



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA NOVA
LINHAGEM DE *Candida tropicalis* ISOLADA DE
SEDIMENTOS DE MANGUE NA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE

DAYLIN RUBIO RIBEAUX

Recife, 2016

DAYLIN RUBIO RIBEAUX

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA NOVA
LINHAGEM DE *Candida tropicalis* ISOLADA DE
SEDIMENTOS DE MANGUE NA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Microbiologia
Aplicada

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Recife, 2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ribeaux, Daylin Rubio

Potencial biotecnológico da nova linhagem de *Candida tropicalis* isolada de sedimentos de mangue na produção de biossurfactante / Daylin Rubio Ribeaux. – Recife: O Autor, 2016.

73 f.: il.

Orientador: Galba Maria de Campos Takaki

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Agentes ativos de superfícies 2. Fungos I. Takaki, Galba Maria de Campos (orient.) II. Título.

668.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-205

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

DAYLIN RUBIO RIBEAUX

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA NOVA LINHAGEM DE *Candida tropicalis* ISOLADA DE
SEDIMENTOS DE MANGUE NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE**

APROVADO EM: 23/2/2016

Examinadores:

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

Prof^a. Dr^a Celuta Sales Alviano
Universidade Federal de Rio de Janeiro – UFRJ/RJ

Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal de Rural de Pernambuco – UFRPE/PE

Suplentes:

Prof^a. Dr^a. Ana Lucia Porto Figueiredo
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE/PE

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

*Dedico a mi madre Adela, porque sin estar,
está siempre conmigo...*

A mi familia por todo su amor y apoyo...

A mis amigos, los de ahora y los de siempre...

A mi tierra, Cuba,

*por el sentimiento eterno y el orgullo de ser
cubana.*

Quero crescer com dignidade e respeito, cumprindo os meus afazeres com dedicação com o próximo. Dê-me coragem para prosseguir, esperança para continuar sonhando e certeza de que, a través do meu trabalho, poderei fazer com que ao menos um pedacinho do mundo se transforme num lugar melhor para se viver. Amém.

Anônimo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo constante fortalecimento em todos os momentos;

A minha mãe Adela Ribeaux Casero porque sem estar está sempre, ao meu pai Pedro Francisco Rubio Martell pela confiança, carinho e incentivo. Aos meus irmãos Gisselle e Yaser Rubio Ribeaux, minha avó Esperanza Martell Sastre, os meus sobrinhos Naeobee e Reymir, a Fe Romero e Misedys por serem minha família e estarem sempre para mim em todo momento;

Á Prof^a Dr^a Galba Takaki, pela valiosa oportunidade que me concedeu, ao aceitar ser minha orientadora, pelas condições de trabalho que me proporcionou e, sobretudo pelos conhecimentos científicos transmitidos.

Á Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, o que muito contribuiu para minha formação;

Á minhas amigas Dayana Montero Rodríguez e Rosileide Fontenele de Andrade da Silva pela amizade, pela força em todo momento, pelas risadas, pela paciência, pelo carinho, pelo incentivo, por acreditar em mim, por tudo.

Aos meus amigos do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais Déborah de Souza, Davi Cavalcanti, Marcos Luna, Milagre Phele pelo companheirismo, a amizade e pelos bons momentos vividos;

Á Yelina e Dolores pelo apoio e paciência;

Á Profa. Goretti Sônia pelo apoio com as coletas das amostras de sedimento;

Ao Prof. Dr. Sergio Carvalho de Paiva, Pammello Barros, Adailton Santos, Caio Ribeiro, Francisco e Dilma pelo carinho e o apoio prestado durante a realização das análises de solos;

Á Prof^a Dr^a Maria Resende e O Doutor Rodrigo Holanda do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela colaboração para identificação da levedura utilizada neste trabalho;

Á Dr^a Glaúzia Manoella, ao Doutor Luca e José Diogo pelas contribuições prestadas para identificação molecular da levedura isolada;

A todos os Colegas do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pela atenção e apoio, em especial a Hamilton Nóbrega, Carlos Vilar, Adriana Souza, Hugo Galindo pelo apoio e companheirismo;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pelos conhecimentos transmitidos no decorrer do curso;

A Levi Cavalcanti e Isabelle Fontenele pela ajuda com a dissertação;

Aos funcionários do Núcleo Sônia Maria de Souza, Severino Humberto de Almeida pela atenção e apoio e em especial a André Felipe pela amizade;

Á Secretária do Centro de Ciências Biológicas Adenilda Eugênia de Lima e os funcionários Marcelo Miguel e Cleyton de Lira Silva por toda atenção e carinho;

Aos funcionários da Universidade Católica de Pernambuco;

Á Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa para realização do intercâmbio com a UNICAP;

A todos que os forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho;

Obrigada!!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPITULO 1.....	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivo Específicos.....	12
3. REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1 Manguetais	13
3.2 Leveduras do Gênero <i>Candida</i>.....	13
3.3 Aplicação biotecnológica de leveduras do Gênero <i>Candida</i>.....	14
3.4 Surfactantes.....	14
3.5 Biosurfactantes.....	15
3.5.1 Classificação e microorganismos produtores	16
3.5.2 Propriedades físico-químicas dos biosurfactantes.....	17
3.5.3 Vantagens da utilização dos biosurfactantes em relação aos sintéticos	19
3.5.4 Principais aplicações dos biosurfactantes.....	19
3.5.4.1 Aplicação na agricultura	20
3.5.4.2 Aplicação na indústria dos cosméticos.....	20
3.5.4.3 Aplicação na indústria dos alimentos.....	20
3.5.4.4 Aplicação na medicina.....	21
3.5.5 Aplicação de biosurfactantes na biorremediação de hidrocarbonetos.....	21
3.6 Utilização de substratos alternativos na produção de biosurfactantes.....	23
3.6.1 Manipueira	24
3.6.2 Óleo pós-fritura.....	25
3.6.3 Soro de leite	26
REFERÊNCIAS.....	26
CAPITULO 2.....	37
Biotechnological production of biosurfactant in economic medium by <i>Candida</i>.....	37
1. Introduction.....	39
2. Materials and Methods.....	39

3. Results and Discussion.....	40
4. Conclusions	44
References	44
CAPÍTULO 3	45
Physicochemical and functional characterization of biosurfactant produced by a new <i>Candida tropicalis</i> isolated from mangrove sediment in Northeast of Brazil	45
4CONCLUSÕES GERAIS	70
5. ANEXOS.....	71

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Acumulação do biossurfactante na superfície entre um líquido e o ar	15
Figura 2. Efeito do biossurfactante na tensão superficial.....	17
Figura 3. Efeito da concentração do biossurfactante na tensão superficial. a, b, c mostram a posição dos surfactantes na interfase e na formação das micelas na medida que aumenta do surfactante	18

CAPÍTULO 2

Fig. 1 Pareto Chart of standardized effects for surface tension of the cell-free broth from <i>Candida</i> sp. after 96 hours of cultivation for the 2 ³ full factorial design. The point at which the effect estimates were statistically significant (at p = 0.05) is indicated by the broken vertical line.	41
Fig. 2 Emulsification index (E24) of the biosurfactant produced by <i>Candida</i> sp. in medium consisting in 3% of whey, 7% of cassava wastewater and 10% of soy post frying oil.....	42
Fig. 3 Test of fuels biodegradation by <i>Candida</i> sp. acclimatized to 30% diesel, using the redox indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol: (A) control, (B) degradation of diesel, (C) degradation of biodiesel, (D) degradation of engine burned oil and (E) degradation of kerosene.....	43
Fig. 4. Potential of fuels biodegradation (%) of <i>Candida</i> sp. acclimatized on 30% diesel after incubation for 30 days.	43

CAPÍTULO 3

Figure 1. Colonies of yeast strain <i>Candida</i> sp. on Yeast Mold Agar medium (A) and observation at optic microscopy (40X) (B).....	65
Figure 2. Growth, surface tension and yield of biosurfactant isolated from <i>C. tropicalis</i> cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil.....	66
Figure 3. Surface tension versus concentration of the biosurfactant isolated from <i>C. tropicalis</i> cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil.	67
Figure 4. Stability of surface tension of biosurfactant produced by <i>Candida tropicalis</i> using whey, cassava wastewater and soybean post frying oil. Influence of temperature (A), pH (B) and sodium chloride concentrations (C) on surface tension stability.	68
Figure 5. Oil displacement activity of crude biosurfactant produced by <i>C. tropicalis</i> . Motor oil droplet without application of surfactant (A), after dispersion with synthetic surfactant (B) and after dispersion with crude biosurfactant produced by <i>C. tropicalis</i> (C).	69

