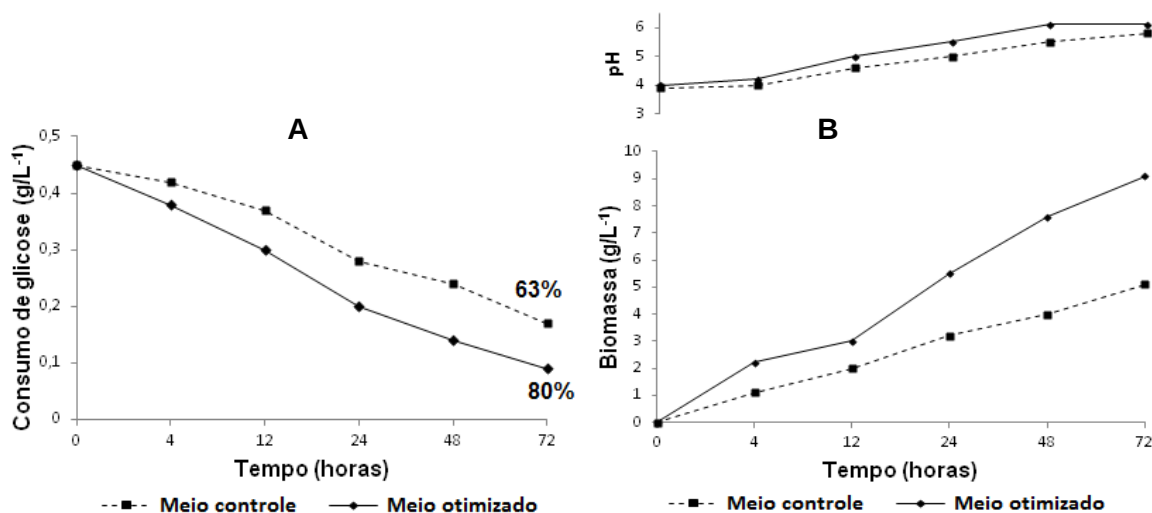
**Figura 1-** Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para planejamento fatorial do tipo (DCC) 2<sup>2</sup>, tendo como fatores o soro de leite e milhocina, como variável resposta a produção de biomassa.



### 3.2.Cinética de crescimento do meio otimizado de *C. glabrata* (UCP 1556)

A *C. glabrata* (UCP 1556) apresentou no meio controle um consumo de glicose de 63% e no meio de produção otimizado (condição 4) 80% após 72 horas de cultivo (Figura 2A). A produção máxima de biomassa celular em meio controle e no meio de produção após 72 horas de cultivo foi de: 5,1g/L<sup>-1</sup> e 9,1g/L<sup>-1</sup>, respectivamente, apresentando curvas similares, variando na quantidade da produção, ambos com pH levemente ácido em torno de 6,0 (Figura 2B).

**Figura 2 -** (A) Determinação consumo de glicose, (B) pH e produção de biomassa de *C. glabrata* (UCP 1556) nos meios controle e no meio de produção otimizado a base de resíduos agroindustriais.

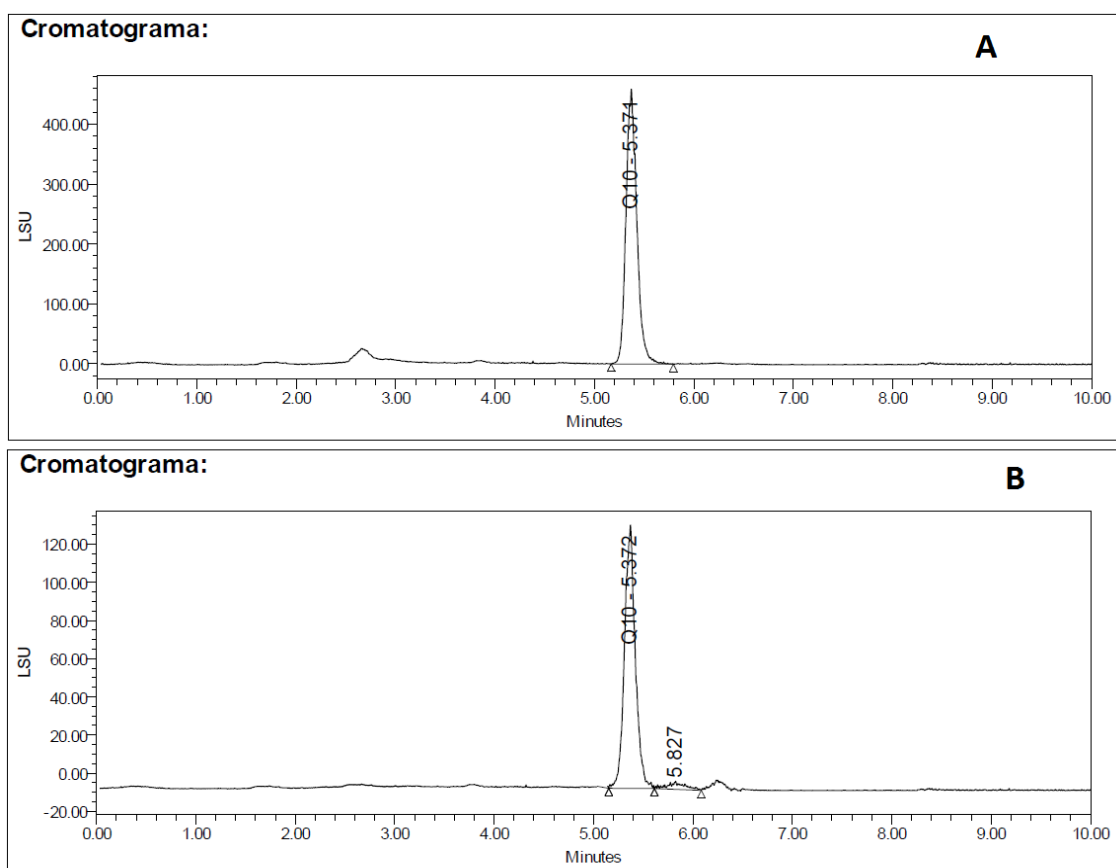


Cazetta e Celligoi (2006), utilizando um processo biotecnológico para produção de biomassa celular nas linhagens *C. lipolytica*, *R. mucilaginosa* e *S. cerevisiae* em meio de produção (melaço - 50% e vinhaça - 50%), obtiveram um consumo de glicose acima de 50%, e de biomassa valores de 6,9; 2,63 e 7,49 g/L<sup>-1</sup>, respectivamente.