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1- Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos produtores	16
Tabela 2- Biossurfactantes, micro-organismos produtores e aplicações na biorremediação de ecossistemas contaminados com petróleo.....	23
Tabela 3- Composição química média da manipueira	25

CAPÍTULO 2

Table 1- Surface tension values obtained in the 2 ³ full factorial design used for biosurfactant production by <i>Candida sp.</i> at 28 °C and 150 rpm during 96 hours.	41
---	----

CAPÍTULO 3

Table 1. FTIR spectrum of extracted biosurfactant produced from <i>C. tropicalis</i> using whey, cassava wastewater and soybean post frying oil.	62
Table 2. Phytotoxicity of biosurfactant isolated from <i>C. tropicalis</i> cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil against <i>Brassica oleracea</i> . Experiments were performed in duplicate and the results represent means ± standard deviations of the two independent experiments.	63
Table 3. Phytotoxicity of biosurfactant isolated from <i>C. tropicalis</i> cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil against <i>Lactuca sativa</i> L. Experiments were performed in duplicate and the results represent means ± standard deviations of the two independent experiments.	63
Table 4. Phytotoxicity of biosurfactant isolated from <i>C. tropicalis</i> cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil against <i>Solanum lycopersicum</i> . Experiments were performed in duplicate and the results represent means ± standard deviations of the two independent experiments.	63
Table 5 - Antimicrobial activity of the biosurfactant produced by <i>Candida tropicalis</i>	64

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas produzidas por micro-organismos e possuem importância recentemente devido às várias e importantes aplicações industriais e ambientais. Estes compostos possuem vantagens como biodegradabilidade, produção a partir de fontes renováveis além de funcionalidade sobre condições extremas de pH, salinidade e temperatura. Entretanto, a sua utilização na indústria depende da redução do custo associado a sua produção, sendo uma possível estratégia o uso de fontes renováveis como os resíduos agro-industriais. Neste sentido, a linhagem de *Candida tropicalis* demonstrou habilidade para converter resíduos agro-industriais (soro de leite, manipueira e óleo de soja pós-fritura) em meio de produção de biossurfactante empregando um planejamento fatorial 2^3 . A seleção da melhor condição do planejamento foi avaliada utilizando como variável resposta tensão superficial. Desta forma, o melhor resultado foi obtido no meio basal (3% de soro de leite, 7% de manipueira e 10% óleo de soja pós-fritura), observando-se uma redução da tensão superficial da água de 72 para 30,8 mN/m. Ao mesmo tempo, a degradação de petroderivados foi avaliada no meio Bushnell Haas, com o indicador redox 2,6-diclorofenol – indofenol e com a linhagem selvagem aclimatada em óleo diesel a 30%. Os resultados obtidos evidenciaram que a levedura aclimatada apresentou o melhor resultado para o diesel com 98% de degradação. Em seguida, a linhagem foi identificada molecularmente como *Candida tropicalis*. Desse modo foi realizado um perfil de crescimento e produção do biossurfactante durante 96 horas de cultivo a 150 rpm, com redução da tensão superficial do meio de 70 mN/m para 28,9 mN/m. O biossurfactante produzido demonstrou estabilidade em condições extremas de pH (2- 12), temperatura (4, 70, 100 e 120°C) e concentração salina (2-10%). O rendimento do biossurfactante isolado foi de 3,9 g/L, com uma concentração micelar crítica de 1,5%. Além disso, o novo biossurfactante foi caracterizado como polimérico (51% de proteínas, 37% de lípidos e 11 % de carboidratos), apresentando uma atividade antimicrobiana para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* sp. *Salmonella* sp. UCP 6017, *Serratia marcescens* UCP 1549, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus licheniformis* UCP 1013, e a levedura *Candida albicans*. Ao mesmo tempo, o biossurfactante demonstrou não ser tóxico quando testado em sementes de *Brassica oleracea*, *Lactuca sativa* L., *Solanum lycopersicum*. Os resultados obtidos confirmaram o elevado potencial biotecnológico da *Candida tropicalis* na biotransformação de rejeitos agroindustriais na produção de um novo biossurfactante, indicando uma diversidade de aplicações em processos biotecnológicos (biorremediação com poluentes hidrofóbicos), como também para a saúde atuando contra bactérias Gram positivas e negativas, além da levedura oportunista *C. albicans*.

Palavras chaves: Biossurfactante. *Candida tropicalis*. Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic molecules produced by microorganisms and have been gaining importance recently due to several important industrial and environmental applications. These compounds have advantages such as biodegradability; production from renewable sources other feature under extreme conditions of pH, salinity and temperature. However, its use in the industry depends on reducing the cost associated with its production, being one possible strategy the use of renewable sources such as agro-industrial waste. Therefore, *Candida tropicalis* demonstrated ability to convert agro-industrial waste (whey, cassava wastewater and post-fry soy oil) in biosurfactant production medium employing a factorial design 2^3 . The selection of the best condition of the planning was assessed using as variable surface tension response. Thus, the best result was obtained in basal medium (3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean oil post-frying), observing a reduction of the surface tension of water from 72 to 30.8 mN/m. At the same time, petro derivatives degradation was evaluated in the middle Bushnell Haas, redox indicator with 2,6-dichlorophenol - indophenol and the wild type strain acclimatized for diesel fuel to 30%. The results showed that the acclimatized yeast showed the best result for the diesel with 98% degradation. Then, the strain was identified as *Candida tropicalis* molecularly. Thus, it performed a growth profile and production of the biosurfactant for 96 hours of cultivation at 150 rpm, reducing the surface tension from 70 mN/m to 28,9 mN/m. The produced biosurfactant showed stability in extremes conditions of pH (2-12), temperature (4, 70, 100 and 120°C) and salt concentrations (2-10%). The yield of isolated biosurfactant was 3.9 g/L, with a critical micelle concentration of 1.5%. Furthermore, the new biosurfactant was characterized as a polymeric (51% protein, 37% lipid and 11% carbohydrate), having an antimicrobial activity for *Pseudomonas aeruginosa* sp. *Salmonella* sp. UCP 6017, *Serratia marcescens* UCP 1549, *Eschericia coli*, *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus licheniformis* UCP 1013, and the yeast *Candida albicans*. At the same time, the biosurfactant was not toxic when tested in *Brassica oleracea*, *Lactuca sativa* L., *Solanum lycopersicum*. The results confirmed the high biotechnological potential of *Candida tropicalis* in the biotransformation of agro-industrial wastes for the production of a new biosurfactant indicating a variety of applications in biotechnology processes (bioremediation with hydrophobic pollutants) as well health acting against positive and Gram negative bacteria, as well as opportunistic yeast *C.albicans*.

Key words: Biosurfactant. *Candida tropicalis*. Agro-industrial waste.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas de transição entre ambientes terrestres e marinhos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (THATOI et al., 2013). Eles contribuem com a filtragem de água e são vitais exportadores de matéria orgânica para os estuários e formações costeiras. Além disso, são refúgios de vida silvestre e de animais terrestres, além de serem berçários para numerosos organismos aquáticos (GODOY e LACERDA, 2015). Igualmente, uma grande diversidade de micro-organismos também tem sido informada nestes ecossistemas (SOSOVELE e HOSEA, 2013; THATOI et al., 2013). Especificamente os fungos são importantes produtores de metabolitos secundários como, por exemplo: antibióticos, alcalóides, flavonóides, quinonas, esteróis, biossurfactantes e outros, com ampla aplicabilidade em diversos setores da indústria. Dai que tem aumentado recentemente o interesse dos pesquisadores para isolar e estudar novas linhagens com potencial biotecnológico (IMOFF, 2016; BALASUBRAMANIAN e SHANMUGASUNDARAM, 2016).

Por outro lado, os surfactantes microbianos são compostos versáteis que apresentam uma excelente capacidade para reduzir as tensões superficial e interfacial entre diferentes fases (líquido-ar, líquido-líquido e líquido-sólido), além de apresentarem baixa Concentração Micelar Crítica (CMC) e formar emulsões estáveis (SOUZA et al., 2014). De outro lado, a estabilidade em condições ambientais adversas, a baixa toxicidade, a biodegradabilidade, além da compatibilidade com o ambiente, oferece vantagens a estes compostos sobre seus similares sintéticos (SILVA et al., 2015).

Neste sentido, a produção em grande escala destes compostos ainda é limitada pelo alto custo devido, em parte, ao valor dos meios de cultura (LUNA et al., 2011). Estratégias de reaproveitamento de resíduos gerados por indústrias de alimentos vêm sendo adotadas como uma alternativa viável de fontes nutricionais para a biossíntese de biossurfactantes. Sendo assim, a possibilidade de reutilizar estes resíduos permite minimizar a poluição causada pelo descarte no meio ambiente, além de acrescentar valor aos resíduos do descarte (CERQUEIRA e COSTA, 2009; BANAT et al., 2014; RUFINO et al., 2014).