### 3.3. Identificação e quantificação da CoQ<sub>10</sub>

A CoQ<sub>10</sub> é uma molécula importante industrialmente por ter aplicações nutracêuticos e cosmeceuticos. A CoQ<sub>10</sub> é produzida por fermentação microbiana e o processo exige a utilização de linhagens com elevada produtividade e rendimentos de CoQ<sub>10</sub> (RANADIVE et al., 2014). Analisando os cromatogramas observamos a identificação da CoQ<sub>10</sub> comparando os tempos de retenção (T<sub>R</sub>) do padrão com o da amostra contendo extratos produzidos pela *C. glabrata*, apresentando valores similares Tr do padrão 5,371 e da amostra 5,372. Em termos de quantificação a CoQ<sub>10</sub> apresentou rendimento de 150µg/g (Figura 3).

**Figura 3** - Cromatogramas. (A) solução padrão de CoQ<sub>10</sub> na concentração de 1mg/mL; (B) amostra contendo extrato purificado de CoQ<sub>10</sub> produzida pela *C. glabrata* na mesma concentração.



Athiyaman e Sankaranarayanan (2014), realizaram um estudo biotecnológico para produção de CoQ<sub>10</sub> por *R. glutinis*, em meio otimizado a base de ácido-hidroxi benzóico (PHB) e óleo de soja (7,78%), utilizando metodologia de superfície de resposta, as condições de cultura promoveram o crescimento ideal para produção de CoQ<sub>10</sub>. A produção aumentou consideravelmente de 10mg/L<sup>-1</sup> (meio controle) para 39,2mg/L<sup>-1</sup> (meio otimizado).

### 3.4. Resultados da atividade citotóxica da CoQ<sub>10</sub>

O extrato da CoQ<sub>10</sub> produzido por *C. glabrata* em meio otimizado a base de resíduos agroindustriais (condição 4) foram testados quanto a atividade citotóxica em células humanas tumorais (NCI-H292 e HEp-2) e em células de macrófagos murino (J774.1). Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%) (FOUCHE et al., 2008). Os resultados demonstraram que na concentração de 25µg/mL a CoQ<sub>10</sub> produzida por *C. glabrata* (UCP 1556) não apresentou atividade de inibição sobre as células dos macrófagos murino (J774.1), com 0%. Entretanto nas células humanas tumorais (NCI-H292 e HEp-2) apresentaram pouca atividade de inibição, com valores de 20,98 e 13,39%, respectivamente.

### 3.5. Análise da atividade antioxidante da CoQ<sub>10</sub>

Os resultados do ensaio para a determinação da capacidade sequestrante de DPPH estão expressos em IC<sup>50</sup> - µg/mL, e denota a concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a quantidade de radicais livres. A capacidade sequestrante do radical livre DPPH pela CoQ<sub>10</sub> de *C. glabrata* foi de 6,90µg/mL. De acordo com Nguma (2010), quanto menor a concentração, maior é a capacidade antioxidante da amostra. Nguma (2010), realizou um trabalho e avaliou a capacidade antioxidante de BHT (Butil hidroxi tolueno), ácido ascórbico e ácido gálico. O perfil das amostras aos valores padronizados foram de 17,2; 9,2 e 2,4µg/mL, respectivamente. Pode-se dizer que a amostra de CoQ<sub>10</sub> produzida por *C. glabrata* tem maior potencialidade

antioxidante em relação ao BHT e ác. ascórbico, sendo este um resultado bastante promissor.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi produzido por processo biotecnológico a coenzima Q<sub>10</sub> pela *Candida glabrata* (UCP 1556) em meio otimizado contendo resíduos agroindustriais (soro de leite e milhocina). A CoQ<sub>10</sub> produzida apresentou elevado poder antioxidante e diante de células de macrófagos murino não demonstrou atividade. A coenzima Q<sub>10</sub> produzida neste trabalho surge como uma alternativa de elevado valor industrial a ser obtida por processos biotecnológicos.

#### 5. REFERÊNCIAS

ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Biossurfactantes produção por leveduras utilizando óleo de soja e glicerina como substrato de baixo custo. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, n.1, p. 116-125, 2012.

ALLEY, M.C.; DOMINIC, A.; SCUDIERO, L.; HURSEY, M.L.; DONALD, L.F. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.

ATHIYAMAN, B.P.; SANKARANARAYANAN, M. Modelling of process parameters for enhanced production of coenzyme Q<sub>10</sub> from *Rhodotorula glutinis*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, p. 1-12, 2014.

BENTINGR, M.; BRISMAR, K.; DALNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1, p. 41-50, 2007.

CAZETTA, M.L.; CELLIGOI, M.A.P.C. Estudo de diferentes combinações de melão/vinhaça como substrato para produção de proteínas e lipídios por micro-organismos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 27, n. 1, p. 3-10, 2006.

FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. In vitro anticancer screening of South African plants. **J Ethnopharmacol.**, v. 119, n. 3, p. 455-61, 2008.

HA, S.; KIM, S.; SEO, J.; JEYA, M.; ZHANG, Y.; RAMU, T.; KIM, I.; LEE, J. Ca<sup>2+</sup> increases the specific coenzyme Q<sub>10</sub> content in *Agrobacterium tumefaciens*. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 32, p. 697–700, 2009.

LANGANKE, R. O que são resíduos?. 2013. Disponível em: [http://eco.ib.usp.br/lepac/conservacao/ensino/lixo\\_residuos.htm](http://eco.ib.usp.br/lepac/conservacao/ensino/lixo_residuos.htm), Acesso em: 10 de maio de 2014.

MARISCAL, I.G.; TESTON, E.G.; PADILLA, S.; MONTALVO, A.M.; VICIANA, T.P.; FONSECA, L.V.; GANDOLFO, P.D.; OCAÑA, C.S. Regulation of coenzyme Q biosynthesis in yeast: A new complex in the block. **IUBMB Life**, v. 66, n. 2, p. 63-70, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NATORI, Y; NAGASAKI T; KOBAYASHI, A; FUKAWA, H. Production of coenzyme Q<sub>10</sub> by *Pseudomonas* N842. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, p.1799–1800, 1978

NOVAES, G.M.; SILVA, M.J.D.; ACHKAR, M.T.; VILEGAS, W. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 535-539, 2014.

OKADA, K; TAKIZAWA, K.; NISHIMURRA, K.; MIYAJI, M.; FUKUSHIMA, K. Ubiquinone systems, GC, contents and cellular fatty acids composition of the form-genus *Malbranchea* and *Coccidioides immitis* for chemotaxonomic study. **Mycoscience**, v. 36, p. 385-389, 1995.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoids Analysis in Food**. International Life Sciences Institute Press, Washington. 64p, 1999.

RANADIVE, P.; METHA, A.; CHAVAN, Y.; MARX, A.; GEORGE, S. Morfológica e molecular diferenciação de *Sporidiobolus johnsonii* ATCC 20490 e sua coenzima Q<sub>10</sub> overproducing Mutant UF16 Strain. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 343-357, 2014.

SILVA, W.J.M.; FERRARI, C.K.B. Mitochondrial Metabolism, Free Radicals and Aging. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

YEN, H.W.; SHIH, T.Y. Coenzyme Q<sub>10</sub> production by *Rhodobacter sphaeroides* in stirred tank and in airlift bioreactor. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 32, p. 711–716, 2009.

## Capítulo V

**Produção de ácidos graxos poliinsaturados  
PUFAs ( $\omega$ 3 e  $\omega$ 6) por *Candida glabrata* (UCP  
1002 e 1556) em substratos alternativos à base de  
resíduos agroindustriais**

\* Manuscrito a ser submetido para PATENTE

---

## RESUMO

Os lipídeos são um grupo de substâncias biológicas compostos principalmente de substâncias não polares (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e esteróis) e compostos polares (ácidos graxos livres, fosfolipídios e esfingolipídios). Neste trabalho foram desenvolvidos estudos biotecnológicos visando a produção de lipídeos poliinsaturados ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) por duas linhagens de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) em meio a base de resíduos agroindustriais (milhocina e soro de leite). A produção foi realizada em cultivo submerso em um meio controle contendo glicose, extrato de levedura, peptona e sais inorgânicos e em um meio de produção a base de resíduos agroindustriais, com 40% de soro de leite em substituição a glicose e 20% de milhocina em substituição a peptona. O rendimento da biomassa foi calculado por gravimetria e os lipídeos extraídos a partir da biomassa, utilizando clorofórmio: metanol. Os ácidos graxos foram metilados e identificados por cromatografia gasosa (CG). Os resultados demonstraram que as linhagens de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) apresentaram rendimento de biomassa, em meio contendo 40% de soro de leite e 20% de milhocina, valores de 6,8 e 8,8 g/L<sup>-1</sup>, respectivamente. A produção de lipídeos totais pelas linhagens de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556), apresentaram valores de 16,20 e 21,50%, respectivamente. As duas linhagens de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556), mostraram habilidade de produzir ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), com destaque para a produção de  $\alpha$ -ácido linôlenico ( $\omega 3$ ), com 75,61 e 90,05%, respectivamente. Os resultados indicam que as duas linhagens de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) apresentam habilidade em metabolizar os resíduos agroindustriais e produzir biotecnologicamente ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs).

Palavras-chaves: Lipídeos, PUFAs, *Candida glabrata*, resíduos agroindustriais.

## ABSTRACT

Lipids are a group of biological substances mainly composed of non-polar substances (triglycerides, diglycerides, monoglycerides and sterols) and polar compounds (free fatty acids, phospholipids and sphingolipids). In this work were developed biotechnological studies for the production of polyunsaturated lipids ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ), by two strains of *C. glabrata* (UCP 1002 and 1556) in medium the basis of agro-industrial residues (corn steep liquor and whey). The production was carried out in submerged cultivate in a control medium containing glucose, yeast extract, peptone and inorganic salts and a medium of production the base of agro-industrial waste, with 40% whey in replacing glucose and 20% corn steep liquor replacing peptone. The biomass yield was calculated by gravimetrically and the lipids extracted from the biomass using chloroform: methanol. The fatty acids were methylated and identified by gas chromatography (GC). The results demonstrated that the strains of *C. glabrata* (UCP 1002 and 1556) showed biomass yield of 6.8 and 8.8 g/L<sup>-1</sup>, respectively. The total lipid production by strains of *C. glabrata* (UCP 1002 and 1556), showed values of 16.20 and 21.50%, respectively. The two strains of *C. glabrata* (UCP 1002 and 1556) showed ability to produce polyunsaturated fatty acids (PUFAs), with emphasis for the production of  $\alpha$ -linolenic acid ( $\omega 3$ ), with 75.61 and 90.05%, respectively. The results indicate that the two strains of *C. glabrata* (UCP 1002 and 1556) have the ability to metabolize agroindustrial waste and produce biotechnologically polyunsaturated fatty acids (PUFAs).

**Keywords:** Lipids, PUFAs, *Candida glabrata*, agro-industrial waste.

## 1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia apresenta novas perspectivas na utilização de micro-organismos e a utilização de resíduos agroindustriais como substratos em processos fermentativos na produção de metabólitos secundários, destaca-se como uma alternativa inovadora por apresentarem grande quantidade de matéria orgânica, reduzindo o custo de produção como também o descarte no ambiente. Além disto, este mercado mostra-se promissor por atrair o interesse pelo estudo do metabolismo lipídico em vários micro-organismos (MENG e YANG et al., 2009; CASTANHA, 2012).

O uso de leveduras como fonte de lipídeos tem sido bastante estudado para aplicação biotecnológica. Nelas o acúmulo, composição, qualidade e quantidade de lipídeos variam de espécie para espécie de acordo com sua constituição genética, fatores como condições de cultura (temperatura, pH, tempo, etc) e composição do meio (BEOPOULOS et al., 2011; JAVIER e ANTONIO, 2011).

Os lipídeos produzidos por micro-organismos apresentam composição e valor energético similar aos óleos vegetais e animais, mas como produtores de lipídeos os micro-organismos não competem por recursos alimentares, especialmente se a fonte de carbono for de baixo custo, como matérias-primas, subprodutos e excedentes das indústrias que apresenta grande rapidez de geração e sua produção não é sujeita a variações climáticas e sazonais cíclico, requer menor área de produção e melhor controle da produção e do produto (ROSSI et al., 2011; HARDER et al., 2014).

A levedura *Candida glabrata*, micro-organismo unicelular desprovido de endotoxinas e passível de melhoramento genético sendo apropriada para uso em fermentações de grande-escala. Dentre os variados tipos de lipídeos, estão os ácidos graxos que possuem principalmente função estrutural. Dentro da diversidade dos ácidos graxos, existem aqueles que o organismo tem capacidade de síntese, porém outros não. Esses ácidos graxos cuja biossíntese é inadequada são denominados essenciais: ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ 3) e  $\gamma$ -ácido linolênico ( $\omega$ 6), são considerados precursores dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de cadeia longa: ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (PAPANIKOLAOU et al., 2008; SITEPU et al., 2013).

Os ácidos graxos sintetizados por leveduras tem potencial de utilização na indústria farmacêutica para fins técnicos ou suplementos nutricionais. Recentemente, alguns estudos tem demonstrado em testes de laboratório que o uso tópico de ácidos

graxos essenciais apresentam grandes benefícios para a pele (DAUDT et al., 2013; POLI, 2014).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo produzir por processo biotecnológico ácidos graxos poliinsaturados - PUFA's ( $\omega$ 3 e  $\omega$ 6) por *Candida glabrata* (UCP 1002 e 1556), utilizando um meio de cultivo a base de substratos alternativos composto por resíduos agroindustriais (soro de leite e milhocina).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

#### 2.1.1. Micro-organismo

Micro-organismos: *Candida glabrata* (UCP 1556) isolada do solo do semi-árido (Serra Talhada, Pernambuco) e a *C. glabrata* (UCP 1002) isolada de sedimentos de manguezais (Rio Formoso, Pernambuco), foi gentilmente fornecida pela coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), registrada no World Federation Culture Collection-WFCC.