Neste contexto, a maioria das pesquisas científicas atuais relacionadas com a produção de biossurfactantes utilizam bactérias (MARIM et al., 2015; SILVA et al., 2015). Porém, as leveduras são conhecidas pela produção de biossurfactantes em grande escala quando comparadas com as bactérias. Desse modo, leveduras do gênero *Candida* têm sido exploradas com sucesso na obtenção destes metabólitos com elevado interesse industrial (RUFINO et al., 2014).

Dentre as diversas aplicações dos biossurfactantes, sua utilização na área da biorremediação tem sido amplamente explorada devido a que a contaminação ambiental causada pelos derramamentos de petróleo e seus derivados constitui um dos principais problemas da sociedade contemporânea (BENTO et al., 2008; ŁAWNICZAK et al., 2013). Considerando o desenvolvimento de técnicas que objetivam a descontaminação das regiões impactadas, estratégias baseadas em métodos físicos, químicos e biológicos, vêm sendo desenvolvidas. Desse modo, o uso de surfactantes microbianos como compostos que auxiliam a biodegradação de hidrocarbonetos ganha especial destaque por ser uma alternativa viável e promissora para o tratamento desses ambientes impactados por petróleo e seus derivados (MADIGAN et al., 2000; MULLIGAN, 2009; AYED et al., 2015).

Ao mesmo tempo, os biossurfactantes não só são úteis como agentes antibacterianos, antifúngicos e agentes antivirais. Além disso, estes compostos têm o potencial para serem usados como revestimentos anti-adesivos biológicos para biomateriais, reduzindo assim as infecções hospitalares e o uso de drogas sintéticas e produtos químicos. Eles também podem ser incorporados em preparações probióticas para combater infecções do trato urogenital e pulmonar (PRASAD et al., 2015).

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo o isolamento de leveduras do gênero *Candida* isoladas a partir de sedimentos de mangue além de avaliar seu potencial biotecnológico na produção de biossurfactantes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Isolar e identificar leveduras do gênero *Candida* em sedimentos de mangue do Rio Formosos e avaliar o potencial biotecnológico na produção de biossurfactante.

2.2 Objetivo Específicos

- Realizar bioprospecção de leveduras em sedimentos de mangue;
- Investigar o potencial das leveduras do gênero *Candida* na produção de biossurfactantes;
- Realizar taxonomia polifásica para a identificação das leveduras do gênero *Candida* produtoras de biossurfactantes através de testes morfológicos, bioquímicos e moleculares;
- Avaliar o potencial de biodegradação de petroderivados pela linhagem selecionada aclimatada em diesel;
- Avaliar o potencial da levedura de produzir biossurfactantes utilizando como substratos resíduos agro-industriais (soro de leite, manipueira e óleo de soja pós-fritura);
- Selecionar as melhores condições para produção do biossurfactante através de planejamento fatorial completo;
- Isolar e caracterizar o biossurfactante;
- Validar os resultados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Manguezais

Os manguezais podem-se definir como ecossistemas costeiros de regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo que são encontrados nas zonas de transição entre a terra, mar e rios (GHIZELINI et al., 2012; BALASUBRAMANIAN e SHANMUGASUNDARAM, 2016). Ao contrário de outras florestas tropicais, os manguezais são compostos por um número relativamente pequeno de espécies de árvores e arbustos de plantas. Estas espécies vegetais são especialmente adaptadas à salinidade flutuante e possuem a capacidade de viver em sedimentos lodosos com baixa concentração de oxigênio (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000; GHIZELINI et al., 2012).

De outro lado, ao contrário da maioria dos solos, os sedimentos de mangue apresentam condições predominantemente anaeróbias. As frações finas (principalmente partículas de tamanho silte e argila) dominam sua textura combinada com altas concentrações de matéria orgânica e sais (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000; GHIZELINI et al., 2012). Este tipo de solos possui grande diversidade microbiana frequentemente encontrada em comunidades complexas chamados biofilmes, onde as diferentes espécies degradam a matéria orgânica (THATOI et al. 2013). No caso específico dos fungos, a sua ocorrência nestes ecossistemas é favorecida por condições de umidade, ambientes ricos em matéria orgânica, aeração e baixo pH entre outros fatores. Neste sentido, vários são os trabalhos que informam o isolamento de leveduras destes ambientes, sendo espécies do gênero *Candida* das mais identificadas (SILVA, 2002; AM-IN et al., 2011; JAMES et al., 2013).

3.2 Leveduras do Gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* são identificadas como 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 (AKPAN e MORGAN, 2002; BARROS, 2005). Geralmente, na forma de levedura apresentam células ovaladas ou alongadas, medindo em média 3 à 7 µm de largura por 3 à 14 µm de comprimento, com micélio em forma de pseudohifas ou podem formar hifas verdadeiras. Além disso, apresentam como características colônias úmidas, cremosas, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada (KUTZMAN e FELL, 2000; RODRIGUES, 2006). As espécies de *Candida* podem viver como sapróbias, comensais ou parasitas patogênicos aos humanos e animais. Entre elas podemos destacar *C. albicans*, *C. catenulada*, *C. dattila*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C.*

stelatoidea, *C. viswanathii*, *C. tropicalis* e *C. zeylanoides*. Um pequeno número delas é responsável pela maioria das infecções em humanos, pois em indivíduos imunologicamente saudáveis, os mecanismos de defesa do hospedeiro são suficientes para prevenir infecções por *Candida* (ALEXOPOULOS et al., 1996; PEREIRA, 2002).

3.3 Aplicação biotecnológica de leveduras do Gênero *Candida*

As leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces*, têm sido utilizadas desde os inícios da civilização em diversos processos biotecnológicos, que englobam, por exemplo, a produção de bebidas alcóolicas (cerveja, vinho, etc.) e produtos de panificação, entre outros (QUEROL e BOND, 2009). Porém, espécies de leveduras como *Candida* não têm sido referidas como micro-organismos com aplicação na fermentação industrial para a produção de bioetanol e outros compostos orgânicos úteis. Entretanto tem sido comprovado o alto potencial biotecnológico deste gênero devido à grande versatilidade metabólica. KATHIRESAN SARAVANAKUMAR (2011) e SENTHILRAJA et al. (2011) mostraram que espécies de *Candida* não são apenas agentes patogênicos, senão que podem ser ferramentas úteis para a produção de bioetanol. Desse modo, estes investigadores, obtiveram etanol a partir de *C. tropicalis* e *C. albicans* isoladas de ambiente marinho. Por outro lado, representantes deste gênero tem sido utilizados com sucesso na produção de biosurfactante, por exemplo: *C. glabrata* (LUNA et al., 2009), *C. bombicola* (KURTZMAN et al., 2010), *C. sphaerica* (LUNA et al., 2011), *C. lipolytica* (RUFINO et al., 2014) e *C. tropicalis* (VERMA et al. 2015).

3.4 Surfactantes

O termo surfactante deriva da expressão em inglês "surface active agents" (agentes de atividade superficial) por apresentarem atividade nas superfícies e interfaces dos líquidos (ROSEN e KUNJAPPU, 2012). Estes compostos possuem na sua estrutura química duas porções, uma região hidrofílica, usualmente chamada de cabeça, e a segunda região hidrofóbica, chamada de cauda (ROSEMBERG e RON, 2013; UZOIGWE et al., 2015) (Figura 1).

No caso da parte hidrofóbica ou região apolar geralmente é constituída por hidrocarbonetos (SABATINI et al., 2006), entre 10 e 20 átomos de carbono, que podem ser aromáticos ou alifáticos, lineares ou ramificados e carbonos reduzidos (CHU e CHAN, 2003).

O grupo hidrofóbico influencia na concentração micelar crítica (CMC), uma propriedade das moléculas tensoativas embora não seja o grupo que caracteriza o surfactante (BORDOLOI et al., 2008).