#### 2.1.2. Substratos

Os substratos utilizados foram resíduos agroindustriais: a milhocina, subproduto do beneficiamento da indústria do milho e soro de leite proveniente da indústria de laticínios de São Bento do Una (Pernambuco).

#### 2.1.3. Meio de manutenção

O meio de manutenção da levedura foi o Yeast Mold Ágar (YMA), com a seguinte composição: extrato de levedura 3g; peptona 5g; extrato de malte 3g; glicose 10g; ágar 15g; água destilada 1000 mL, pH 5,8 e incubado por 48h a 28°C.

#### 2.1.4. Meio de produção da biomassa seca

O meio controle utilizado foi o descrito por Natori et al., (1978), composto por: extrato de levedura (1g/mL), peptona (1g/mL), glicose (2g/mL), CaCO<sub>3</sub> (0,12g/mL) e MgSO<sub>4</sub> (0,03g/mL). O meio de produção a base de resíduos agroindustriais é constituído por soro de leite (40%) como fonte de carbono (em substituição a glicose) e milhocina (20%) como fonte de nitrogênio (em substituição a peptona). O extrato de

levedura e as concentrações dos minerais no meio de produção permaneceram constantes.

## **2.2. Métodos microbiológicos**

### **2.2.1. Preparação do inóculo**

O inóculo foi padronizado transferindo-se células das linhagens de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556), para o Caldo Yeast Mold (CYM), mantido à temperatura de 28°C, durante 24h e 150rpm até a obtenção de 10<sup>7</sup> células/mL.

### **2.2.2. Determinação do pH**

Para a determinação do pH foi utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310).

### **2.2.3. Produção de biomassa por *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556)**

Os cultivos para produção da biomassa foram realizados em frascos de Erlenmeyer com 500 mL de capacidade contendo 250 mL do meio controle e do meio de produção a base de resíduos agroindustriais (40% soro de leite e 20% milhocina), inoculados com suspensão de 10<sup>7</sup> células/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150rpm, incubados por 168 horas, à temperatura de 28°C. Alíquotas foram coletadas a cada 4h, 12h e posteriormente a cada 24 horas totalizando 168 horas. As amostras foram centrifugadas a 4.000g, seguida de filtração (membrana de nylon silkscreen 120F) a fim de separar as células do líquido metabólico. A biomassa obtida foi lavada com água deionizada e liofilizada, sendo mantida em dessecador até peso constante, estimada por gravimetria.

### **2.2.4. Determinação da velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e tempo de geração ( $T_G$ )**

A velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e o tempo de geração ( $T_G$ ) das amostras de *C. glabrata* crescidas no meio controle e no meio a base de resíduos agroindustriais (40% de soro de leite e 20% de milhocina), foram descritas segundo as fórmulas de Pirt (1982). Para calcular a velocidade de crescimento foi utilizada a equação:

$$\mu_{max} = (\ln X - \ln X_0)/(T - T_0)$$

Onde: X = biomassa final; X<sub>0</sub> = Biomassa inicial; T = Tempo final; T<sub>0</sub> = Tempo inicial.

O tempo de geração (T<sub>G</sub>) foi calculado pela fórmula:

$$T_G = \ln 2 / \mu_m$$

## 2.3. Métodos analíticos

### 2.3.1. Extração dos lipídeos totais

Os lipídeos foram extraídos de acordo com o método descrito por Manocha et al., (1980) onde, a partir da biomassa liofilizada, os lipídeos foram extraídos por sistema de solventes polares e apolares. A biomassa liofilizada (1,0g) foi submetida a extrações sucessivas de lipídeos por três tempos com clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v). O material foi agitado por 15 minutos, posteriormente mantido à temperatura de 5°C. O sobrenadante foi separado da biomassa por centrifugação a 5.000g, por 10 minutos e a biomassa submetida a uma nova extração. Os sobrenadantes contendo os extratos foram reunidos e evaporados até a secura no roto-evaporador. As respostas para produção de lipídeos totais foram calculadas em termo de concentração pela fórmula:

(%) de lipídeos totais = peso seco dos lipídeos em gramas(g)/ peso da amostra (g) x 100.

### 2.3.2. Metilação dos ácidos graxos

A extração dos ácidos graxos foi baseada na metodologia de Durham e Kloos (1978). Para extração, 10mg de biomassa seca foram colocadas em tubos de ensaio com tampa de rosca, suspensos em 3mL da solução trifluoreto-metano-boro a 14% e 3mL de hexano, incubados a 60°C “over-night”. Após a incubação, 4mL de água destilada foram adicionados e agitou-se em vórtex durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 5.000g durante 10 minutos a 5°C. O hexano foi separado por centrifugação, removido e evaporado com nitrogênio. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram suspensos em n-hexano.

### 2.3.3. Identificação dos ácidos graxos

A análise dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (CG) e a identificação dos componentes por comparação entre os tempos de retenção correspondentes aos picos das amostras. Utilizou-se um cromatógrafo modelo Varian com injetor automático, equipado com detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% de difenil e 95% de dimetilpolisiloxano), 30m x 0,25mm. A

temperatura do forno da coluna possui a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 150°C por 4 min<sup>-1</sup>, aumentando numa razão de 4°C min<sup>-1</sup> até se chegar a 250°C, assim permanecendo por 20 minutos. As temperaturas do detector e do injetor foram de 280°C, tendo hélio (1cm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>) como gás de arraste.