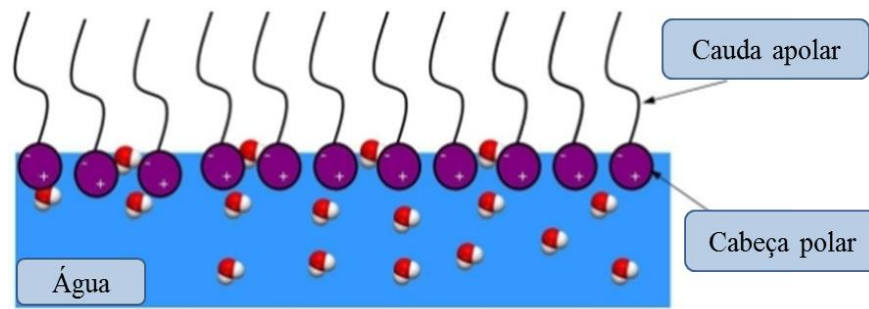


Figura 1. Acumulação do biossurfactante na superfície entre um líquido e o ar
(PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011)

Por outro lado, o grupo hidrofílico classifica-se como iônico (catiônico ou aniônico), não-iônico ou anfotérico (BANAT et al., 2000; ROSENBERG e RON, 2013). No caso dos grupos hidrofílicos catiônicos são constituídos por sais de amônio, enquanto os aniônicos possuem a parte hidrofílica constituída por grupo carboxilato, hidroxí, sulfato ou fosfato. Os surfactantes não iônicos contêm grupos sem carga e, nos surfactantes denominados anfotéricos, na mesma molécula grupos com uma carga negativa e uma positiva, dependendo do pH (AZARMI e ASHJARAN, 2015).

A grande maioria dos surfactantes que são comercializados é sintetizados a partir de derivados de petróleo (DESAI e BANAT, 1997; BANAT et al., 2010). Dessa forma, a crescente necessidade de preservação ambiental e as legislações de controle do ambiente têm levado os pesquisadores à procura por produtos naturais como alternativas aos produtos existentes. Nesse contexto, ganha especial destaque os surfactantes produzidos por micro-organismos, principalmente por bactérias e leveduras (CORTIS e GHEZZEHEI, 2007; CAMPOS et al., 2013).

3.5 Biossurfactanes

Biossurfactantes são compostos anfifílicos produzidos principalmente pelos micro-organismos (bactérias e fungos) de forma extracelular ou nas superfícies celulares (VIJAYAKUMAR e SARAVAN, 2015).

Estas moléculas são sintetizadas a partir de vários substratos tais como carboidratos, hidrocarbonetos, gorduras, óleos ou suas misturas, entre outros (SAHARAN et al., 2011; SHEKAR et al., 2015). Devido ao curto tempo de geração quando comparados ao crescimento de plantas e animais a produção microbiológica destes compostos é considerada promissora (BANAT et al., 2010).

Igualmente, estas moléculas são conhecidas por sua capacidade de se acumular entre interfaces com diferente grau de polaridade, o que reduz as forças de repulsão e permite a mistura das duas fases (LUNA et al., 2011; KAPADIA e YAGNIK, 2013).

3.5.1 Classificação e microorganismos produtores

Os surfactantes de origem microbiana podem variar de uma a outra espécie de micro-organismo ou inclusive no mesmo micro-organismo (NIE et al., 2010; JARA et al., 2013). Assim, estes compostos podem ser classificados de acordo com a sua natureza química e massa molecular. Dentre as principais classes podem-se citar glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (HARSHADA, 2014) (Tabela 1).

Tabela 1- Principais classes de biosurfactantes e micro-organismos produtores

Classe/Tipo de biosurfactante	Micro-organismo
Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trealolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Tapicola</i>
Soforolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus subtilis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-Lipídeo-Proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-Lipídeo-Proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
células	Várias bactérias

Fonte: DESAI e BANAT, 1997; SILVA et al., 2014a.

3.5.2 Propriedades físico-químicas dos biossurfactantes

Algumas das principais aplicações dos biossurfactantes encontram-se diretamente relacionadas com suas propriedades. Assim, estas biomoléculas tornam-se atrativas nas mais diversas áreas da indústria (SAHARAN et al., 2011; JAMAL et al., 2012; SARAFIN et al., 2014).

A tensão superficial pode ser definida como a força por unidade de comprimento ou de energia por unidade de área, que se origina a partir da diferença entre as forças intermoleculares que atuam na interface (fluido-fluido ou fluido- gás) (BOUROUIBA et al., 2014). Esta propriedade se manifesta em um líquido ao manter as moléculas unidas na sua superfície sendo uma consequência das forças intermoleculares. Dessa forma, cada molécula é atraída por outras moléculas em todas as direções do espaço no interior do líquido, enquanto que as moléculas superficiais só estão submetidas à tensão das moléculas que têm por baixo (DESAI e BANAT, 1997; HEWITT, 2002).

De acordo com a literatura a tensão superficial da água destilada é de 72 mN/m, e quando se adiciona um biossurfactante reduz-se esse valor. Sendo assim, as tensões nas faixas de 35 mN/m a 40 mN/m, indicam que o micro-organismo é promissor na produção destes compostos e abaixo de 35 mN/m, indica que o micro-organismo pode ser considerado um eficiente produtor (MULLIGAN, 2005; LUNA et al., 2011). Neste contexto, o comportamento do biossurfactante adicionado à água faz com que as suas moléculas se orientem de modo que se minimize 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 2). Dessa forma, se gera uma diminuição na tensão superficial da água ao provocar um desarranjo em sua superfície (APARNA et al., 2011).

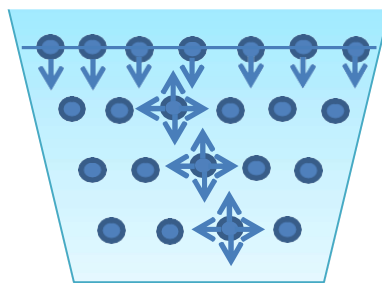


Figura 2. Efeito do biossurfactante na tensão superficial

A Concentração Micelar Crítica (CMC) refere-se à concentração mínima de biossurfactante requerida para atingir a menor tensão superficial. (SOUZA et al., 2008; SOBERÓN-CHÁVEZ e MAIER, 2011). Encontra-se diretamente relacionada com a tensão superficial e é uma medida da

eficiência do surfactante variando na faixa de concentrações de 1 a 2000 mg/L. A CMC confere propriedades de detergência e solubilização de compostos hidrofóbicos. Enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais as quais devem atingir valores em torno de 31 e 1 mN/m, respectivamente (MAKKAR et al., 2011).

As micelas são agregados de monômeros de surfactantes que a partir de uma determinada concentração (CMC) se associam. Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma monomérica (Figura 3). A intensidade de adsorção do biossurfactante à superfície depende de sua concentração ocasionando uma variação na ordenação destas moléculas sobre a superfície. Em concentrações muito baixas de biossurfactante, 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 (CHEN et al., 2011; SAHARAN et al., 2011).

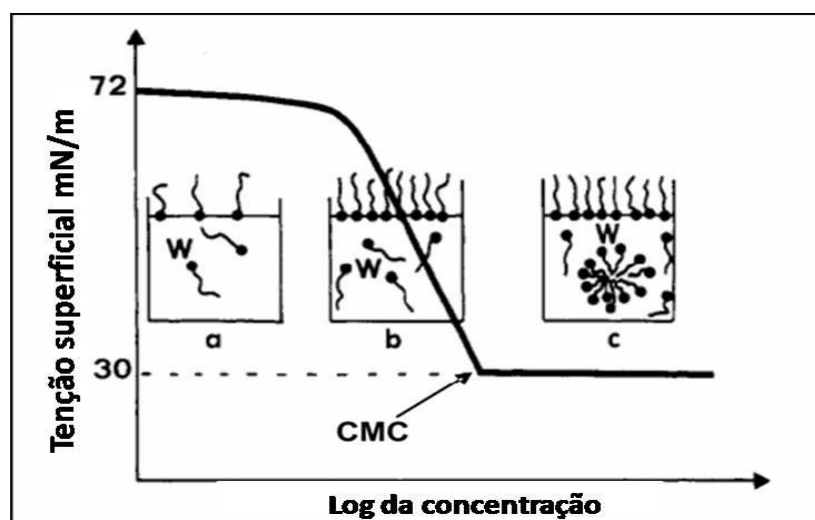


Figura 3. Efeito da concentração do biossurfactante na tensão superficial. a, b, c mostram a posição dos surfactantes na interfase e na formação das micelas na medida que aumenta do surfactante

(RAIGER e LÓPEZ, 2009).

De outro lado, a emulsificação se define como dispersão de um líquido em outro. Sendo assim, os surfactantes agem como moléculas que facilitam a formação de uma emulsão devido à capacidade de diminuir a tensão interfacial entre fases com diferente grau de polaridade. Desse modo aumenta a solubilidade de substratos insolúveis ou com pouca solubilidade (NITSCHKE e COSTA, 2007; LOPES et al., 2014).

As emulsões são muito instáveis e, portanto, não se formam espontaneamente, sendo necessário fornecer energia, tal como a agitação. Neste processo ocorre a formação de gotas microscópicas que variam em tamanho (0,1 e 100 nm de diâmetro). Quanto menor o diâmetro das

gotículas, mais estável a emulsão formada (NITSCHKE e PASTORE, 2002; LIMA et al., 2007). Esta propriedade faz dos surfactantes compostos atrativos para seu uso nas indústrias de cosméticos e alimentos (MUTHUSAMY et al., 2008; RUFINO et al., 2014).

3.5.3 Vantagens da utilização dos biossurfactantes em relação aos sintéticos

Apesar da diversidade dos biossurfactantes eles apresentam algumas características que são comuns à maioria destes compostos. Na atualidade, devido à preocupação pelo crescente deterioro ambiental a demanda de surfactantes obtidos a partir de fontes renováveis tem aumentado. Sendo assim, estes compostos tornam-se uma alternativa promissora para diversos setores da indústria, além de que representam uma vantagem sobre seus similares sintéticos (GUDIÑA et al., 2015). Neste contexto, podem-se mencionar como vantagens:

- Baixa toxicidade: os biossurfactantes exibem baixa toxicidade quando comparados com os surfactantes sintéticos. Assim, estes compostos têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação em relação aos efeitos alérgicos dos produtos artificiais, sendo permitidos em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (GEYS et al., 2014; REBELLO et al., 2014).

- Biodegradabilidade: o fato de serem produtos naturais faz com que possam ser facilmente biodegradados em ambientes aquáticos e terrestres, tornando-os adequados para aplicação na biorremediação e no tratamento de resíduos (FRANZETTI et al., 2012, SILVA et al., 2014a).

- Disponibilidade a partir de substratos de baixo custo: Os biossurfactantes podem ser produzidos utilizando matérias-primas muito baratas e o que tem sido demonstrado em vários estudos (MAKKAR et al., 2011; RUFINO et al., 2014).

- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: muitos dos biossurfactantes não perdem as suas propriedades quando submetidos a condições extremas de temperatura, pH e força iônica. Neste sentido, alguns deles podem suportar temperaturas de até 90°C e apresentam maior estabilidade térmica em condições extremas quando comparados aos sintéticos (MAX et al., 2012). De igual forma, possuem maior funcionalidade em valores extremos de pH, entre 5 e 12 por exemplo, e são potencialmente ativos quando submetidos a concentrações de 10% de NaCl, enquanto que 2-3% de sal são suficientes para inativar surfactantes convencionais (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; DAVISHI et al., 2011).

3.5.4 Principais aplicações dos biossurfactes

As diversas estruturas dos surfactantes microbianos conferir-lhes a capacidade de exibir desempenho versátil. Neste sentido, o mercado global de biossurfactantes teve ganhos estimados em

1,735.5 milhões de dólares no ano 2011 e se espera chegue aos 2,210.5 milhões de dólares no 2018 com 476,512.2 toneladas, segundo reportes da agência Transparency Market Research (2011).

3.5.4.1 Aplicação na agricultura

Os biossurfactantes são conhecidos por aumentar a biodisponibilidade para a biodegradação de compostos hidrofóbicos (LIU et al., 2010; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Por outro lado, tem sido demonstrada a aceleração da dessorção de poluentes hidrofóbicos fortemente ligados às partículas do solo, o que resulta muito importante para o processo de bioremediação. Além disto, estes compostos auxiliam na degradação de certos insecticidas químicos, os quais se acumulam no solo (ZHANG et al. 2011). De outro lado, os metais pesados, constituem micronutrientes essenciais e são requeridos para vários processos fisiológicos no metabolismo das plantas; porém, quando estão presentes nos solos acima dos níveis adequados causam contaminação. Neste sentido, existem reportes da potencialidade demonstrada por biossurfactantes obtidos a partir de *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp., and *Acinetobacter* sp. na remoção de metais pesados (KASSAB e ROANE 2006; PACWA-PLOCINICZAK et al. 2011; DIAZ et al., 2015). Outra aplicação dos surfactantes microbianos tem sido a de agentes inibidores de fitopatógenos. Assim, pesquisas utilizando ramnolipídeos confirmaram a inibição da formação de zoósporos que afetam plantas (HULTBERG et al. 2008). VATSA et al. 2010 mostraram no seu estudo que o mesmo tipo de biossurfactante pode estimular a imunidade da planta que é considerada como uma estratégia alternativa para reduzir a infecção por patógenos.

3.5.4.2 Aplicação na indústria dos cosméticos

Alguns biossurfactantes possuem ação de detergência e propriedade espumante, o que os tornam aplicáveis, em sabonetes líquidos e xampus (CAROLEI e GUTZ, 2005). Neste sentido, MORITA et al. (2013) mostraram a alta capacidade antioxidante de um tipo de ramnolipídeo quando comparado com um antioxidante sintético, sugerindo seu uso como produto antienvhecimento para o cuidado da pele. Determinados sofrólipídeos, ramínolipídeos e lipídeos manosileritrol apresentaram excelentes propriedades que favoreceram seu uso em loções, hidratantes de pele e produtos anti-rugas (LOURITH e KANLAYAVATTANAKULI, 2009).

3.5.4.3 Aplicação na indústria dos alimentos

Os surfactantes microbianos têm sido utilizados no processamento de alimentos com vários fins. Geralmente eles desempenham um papel como ingrediente alimentar na formulação de alimentos, além de ser estabilizantes de emulsões devido à sua capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial. Por outro lado, a capacidade antiadesiva dos biossurfactantes torna eles

ingredientes eficazes durante processo de fabricação de alimentos, especificamente na redução de contaminação por patógenos ou na remoção de micro-organismos aderidos (COSTA, 2010). Devido a sua habilidade para controlar a aglomeração de glóbulos de gordura têm sido utilizados em alimentos processados, tais como: creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos entre outros (SILVA, 2012).

3.5.4.4 Aplicação na medicina

Vários biosurfactantes têm forte atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral e podem desempenhar o papel de agentes anti-adesivos contra patógenos o que os torna úteis para o tratamento de muitas doenças, bem como a sua utilização como agentes terapêuticos e probióticos (GHARAEI- FATHABAD, 2011). Glicolípídeos do tipo lipídeos manosileritrol quando expostos a células PC 12 aumentaram a atividade da acetilcolina-esterase e interrompeu o ciclo celular na fase G1, com o consequente crescimento de neurites e diferenciação celular parcial, isto sugere o uso destes biosurfactantes no tratamento de células cancerígenas (KRISHNASWAMY et al., 2008). Vários destes compostos têm sido investigados como alternativas adequadas para medicamentos sintéticos e antimicrobianos. Dessa forma, possíveis aplicações incluem a transfecção de genes, a utilização como adjuvantes para os antigênicos e o uso como inibidores da formação de coágulos de fibrina. Além de que têm sido empregados como anti-adesivos para revestimentos de biomateriais e de igual forma, tem-se incorporado como probióticos para combater infecções do trato urogenital e para imunoterapia pulmonar (DE RIENZO et al., 2015).

3.5.5 Aplicação de biosurfactantes na biorremediação de hidrocarbonetos

A maioria dos informes na literatura para estes compostos referem-se a sua aplicação na indústria petroleira. Neste sentido, a sua natureza não toxica e biodegradável tem tornado eles alternativas sustentáveis e compatíveis com o meio ambiente (LOPES et al., 2014).

Neste contexto, o aumento da preocupação pela contaminação de solos e águas constitui um dos principais problemas ambientais. Dentre as fontes contaminantes podem-se citar: os acidentes no transporte de combustível por navios e caminhões, vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo sujeitos a corrosão, extração de petróleo e operações de processamento, além do lançamento inadequado de resíduos oleosos gerados por indústrias que utilizam derivados de óleo na produção de plásticos, solventes, cosméticos e produtos farmacêuticos (EPA, 2008; LIN et al., 2010).

Sendo assim, como estratégias para minimizar esta situação, métodos: físicos, químicos e biológicos, vêm sendo desenvolvidos para a recuperação, remoção ou degradação *in situ* ou *ex-situ*

do petróleo derramado e consequentemente, para a diminuição de seus efeitos sobre o ecossistema (APARNA et al., 2011). As técnicas convencionais apresentam problemas operacionais em razão do seu alto custo, necessidade de pessoal e de equipamentos (RIBEIRO, 2014). Daí que os processos de biorremediação tornam-se uma alternativa não convencional para o saneamento de áreas contaminadas com petróleo e seus derivados, com um menor custo operacional e mínimos efeitos adversos ao ambiente (BENTO et al., 2008; RIBEIRO, 2014; SILVA et al., 2014a).

A biorremediação consiste na decomposição biológica de hidrocarbonetos por micro-organismos que utilizam estes poluentes como uma fonte de carbono para obter energia, degradando-os até dióxido de carbono, água, sais minerais e gases (BANAT et al., 2010).