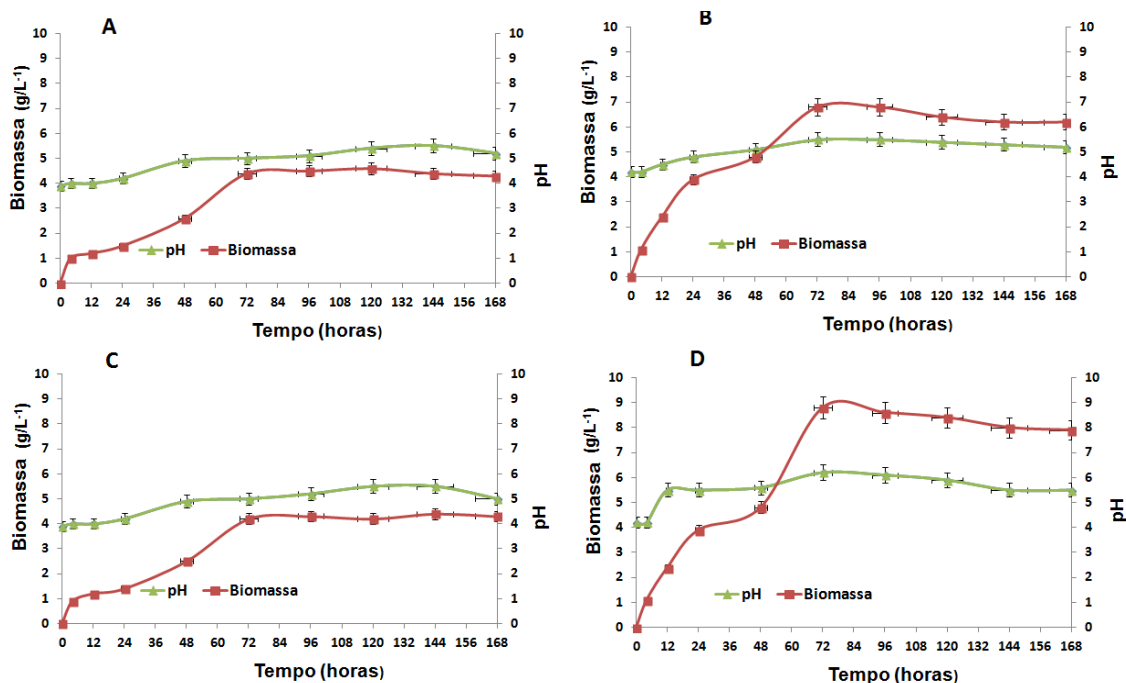
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Crescimento e produção de biomassa seca por *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556)

Devido ao rápido crescimento e adaptação das leveduras em diversos meios de cultivo e nos mais diferentes substratos, estes são apresentados como uma alternativa de inovação biotecnológica. Pesquisas mostram que a utilização de resíduos agroindustriais destacam-se no cultivo de micro-organismos como uma alternativa inovadora por apresentarem grande quantidade de matéria orgânica, reduzindo no custo de produção como também no descarte no meio ambiente (PELIZER, 2007; CASTANHA, 2012).

O pH dos meios controle e dos meios de produção a base de resíduos agroindustriais, apresentaram comportamentos similares durante as 168 horas de cultivo. No início do cultivo o pH manteve-se ácido com valores em torno de 4,0, e ao final do cultivo o pH permaneceu em torno de 5,5 a 6 (Figura 1A, 1B, 1C e 1D). A produção de biomassa pelas linhagens de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) apresentaram comportamentos similares de produção, ficando evidenciado que após 72h de cultivo, as leveduras atingiram a produção máxima no final da fase exponencial, e em seguida entraram na fase estacionária (Figura 1A, 1B, 1C e 1D). A *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) em meios de produção a base de resíduos agroindustriais apresentou rendimento de biomassa maior quando comparado com o meio controle, com valores de 6,8 e 8,8 g/L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 1B e 1D).

**Figura 1-** Determinação do pH e da produção de biomassa das linhagens de *C. glabrata* UCP 1002 (A) e UCP 1556 (C) nos meios controle e *C. glabrata* UCP 1002 (B) e UCP 1556 (D) nos meios de produção a base de resíduos agroindustriais.



Harder et al., (2014), utilizou a *Yarrowia lipolytica* para produção de lipídeos em meio contendo resíduos agroindustriais (vinhaça e melaço) e urbanos (esgoto), obtendo um rendimento da produção de biomassa, com e sem agitação, com valores de 3,55 e 3,49 g/L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em estudos realizados por Faria (2008), com a levedura *Rhodotorula rubra* usando o meio a base de melaço suplementados com zinco, magnésio e manganês, ficou evidenciado que o meio suplementado com sulfato de magnésio resultou em uma maior produção de biomassa (8,69 g/L<sup>-1</sup>), enquanto um menor valor foi observado para o meio com sulfato de zinco (7,39 g/L<sup>-1</sup>).

Cazetta e Celligoi (2006), utilizaram *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* para produzir biomassa utilizando meio a base de melaço (50%) e vinhaça (50%), obtendo valores de 6,9; 2,63 e 7,49 g/L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os parâmetros cinéticos demonstraram um comportamento de produção, onde a velocidade de crescimento máxima e o tempo de geração da *C. glabrata* (1002 e 1556), no meio controle e no meio de produção a base de resíduos agroindustriais estão

relatados na tabela 1, evidenciando que a  $\mu_{max}$  e o  $T_g$  foram melhores no meio a base de resíduos agroindustriais.

**Tabela 1** - Cinética de crescimento de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) em meio controle e em meio a base de resíduos agroindustriais.

| Cinética de Crescimento                                                                | (UCP 1002)    |               | (UCP 1556)    |               |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                                                                        | Meio Controle | Meio Produção | Meio Controle | Meio Produção |
| <b>Velocidade máxima de crescimento (<math>\mu_{max}</math>) (<math>h^{-1}</math>)</b> | 0,078         | <b>0,056</b>  | 0,086         | <b>0,045</b>  |
| <b>Tempo de geração (<math>T_G</math>) (h)</b>                                         | 7,7           | <b>6,2</b>    | 7,70          | <b>5,2</b>    |

### 3.2. Quantificação de lipídeos totais

A formação de lipídeos depende da fisiologia dos micro-organismos, começando sua produção de lipídeos durante a fase exponencial tardia e continua durante a fase estacionária (RASCHKE e KNORR, 2009). Sob condições limitantes e na presença de uma fonte de carbono em excesso os micro-organismos iniciam o armazenamento de lipídeos. Assim a composição de carbono/nitrogênio no meio de cultivo é um requisito básico para o acúmulo de lipídeos (BEOPOULOS et al., 2009). Micro-organismos que podem acumular lipídeos em mais do que 20% de sua biomassa são definidos como oleaginosos (RATLEDGE e WYNN, 2002).

Durante as 168 horas de cultivo ficou evidente que a maior produção de biomassa foi obtida com 72h (Figura 1A, 1B, 1C e 1D), sendo neste intervalo de tempo determinado os lipídeos totais. *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) foi capaz de produzir no meio de produção valores de lipídeos totais de 16,20 e 21,50%, respectivamente, (Tabela 2) ficando evidente que a *C. glabrata* (UCP 1556) é uma espécie oleaginosa. A utilização de um substrato de baixo valor comercial está diretamente relacionado com o baixo custo de produção na obtenção do óleo microbiano.