Quanto maior for a população de micro-organismos degradadores mais rápido e eficiente será o processo de bioremediação. Estudos realizados indicam os fungos e as bactérias como principais micro-organismos eficientes na degradação de poluentes, possuindo alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (RAJASEKAR et al., 2012; ROY et al., 2014; SHANKAR et al., 2014). Assim, a eficiência de um micro-organismo degradador depende, em muitos casos, da estrutura da molécula do contaminante e da presença de enzimas específicas capazes de degradar o produto (BALAJI et al., 2014; WACKETT, 2014). Adicionalmente a ocorrência deste mecanismo é mais provável quando a estrutura química do xenobiótico é semelhante à estrutura de moléculas naturais (GAYLARDE et al., 2005).

Porém, dentre as dificuldades associados à biodegradação de compostos hidrofóbicos, que incluem os hidrocarbonetos do petróleo, podem-se mencionar sua baixa solubilidade e alta hidrofobicidade, o que diminui a disponibilidade para os micro-organismos e pode retardar ou paralisar o processo (APARNA et al., 2011; COLIN et al., 2014). Considerando esta situação, uma alternativa tem sido o uso de compostos surfactantes (VAN HAMME et al., 2006; SILVA et al., 2014a).

Os surfactantes naturais ou biossurfactantes são sintetizados por micro-organismos em presença de compostos hidrofóbicos, promovendo o aumento da solubilidade deles no meio (BANAT et al., 2010; AL-WAHAIBI et al., 2014; SOUZA et al., 2014). Estes compostos aumentam a interação água/óleo diante a diminuição da tensão superficial, aceleram a degradação de vários hidrocarbonetos por micro-organismos e promovem a biorremediação de águas e solos contaminados (MULLIGAN, 2005; AYED et al., 2015).

Estudos realizados com micro-organismos produtores de biossurfactantes evidenciaram o potencial de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo em solos e areia (LUNA et al., 2011; SILVA et al., 2014b; MONTAGNOLLI et al., 2015) (Tabela 2).

Tabela 2- Biossurfactantes, micro-organismos produtores e aplicações na biorremediação de ecossistemas contaminados com petróleo.

Tipo de biossurfactante	Micro-organismo	Aplicação
Ramnolípídeos	<i>Pseudomonasaeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	Melhora da degradação e dispersão de diferentes classes de hidrocarbonetos; emulsificação de hidrocarbonetos e óleos vegetais
Trealolípídeos	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Nocardiasp.</i> , <i>Corynebacteriummsp.</i>	Aumento da disponibilidade de hidrocarbonetos
Soforolípídeos	<i>Torulopsisbombicola</i> , <i>Torulopsispetrophilum</i> , <i>Torulopsisapicola</i>	Recuperação de hidrocarbonetos
Trealolípídeos	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Nocardiasp.</i> , <i>Corynebacteriummsp.</i>	Aumento da disponibilidade de hidrocarbonetos
Ácido corinomicólico	<i>Corynebacteriumlepus</i>	Recuperação de hidrocarbonetos
Surfactina	<i>Bacillussubtilis</i>	Biodegradação de hidrocarbonetos
Liquenisina	<i>Bacilluslicheniformis</i>	Recuperação de hidrocarbonetos
Emulsan	<i>Acinetobactercalcoaceticus RAG-1</i>	
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistensKA-53</i>	Estabilização de emulsões hidrocarboneto-água

Fonte: MATVYEYEVA et al., 2014

3.6 Utilização de substrates alternativos na produção de biossurfactantes

Apesar da ampla aplicabilidade e as vantagens que apresentam os surfactantes de origem microbiana, a produção de grandes volumes ainda não foi atingida quando comparada com os surfactantes sintéticos. Isto se deve, principalmente, ao alto custo de produção. Assim, o uso de

substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais ou de indústrias alimentícias, torna-se uma estratégia devido altos níveis de carboidratos ou lipídeos necessários para a biossíntese destas biomoléculas (BANAT et al., 2000; BANAT et al., 2014).

Os sistemas industriais brasileiros abrangem uma vasta gama de atividades agrícolas ou agropecuárias, pois o país é considerado um grande fornecedor de alimentos para o mundo (ARAÚJO, 2010). Sendo assim, a geração de resíduos gerados por essas indústrias além de potencializarem a produção de biossurfactantes, contribui com a poluição ambiental quando descartados no meio ambiente (MAKKAR et al., 2011). Considerando que o tratamento destes compostos se dificulta por eles apresentarem grande complexidade física e química (CERQUEIRA e COSTA, 2009; LUNA et al., 2013).

3.6.1 Manipueira

A manipueira é um líquido de cor amarelada obtido no processo de fabricação da farinha de mandioca (BARROS et al., 2008). Este efluente possui uma composição química variada que está associada à variedade da mandioca utilizada, ao período da safra, à fertilidade do solo, entre outros fatores. Por outro lado, esse resíduo causa contaminação devido ao alto teor de matéria orgânica, que eleva a demanda química de oxigênio (DQO) podendo chegar a 100 g DQO/L (BARANA, 2000; GUERRA, 2014). Além disso, a presença da linamarina, um glicosídeo cianogênico que é enzimaticamente hidrolisado a cianeto, o qual possui afinidade com o ferro combina-se com a hemoglobina para formar a cianohemoglobina o que inibe o transporte de oxigênio no sangue e consequentemente, a cadeia respiratória (CARVALHO et al., 2006; BARROS, 2008; ARAÚJO, 2010).

Contudo, a sua composição rica em carboidratos, nitrogênio e diversos sais minerais fornecem os nutrientes apropriados para suportar o crescimento de micro-organismos (BEZERRA, 2012; SALGADO, 2013).

A seguinte tabela (Tabela 3) descreve a composição química da manipueira segundo alguns trabalhos publicados (NITSCHKE e PASTORE, 2006; ROSSMAN, 2008; COSTA et al., 2009).

Tabela 3- Composição química media da manipueira

Componentes	Nitschke e Pastore (2006)	Rossmann (2008)	Costa et al. (2009)
Sólidos Totais (g/L)	*	45,02	*
Açúcares Totais (g/L)	35,3	47,07	56,4
Açúcares redutores (g/L)	12,8	0,35	*
Açúcares não-redutores (g/L)	22,2	47,03	*
Nitrogênio total (g/L)	2,5	0,21	*
Fosforo (mg/L)	225,9	643	900
Potássio (mg/L)	2665,1	49	3600,00
Cálcio (mg/L)	272,5	352,00	*
Magnésio (mg/L)	519,0	8,12	500,00
Enxofre (mg/L)	104,0	*	*
Ferro (mg/L)	7,8	ND	6,1
Zinco (mg/L)	7,3	*	11,1
Manganês (mg/L)	1,8	0,16	4,1
Cobre (mg/L)	0,6	*	14,1
pH	5,9	4,56	*

* Análises não realizada

3.6.2 Óleo pós-fritura

Os óleos e gorduras podem-se definir como substâncias hidrofóbicas de origem animal ou vegetal (LIMA, 2007). Na sua composição química apresentam triglicerídeos formados pela da condensação entre glicerol e ácidos graxos. O óleo difere da gordura por seu estado físico, pois a gordura é sólida e o óleo é líquido, ambos a uma temperatura de até 20°C (DABDOUB et al., 2006). No caso do óleo vegetal, a partir do qual se derivam os óleos de cozinha, pode ser obtido de várias plantas, ou sementes como o buriti, mamona, soja, canola, girassol, milho, etc. (SALGADO, 2013).

Os óleos vegetais são largamente e universalmente consumidos para a preparação de alimentos nos domicílios, estabelecimentos industriais e comerciais de produção de alimentos (MORÁS e SILVA, 2009). Esses óleos, após serem degradados termicamente, se descartados de maneira imprópria causam prejuízos ao meio ambiente, como por exemplo: quando em contato com a água de rios e lagos, o óleo se concentra na superfície, criando uma barreira sobrenadante que dificulta a entrada de luz e oxigênio na água, sendo comprometida a base da cadeia alimentar aquática. Também,

quando em contato com o solo impede que a água se infiltre, agravando o problema das enchentes de higiene, mau cheiro e entupimentos nas redes de esgoto, e ainda uma pequena quantidade de óleo polui uma grande quantidade de água, como por exemplo, um litro de óleo de cozinha pode poluir cerca de 10000 litros de água (DABDOUB et al., 2006; GHESTI et al., 2012; SALGADO, 2013).