**Tabela 2** - Resultados do rendimento de biomassa e produção de lipídeos totais pela *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) em meio controle e no meio de produção a base de resíduos agroindustriais por 72h.

| Micro-organismo               | Biomassa (g/L <sup>-1</sup> ) | Lipídeos totais (%) |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| <i>C. glabrata</i> UCP 1002 * | 4,5                           | 8,84                |
| <i>C. glabrata</i> UCP 1002** | 6,8                           | 16,20               |
| <i>C. glabrata</i> UCP 1556*  | 4,8                           | 15,80               |
| <i>C. glabrata</i> UCP 1556** | 8,8                           | 21,50               |

\*meio controle

\*\*meio de produção

Delabio et al., (2013), realizou um processo biotecnológico com algumas leveduras, entre elas a *Yarrowia lipolytica*, em meio composto por esgoto, vinhaça, caldo de bambu e extrato de levedura, com e sem agitação. Por meio dos resultados obtidos, percebe-se que os dois meios apresentaram valores relativamente iguais quanto à produção de biomassa com agitação 3,5g/L<sup>-1</sup> e sem agitação 3,4g/L<sup>-1</sup>. Os lipídeos totais produzidos apresentaram valores muito diferentes, sendo gerado 5,2% de lipídeos no meio sem agitação e em maior quantidade no meio com agitação, 16,22%. Os resultados demonstram a importância da agitação no processo de produção dos lipídeos, influenciando diretamente na sua quantificação.

Cazetta e Celligoi (2006), utilizaram as leveduras *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* para produzir lipídeos totais utilizando meio a base de melaço (50%) e vinhaça (50%), obtendo valores de 16,80; 19,50 e 26,90%, respectivamente.

*Y. lipolytica* S6 cultivada em um biorreator utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono, produziu 12,3g/L<sup>-1</sup> de biomassa e 11% de lipídeos totais (JUSZCZYK et al., 2013). Embora a produção de biomassa por *Y. lipolytica* S6 foi mais elevada do que a obtida neste trabalho, por outro lado com relação a produção de lipídeos a *Y. lipolytica* S6 apresentou rendimentos inferiores aos obtidos pela *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556).

### 3.3. Identificação dos ácidos graxos

Os ácidos graxos foram identificados e analisados na condição selecionada para melhor produção de biomassa e lipídeos totais (72h), apenas nos meios de produção a base de resíduos agroindustriais (tabela 3).

**Tabela 3** - Composição dos ácidos graxos de *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) no meio de produção a base de resíduos agroindustriais.

| Ácidos graxos                                   | UCP 1002<br>Conc. (%) | UCP 1556<br>Conc. (%) |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ácido palmítico (C16:0)                         | -----                 | 0,42                  |
| Ácido palmitoléico (16:1)                       | 0,81                  | 1,02                  |
| Ácido esteárico (C18:0)                         | 1,16                  | 3,94                  |
| Ácido oléico (C18:1)                            | 2,52                  | 5,01                  |
| Ácido linoléico (18:2)                          | 2,24                  | 6,05                  |
| $\gamma$ -ácido linolênico (C18:3 - $\omega$ 6) | 3,22                  | 7,95                  |
| $\alpha$ -ácido linolênico (C18:3 - $\omega$ 3) | 90,05                 | 75,61                 |

A *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556), mostrou habilidade em produzir ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs),  $\gamma$ -ácido linolênico ( $\omega$ 6) com uma produção de 3,22 e 7,95%, respectivamente, e com destaque para a produção de  $\alpha$ -ácido linolênico ( $\omega$ 3), com 75,61 e 90,05%, respectivamente (Tabela 3).

Pirozzi et al., (2013), realizou um processo biotecnológico com a levedura *Lipomyces starkeyi* em um meio de resíduos agroindustriais a base de soro de leite para produção de biomassa e ácidos graxos, obtendo 9,5g/L<sup>-1</sup> de biomassa por 120h e na caracterização dos ácidos graxos obteve ácido palmítico 24,2%, ácido esteárico 14,6%, ácido oléico 48,5% e ácido linoléico 5,5%.

Duarte et al., (2014), utilizando *Candida* sp. (LEBM3) isolada do Pantanal, obteve um predomínio do ácido oléico no cultivo em glicerol puro e do ácido linoléico para o cultivo em glicerol bruto. Ensaios com baixa agitação e aeração favoreceram a formação de ácidos graxos.

Souza et al., (2014), realizou um estudo para a produção de ácidos graxos microbianos com quarenta leveduras de diferentes fontes, foram testadas em meio para crescimento com glicerol bruto e comercial. A *Y. lipolytica* utilizando o glicerol bruto

como uma fonte de carbono, foi selecionada pela sua capacidade em manter a viabilidade das células em concentrações de 30% de glicerol bruto. Esta levedura obteve um perfil de ácidos graxos com predominância de ácido esteárico e palmítico, 22,3 e 30,3%, respectivamente.

Sitepu et al., (2013) observou um aumento de ácidos graxos, com a privação de nitrogênio e maior tempo de incubação, indicando que cada linhagem de levedura poderia exibir um comportamento particular sobre a composição dos ácidos graxos.

#### 4. CONCLUSÕES

*Candida glabrata* (UCP 1002 e 1556) demonstrou ser um micro-organismo capaz de assimilar e metabolizar os nutrientes dos resíduos agroindustriais, milhocina e o soro de leite como fonte de carbono e nitrogênio, e produzir biotecnologicamente biomassa e lipídeos. Esta produção foi evidenciada com os melhores resultados obtidos no meio de produção em comparação com o meio sintético. Destacando que a linhagem de *C. glabrata* (UCP 1556) obteve valores para lipídeos acima de 20%, sendo considerada uma espécie oleaginosa.

A produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) pela *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) foi promissora para a obtenção de:  $\alpha$ -ácido linôlenico ( $\omega$ 3) e  $\gamma$ -ácido linolênico ( $\omega$ 6), destacando que a produção do  $\alpha$ -ácido linôlenico ( $\omega$ 3) nas duas linhagens atingiram valores acima de 75%.

#### AGRADECIMENTOS

A pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (308245/2010-5), e pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE (APQ NO.1331-2.12/10). Os autores agradecem à CAPES pela bolsa de doutorado e também a Universidade Católica de Pernambuco pelo uso dos laboratórios.

#### 5. REFERÊNCIAS

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.H.; JOUVE, C.M.; NICAUD, J.M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 48, p. 375–387, 2009.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 1193-1206, 2011.

CASTANHA, R.F. **Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas**. 2012. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” de Piracicaba, São Paulo, Brasil.

CAZETTA, M.L.; CELLIGOI, M.A.P.C. Estudo de diferentes combinações de melaço/vinhaça como substrato para produção de proteínas e lipídios por micro-organismos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 27, n. 1, p. 3-10, 2006.

DAUDT, R.M.; EMANUELLI, J.; KULLA, P.; GUERRERO, I.C.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 28-31, 2013.

DELABIO, A.S.; REMÉDIO, R.R.; CAZASSA, S.; MONTEIRO, R.T.R.; HARDER, M.N.C. Seleção de leveduras para a produção de lipídios como matéria-prima para biodiesel. **Bioenergia em revista: diálogos**, n. 2, p. 26-38, 2012.

DUARTE, S.H.; ANSOLIN, M.; MAUGERI, F. Cultivation of *Candida* sp. LEB-M3 in glycerol: Lipid accumulation and prediction of biodiesel quality parameters. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 416-422, 2014.

DURHAM, D.R.; KLOOS, W.E. Comparative study of the total cellular fatty acid of *Staphylococcus specieis* of human origin. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 28, p. 223-228. 1978.

FARIA, M.A.O. **Produção de carotenóides por *Rhodotorula rubra* em melaço suplementado com cátions bivalentes**. 2008. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

HARDER, M.N.C.; DELABIO, A.S.; CAZASSEA, S.; REMEDIO, R.R.; PIRES, J.A.; MONTEIRO, T.R.R.; ARTHUR, V. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* for biofuels. **Materials processes for energy: communicating current research and technological developments**, Ed. A. Méndez-Vilas, p. 274-278, 2014.

JAVIER, P.B.F; ANTONIO, N.R.J. Análisis de Clases de Lípidos por Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución. **Invurnus**, v. 6, n. 2, p. 38-43, 2011.

JUSZCZYK, P.; TOMASZEWSKA, L.; KITA, A.; RYMOWICZ, W. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. **Bioresour. Technol.**, v. 137, p. 124-131, 2013.

MANOCHA, M. S., SAN- BLAS. G., Centeno. S. Lipid composition of paraccidioids brasilienses: Possible correlation witer virulence of different strains. **Journal of General Microbioly**, v. 177, p. 147-154, 1980.

MENG. X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

NATORI, Y; NAGASAKI T; KOBAYASHI, A; FUKAWA, H. Production of coenzyme Q<sub>10</sub> by *Pseudomonas* N842. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, p.1799–1800, 1978.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKASB, S.; FICKA, M.; CHEVALOTA, I.; GALIOTOU-PANAYOYOUNB, M.; KOMAITISH, M.; MARCA, I.; AGGÉLIS, 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, n. 1, p. 60-71, 2008.

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de Resíduos Agro-industriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 1, n. 2, p.118-127, 2007.

PIROZZI, D.; AUSIELLO, A.A.; ZUCCARO, G. SANNINO, F.; YOUSUF. Culture of Oleaginous Yeasts in Dairy Industry Wastewaters to Obtain Lipids Suitable for the Production of II-Generation Biodiesel. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 7, n. 4, p. 53-57, 2013.

PIRT, S.J. **Principles of microbe and cell cultivation**. Blackwell Scientific press, Londres. 284p, 1982.

POLI, J.S. **Otimização da produção e caracterização do óleo microbiano produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica* QU21**. 2014. Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Porto Alegre, Brasil.

RASCHKE, D.; KNORR, D. Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in the oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, p. 178–183, 2009.

RATLEDGE, C.; WYNN, J.P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 51 , p.1-51, 2002.

ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMOND, S.; LEONARD, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. **Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies**, Ed. Dr. Margarita Stoytcheva, p. 71-92, 2011.

SITEPU, I.R.; SESTRICC, R.; IGNATIAA, L.; LEVINIC, D.; GERMANA, J.B.; GILLIESD, L.A.; ALMADAA, A.G.; BOUNDY-MILLSA, K.L. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 360–369, 2013.

SOUZA, K.S.; SCWAN, R.F. DIAS, D.R. Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 497-506, 2014.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

---

- *Candida glabrata* (UCP 1556) apresentou potencial biotecnológico para produzir biomoléculas como biossurfactante, coenzima Q<sub>10</sub> e  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 em meio otimizado a base resíduos agroindustriais (milhocina e soro de leite) como fontes de carbono e nitrogênio, proporcionando uma produção de baixo custo econômico e redução dos impactos ambientais;
- O biossurfactante aniônico produzido por *C. glabrata* (UCP 1556) possui composição lipoproteica, baixa CMC, é eficiente na formação de emulsões estáveis e possui capacidade de reduzir a viscosidade de substratos hidrofóbicos;
- A coenzima Q<sub>10</sub> produzida pela *Candida glabrata* (UCP 1556) possui elevado poder antioxidante e baixa atividade citotóxica;
- A *Candida glabrata* (UCP 1556) demonstrou ser uma levedura oleaginosa pelo comprovado teor de lipídeos em sua composição;
- *C. glabrata* (UCP 1002 e 1556) apresentou promissora produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), os  $\alpha$ -ácido linolênico ( $\omega$ 3) e  $\gamma$ -ácido linolênico ( $\omega$ 6), destacando que a produção do  $\alpha$ -ácido linolênico ( $\omega$ 3) nas duas linhagens atingiram valores acima de 75%;
- *C. glabrata* (1002 e 1556) demonstrou ser um micro-organismo capaz de assimilar e metabolizar os nutrientes dos resíduos agroindustriais promovendo a produção biotecnológica de insumos de elevado valor industrial.

## 6. ANEXOS

---

### Trabalhos publicados durante o doutorado:

ANDRADE, R.F.S.; FRANCO, L.O.; **LIMA, R.A.**; ANTUNES, A.A.; ARAÚJO, H.W.C.; TAKAKI, G.M.C. Avaliação das diferentes concentrações de soro de leite e milhocina na produção de biossurfactante por *Candida glabrata* UCP (1556). In: 26 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. 26 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.

ANDRADE, R.F.S.; **LIMA, R.A.**; ANTUNES, A.A. ; ARAÚJO, H.W.C ; JARA, A. M. T.; FRANCO, L.O.; TAKAKI, G.M.C. Application of polymeric biosurfactant produced by *Candida glabrata* for bioremediation of soil contaminated by hydrophobic pollutant. In: IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2011), 2011, Torremolinos. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2011. p. 541-541.

**LIMA, R.A.**; ANDRADE, R. F. S.; ANTUNES, A. A. ; ARAÚJO, H.W.C ; JARA, A. M.T.; BERGUER, L.R.; TAKAKI, G.M.C. Biosurfactants productions by *Candida glabrata* strains using industrial wastes as carbon and nitrogen sources. In: IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2011, Torremolinos. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2011. p. 304-304.

**LIMA, R.A.**; ANDRADE, R.F.S.; ANTUNES, A.A.; TAKAKI, G.M.C.; SALGUEIRO, A.A. Otimização do crescimento microbiano em um consórcio microbiano apartir da manipueira. In: 26 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do iguaçu. 26 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.

ANDRADE, R.F.S.; **LIMA, R.A.**; SANTOS, Y.M.F.; MESSIAS, G.P.; JARA, A.M.T.; ARAÚJO, H.W.C.; PESSOA, A.; TAKAKI, G.M.C. Seleção da produção simultânea de biossurfactante e carotenóides por *Rhodotorula glutinis* em emio de baixo custo. In:

XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.

GOMES, M.D.P.; LIMA, J.M.N.; SILVA, G.K.B.; **LIMA, R.A.**; ANDRADE, R.F. S.; TAKAKI, G.M.C. Identificação e caracterização de *Cunninghamella echinulata* em meios de cultura convencional e alternativo. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.

LIMA, R.A ; **ANDRADE, R. F. S.** ; ANTUNES, A. A.; ARAÚJO, H.W.C ; JARA, A. M. T.; BERGUER, L.R. ; TAKAKI, G. M. C. Biosurfactants production by *Candida glabrata* strains using industrial wastes as carbon and nitrogen sources. Microbes In Applied Research. 14ed.: , 2012, v. , p. 362-366.

**LIMA, R.A.**; ANDRADE, R.F.S.; SILVA, G.K.B.; MESSIAS, G.P.; SANTOS, Y.M.F.; SALGUEIRO, A.A.; TAKAKI, G.M.C. Produção de biossurfactante por *Candida glabrata*. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.

ANDRADE, R.F.S.; RIBEIRO, D.L. ; RODRIGUEZ, D.M.; **LIMA, R.A.**; ARAÚJO, H.W.C.; PESSOA, A.; TAKAKI, G.M.C. Avaliação do potencial de *Rhodotorula glutinis* UCP/WFCC1555 na degradação do biodiesel e gasolina usando 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP). In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.

ANDRADE, R.F.S.; RODRIGUEZ, D. M. ; RIBEIRO, D. L. ; **LIMA, R.A.** ; ARAÚJO, H.W.C.; PESSOA, A.; TAKAKI, G.M.C. Production of surface active agent and biodegradation fuel by acclimated *Rhodotorula glutinis* UCP/WFCC 1555 on diesel oil. In: V International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology, 2013, Madrid. Biomicroworld 2013, 2013. p. 640.

**LIMA, R.A** ; ANDRADE, R. F. S. ; RODRIGUEZ, D. M.; RIBEIRO, D. L.; JARA, A. M. T. ; ARAÚJO, H.W.C ; TAKAKI, G.M.C. Simultaneous production of biosurfactant and omega 3 and 6 by *Candida glabrata* (UCP 1556) from industrial waste. In: V

International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology, 2013, Madrid. Biomicroworld 2013, p. 381, 2013.

**LIMA, R.A.**; ANDRADE, R.F.S.; RIBEIRO, D.L.; RODRIGUEZ, D.M.; SALGUEIRO, A.A.; TAKAKI, G.M.C. Avaliação do efeito do biossurfactante produzido por *Candida glabrata* (UCP 1556) na viscosidade de substratos hidrofóbicos para uso em cosméticos. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013

RIBEIRO, D. L. ; RODRIGUEZ, D.M. ; ANDRADE, R. F. S.; **LIMA, R.A.**; ARAÚJO, H.W.C.; TAKAKI, G.M.C.; PALHA, M.L.A.P.F . Avaliação do potencial da *Pseudomonas aeruginosa* em degradar os combustíveis: diesel, biodiesel, gasolina e querosene. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.

RIBEIRO, D.L.; RODRIGUEZ, D.M. ;ANDRADE, R.F.S.; **LIMA, R.A.**; TAKAKI, G. M.C.; PALHA, M.L.A.P.F. Degradation of fuels by *Pseudomonas aeruginosa* UCP/WFCC 0099 wild and acclimated on diesel. In: V International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology, 2013, Madrid. Biomicroworld 2013, p. 609, 2013.

RODRIGUEZ, D. M. ; ANDRADE, R. F. S. ; RIBEIRO, D.L.; **LIMA, R.A.**; ARAÚJO, H.W.C.; TAKAKI, G.M.C. Ability of *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 for biosurfactant production using industrial wastes and fuels biodegradation. In: V International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology, 2013, Madrid. Biomicroworld 2013, p. 589, 2013.

RODRIGUEZ, D.M.; ANDRADE, R. F. S.; RIBEIRO, D.L.; **LIMA, R.A.**; ARAÚJO, H.W.C ; TAKAKI, G. M. C. Biodegradação dos combustíveis diesel, biodiesel, gasolina e querosene por *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.

SILVA, B.W.; SANTOS, R.D.L.; RIBEIRO, M. A.; ANDRADE, R.F.S.; **LIMA, R.A.**; TAKAKI, G.M.C. Production of lipid by *Candida lipolytica* UCP/WFCC 0988 using whey and corn steep liquor. In: VI Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2013, Rio Claro- SP. VI Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2013.

ANDRADE, R. F. S.; RODRIGUEZ, D. M.; RIBEIRO, D. L.; **LIMA, R.A.**; ARAÚJO, H.W.C.; PESSOA, A.; TAKAKI, G.M.C. Production of surface active agent and biodegradation fuel by acclimated *Rhodotorula glutinis* UCP/WFCC 1555 on diesel oil. In: A. Méndez-Vilas. (Org.). "Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: current status and trends". 14ed.: Wageningen Academic Publishers, 2014, p. 205-210, 2014.

RIBEIRO, D. L.; RODRIGUEZ, D. M.; ANDRADE, R. F. S.; **LIMA, R.A.**; TAKAKI, G.M.C.; PALHA, M.L.A.P.F. Degradation of fuels by *Pseudomonas aeruginosa* UCP/WFCC 0099 wild and acclimated on diesel'. 'Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: current status and trends'. 14ed., v. , p. 220-225, 2014.

GOMES, M.D.D.P.; LIMA, J. M. N.; SILVA, G.K.B.; OLIVEIRA, R.; CORDEIRO, C. S.; **LIMA, R.A.**; SOUSA, P.; SILVA, C.A.A.; TAKAKI, G.M.C. Effect of Different Concentrations of Banana Flour and Corn Steep Liquor on the Radial Growth of *Cunninghamella echinulata* Using Factorial Design. Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: current status and trends. 5ed. Madrid: Wageningen Academic Publishers, 2014, p. 200-205.

**LIMA, R. A.**; ANDRADE, R.F.S.; ARAÚJO, H.W.C.; SILVA, G.K.B.; JARA, M.A.T.; TAKAKI, G.M.C. Agroindustrial Wastes as Unconventional Substrates for Growing a strain of *Candida glabrata* and producing a Lipopeptide Biosurfactant. In: 20th International Symposium on Surfactants in Solution, 2014, Coimbra. 20th International Symposium on Surfactants in Solution, 2014. v. 20.