3.6.3 Soro de leite

O soro de leite é o líquido do leite remanescente após a separação da coalhada, resultante da coagulação das proteínas do leite por enzimas ácidas ou proteolíticas. A sua composição dependerá da técnica utilizada para remoção da caseína da parte aquosa do leite. Dois tipos de soro de leite são produzidos nas indústrias de laticínios, o doce (pH 6-7) e o ácido (pH<5), e sua diferenciação ocorre na técnica utilizada para precipitação da caseína (SISO, 1996; PANESAR et al., 2007; SALES, 2014).

A produção mundial de queijo gera cerca de 100 milhões de toneladas de soro de leite por ano. Assim, este poluente ambiental quando descartado em efluentes, afeta a vida marinha além de promover o decaimento do oxigênio dissolvido na água (KASSA et al., 2008; RHOLFES et al., 2011). Apesar de haver diversas possibilidades para tratamento do soro de leite, entre elas a precipitação, a coagulação e a floculação, o custo de seu tratamento tornou-se fator determinante para indústrias de laticínios (CARVALHO et al., 2013; SALES, 2014).

Nesse sentido, várias pesquisas têm aproveitado este resíduo como matéria prima na produção para a produção de biossurfactantes e outros biocompostos obtidos a partir de micro-organismos (CLADERA-OLIVEIRA et al., 2004; DEBOWSKI et al., 2014; GABARDO et al., 2014; SALES, 2014).

REFERÊNCIAS

- AKPAN, A., MORGAN R. Oral candidiasis. *Postgrad Med. J.* v.78, n 922, p.455-9, 2002.
- ALEXOPOULOS, C. J.; M, MS, C.M.; BLACK WELL, **Interdictory Mycology**, 4 ed. New York; Jonh Welley 8. Sans, Ine 1996.
- AL-WAHAIBI, Y; JOSHI, S; AL-BAHRY, S; ELSHAFIE, A; AL-BEMANI, A; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324-333, 2014.
- AM-IN, S.; LIMTONG, S.; YONGMANITCHAI, W.; JINDAMORAKOT, S. *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida laemsonensis* sp. nov. and *Candida ranongensis* sp. nov., anamorphic yeast species isolated from estuarine waters in a Thai mangrove forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 61, p: 454–461, 2011.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 23-29, 2011.

ARAÚJO, H. W. C. Caracterização morfológica e molecular de uma nova linhagem de *Serratia marcescens* e potencial biotecnológico na produção de biossurfactantes prodigiosina e na utilização de dibenzotiofeno (DBT). Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, p. 150, 2010.

AYED, H. B.; JEMIL, N.; MAALEJ, H.; BAYOUDH, A; HMIDET, N., NASRI, M. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 8-14, 2015.

AZARMI, R., ASHJARAN, A. Type and application of some common surfactants. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 2, p. 632-640, 2015.

BALAJI, V.; ARULAZHAGAN, P.; EBENEZER, P. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. **Journal of environmental biology. Academy of Environmental Biology**, India, v. 35, n. 3, p. 521-529, 2014.

BALASUBRAMANIAN, A.; SHANMUGASUNDARAM, A. Screening of Rhizosphere microorganisms from mangroves forest for saline tolerance and antibiotic resistance. **Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.**, n. 3, v. 1, p: 1-6, 2016.

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

BANAT, I. M.; MAKKAR, RS; CAMEOTRA, SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BANAT, I. M.; SATPUTE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 1-18, 2014.

BARANA, A. C. Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica. Tese de Doutorado. São Pablo. 2000. [s.n.], 2000. 95 p.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. D.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Cienc. Tecnol. Aliment**, v. 28, p. 979-985, 2008.

BARROS, L. M. Ocorrência de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* em sítios subgengivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases. 2005. 133p. Tese doutorado - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

BENTO, D. M.; BRAISCH, P.; MACHADO, M.I.; COSTA, J.A.; MARTINS, V. Biorremediação em ambiente impactado com óleo Diesel. In: XVI Encontro de Química da Região Sul, Blumenau/SC. A Química como Ciência, Educação e Tecnologia, Blumenau, 2008.

- BEZERRA, M. S. Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIA utilizando manipueira como fonte de carbono. Tese de Doutorado. Natal: [s.n.], 2012. 123 p.
- BORDOLOI, N. K.; KONWAR, B. K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 63, p. 73–82, 2008.
- BOUROUIBA, L.; HU, D. L.; LEVY, R. Surface-Tension Phenomena in Organismal Biology: An Introduction to the Symposium, Integrative and Comparative Biology Integrative and Comparative Biology, v.54, n. 6, p. 955–958, 2014.
- CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T.L.M.; SARUBBO, L.A.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnol. Prog.**, v. 29, p. 1097– 1108, 2013.
- CAROLEI, L.; GUTZ, I.G.R. Simultaneous determination of three surfactants and water in shampoo and liquid soap by ATR-FTIR. **Atlanta** [s.n.]. 2005.
- CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. **Science of Total Environment**, v. 445, p. 385-96, 2013.
- CARVALHO, M. F.; SANTOS, A.; EGLER, P. G. Avaliação da atividade poluidora da manipueira na bacia do rio Santa Rita, em Vitória da Conquista, Bahia. In: XI Congresso Brasileiro de Mandioca. [S.l.]: [s.n.]. 2006.
- 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, p. 2, 2009.
- CHEN, M. L.; DONG, C.C.; PENFOLD, J.; THOMAS, R.K.; SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M.; STEVENSON, P.; PARRY, A.; TUCKER, I. CAMPBELL, R.A. Adsorption of sophorolipid biosurfactants on their own and mixed with sodium dodecyl benzene sulfonate at the air/water interface. **Langmuir**, v. 27, p. 854-866, 2011.
- CHU, W.; CHAN, K. H. The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. **Science of the Total Environment**, v. 307, n. 1, p. 83-92, 2003.
- CLADERA-OLIVEIRA, F.; CARON, G.R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 53-8, 2004.
- COLIN, V. L.; CORTES, Á. J.; RODRÍGUEZ, A. ; AMOROSO, M. J. Surface-Active compounds of microbial origin and their potential application in technologies of environmental remediation. In Bioremediation in Latin America, p. 255-265, 2014.
- CORTIS, A.; GHEZZEHEI, T. A. On the transport of emulsions in porous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, p. 1-4, 2007.
- COSTA, S. G.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E., NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas*

aeruginosa. Journal of industrial microbiology & biotechnology, v. 36, n. 8, p. 1063-1072, 2009.

COSTA, S.G.V.A.O. Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: ramnolipídios e polihidroxicanoatos (PHAs). [S.l.]: [s.n.], 2010. 136 p.

DABDOUB, M. J.; BORTOLETO, D.A.; SELLANI, V.D.; RAMPIN, M.A.; SILVA, C.P. DA. LIVRETO. Biodiesel em casa e nas escolas. SP: Laboratório de desenvolvimento de tecnologias limpas de Ribeirão Preto, 2006.

DAVISHI, P.; AYATOLLAHI, S.; MOWLA, D.; NIAZI, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP-2. Colloids Surfaces and Biointerfaces., 2011.

DE RIENZO, M. A. D.; BANAT, I. M.; DOLMAN, B.; WINTERBURN, J.; MARTIN, P. J. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. **New Biotechnology**. v. 32, n. 6, p. 720-726, 2015.

DĘBOWSKI, M.; KORZENIEWSKA, E.; FILIPKOWSKA, Z.; ZIELIŃSKI, M.; KWIATTKOWSKI, R. Possibility of hydrogen production during cheese whey fermentation process by different strains of psychrophilic bacteria. International Journal of Hydrogen Energy, v. 39, p. 1972-78, 2014.

DESAI, J. D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DIAZ, M.A.; DE RANSON, I.U.; DORTA, B.; BANAT, I. M.; BLAZQUEZ, M. L.; GONZALEZ, F.; BALLESTER, A. metal removal from contaminated soils through bioleaching with oxidizing bacteria and rhamnolipid biosurfactants. soil and sediment contamination: **An International Journal**, v. 24, n. 1, p. 16-29, 2015.

EPA - Environmental Protection Agency of United States, 2008. Water Quality Assessment and Total Maximum Daily Loads Information. Office of Water, U.S., Washington, DC.

FRANZETTI, A; GANDOLFI, I.; RAIMONDI, C.; BESTETTI, G.; BANAT, I.M.; SMYTH, T.J.; PAPACCHINI, M.; CAVALLO, M.; FRACCHIA, L. Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovorax paradoxus* 7bCT5. **Bioresour. Technol.**, v. 108, p. 245-251, 2012.

GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 8996, 2014

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. D. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 30, p. 66-72, 2014.

- GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: A Mini – Review. **American Journal of Drug Discovering and Development**, n. 1, p. 58-69, 2011.
- GHESTI, G. F.; RODRIGUEZ, J. P. ; SOUZA, J.S.A.; MACEDO, J. L.; GAIO, L.M.; SILVA, J. S. A educação ambiental na Engenharia e a reciclagem de óleo residual coletado: projeto de extensão BioGama. [S.l.]: Gama-DF, 2012.
- GHIZELINI, A. M., SANTANA; L. C. M. H.; MACRAE, A. Microbial Diversity In Brazilian Mangrove Sediments – A Mini Review. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1242-1254, 2012.
- GODOY, D.P., LACERDA, L. D. Mangroves Response to Climate Change: A Review of Recent. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 651-667, 2015.
- GUDIÑA,E. J.; RODRIGUES,A. I.; ALVES, E.; DOMINGUES, M. R.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresour.Technol.** n. 77, 87–93, 2015.
- GUERRA, O. J. Utilização de melaço, manipueira e soro de queijo como substratos para produção de Biossurfactante por *Bacillus pumilus* e sua aplicação em biorremediação de solo. Tese de Doutorado, São Pablo. [s.n.], 2014. 28 p.
- HARSHADA K., Biosurfactant: A Potent Antimicrobial Agent. **J. Microbiol Exp.**, v. 1, n. 5, p. 1- 5, 2014.
- HEWITT, P.G. Física Conceitual. São Paulo, Brasil: Ed. Bookman, 2002.
- HULTBERG, M.; BERGSTRAND, K. J., KHALIL, S., ALSANIUS, B. Production of biosurfactants and antibiotics by *Pseudomona fluorescent* isolated from a closed hydroponic system equipped with a slow filter. **Antonie Van Leeuwenhoek**, n. 93, p. 373–380, 2008.
- IMHOFF, J. F. Natural Products from Marine Fungi—Still an Underrepresented Resource. **Mar. Drugs**, n. 14, p. 1-19, 2016.
- JAMAL, P.; WAN, M.F.; WAN, N.; ZAHANGIR, A. optimum medium components for biosurfactant production by *Klebsiella pneumoniae* WMF02 Utilizing Sludge Palm Oil as a Substrate. **Journal. of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 100-108, 2012.
- JAMES, S. A.; CARVAJAL, E. J. B.; PORTERO, P. B.; CROSS, K.; BOND, J. C.; ROBERTS, I. N. *Candida ecuadorensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species found in two separate regions of Ecuador. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 63, p. 393– 397, 2013.
- JARA, A. M.; ANDRADE, R. F.; 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.
- KAPADIA, S. G.; YAGNIK, B. N. Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants. **Asian J. Exp. Biol. Sci.**, v. 4,p. 1 – 8, 2013.

- KASSA, A.; GOULI, S.; GUO, M.; LEE, F.; HATA, T. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 112, p. 583-91, 2008.
- KASSAB, D. M., ROANE, T. M. Differential responses of a mine tailings *Pseudomonas* isolate to cadmium and lead exposures. **Biodegradation**, n. 17, p. 379–387, 2006.
- KATHIRESAN, K. E SARAVANAKUMAR S. K. Bio-ethanol production by marine yeasts isolated from coastal mangrove sediment. **Int. Multidiscipl. Res. J.**, n. 1, v. 1, p. 19-24, 2011.
- KRISHNASWAMY, M.; SUBBUCHETTIAR G.; RAVI, T. K.; PANCHAKSHARAM, S. Biosurfactants properties, commercial production and application. **Current Science** v. 94, p. 736- 747, 2008.
- KURTZMAN, C. P., and J. W. FELL. The Yeasts, A Taxonomic Study. Elsevier Scientific B.V., Amsterdam, **The Netherlands**, 2000.
- KURTZMAN, C. P.; PRICE, N. P.; RAY, K. J.; KUO, T. M. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 311, n. 2, p. 140-146, 2010.
- ŁAWNICZAK, L.; MARECIK, R.; CHRZANOWSK, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p. 2327-2339, 2013.
- LIMA, C. J. B. de Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual. Tese de Doutorado. Uberlândia: [s.n.], 2007. 168 p.
- LIN, C. W.; CHEN, L. H.; YET-POLE, I., LAI, C. Y. Microbial communities and biodegradation in lab-scale BTEX-contaminated groundwater remediation using an oxygen-releasing reactive barrier. **Bioproc. Biosyst. Eng.**, n. 33, p. 383-391, 2010.
- LIU, W. W.; YIN, R.; LIN, X. G., ZHANG, J.; CHEN, X. M., LI, X. Z.; YANG, T. Interaction of biosurfactant-microorganism to enhance phytoremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) contaminated soils with alfalfa (*Medicago sativa* L.), n. 31, p. 1079–1084, 2010.
- LOPES, E. M.; TEREZA, C. L. C.; MORETTO, C., MACEDO; MARCONDES, J. A. S. Emulsification properties of bioemulsifiers produced by wild-type and mutant *Bradyrhizobium elkanii* Strains. **J Bioremed Biodeg.**, v. 5, n. 6, p1-6, 2014.
- LOURITH. N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 255-261, 2009.
- LUNA J. M., RUFINO, RD, SARUBBO LA CAMPOS-TAKAKI GM. Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids Surf B: Biointerfaces**. v. 102, p. 202– 209, 2013.
- LUNA, J. M., RUFINO, R. D., ALBUQUERQUE, C. D., 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. **International**

LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 52, n. 4: p.785-793, 2009.

MADIGAN, M. T.; JUNG, D.O., WOESE, C.R.; ACHENBACH, L.A. *Rhodoferrax antarcticus* sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat. **Arch. Microbiol.**, v. 173, p. 269-277, 2000.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 1, p. 1-5, 2011.

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

MARIM, M. G., M. V. S. LIMA, E. BONA. Otimização da obtenção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC (9372) a partir de melaço de cana-de-açúcar. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, COBEQ, p. 1-6, 2015.

MATVYEYEVA, O. L.; VASYLCHENKO, O. A.; ALIIEVA, O. R.; Microbial biosurfactants role in oil products biodegradation. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 2, n. 2, p. 69-74, 2014

MAX, Y. F. S.; ANDRADE, R.F.S.; SILVA, A.M.; RIBEIRO, D.L.R.; JARA, A. M. A. T.; ALENCAR, A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; GUSMÃO, N.B. Biosurfactant production by *Rhodotorula glutinis*: Emulsifying property and stability. **Microbes In Applied Research: Current Advances and Challenges**. [S.l.]: [s.n.], 2012. 358-361 p.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 1, p. 1-17, 2015.

MORÁS, P. L. ; SILVA, J. D. Programa de reciclagem de óleos domésticos em Mandiritura- Paraná. **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Recife: [s.n.]. 2009.

MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Production of mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n. 97, p. 4691-4700, 2013.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental pollution**, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 372-378, 2009.

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

NIE, M.; YIN, X.; REN, C.; WANG, Y.; XU, F.; SHEN, Q. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a

Rubio-Ribeaux, D. Isolamento e identificação de leveduras do gênero *Candida* em sedimentos... 33
polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 635-643, 2010.

NITSCHKE, M., & PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 252-259, 2007.

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

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

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilization of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

PIRÔLLO, M.P.S. Estudo da Produção de Biossurfactantes utilizando Hidrocarbonetos. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2006. 61 p.

PRASAD, B.; PAL, H. K.; KAUR, S. Potential biomedical and pharmaceutical applications of microbial surfactants. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 1557-1575, 2015.

QUEROL, A.; BOND, U. The complex and dynamic genomes if industrial yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, p. 1-10, 2009.

RAIGER, L. J. E N. I. LÓPEZ. Los biosurfactantes y la industria petrolera. **Revista Química Viva**. 3: 146-161, 2009.

RAJASEKAR, A., MARUTHAMUTHU, S., TING, Y. P., BALASUBRAMANIAN, R.; RAHMAN, P. K. Bacterial degradation of petroleum hydrocarbons. **In Microbial Degradation of Xenobiotics**, p. 339-369, 2012.

REBELLO, S.; ASOK, A. K.; MUNDAYOOR, S.; JISHA, M. S. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. **Environ. Chem. Lett.**, v. 12, p. 275–287, 2014.

RHOLFES, A.L.P; BACCAR, N. M.; OLIVEIRA, M.S.R.; MARQUARDT, L.; RICHARDS, N.S.P.S. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental, **Tecnologia**, v.15, n. 2, p.79-83, 2011.

RIBEIRO, D.L.R. Avaliação do potencial de degradação de diesel e biodiesel em ambientes impactados utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação de Mestrado. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014. 165 p.

RODRIGUES LR, TEIXEIRA JA, OLIVEIRA R. Low cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, 32, 135-142, 2006.

- Rubio-Ribeaux, D. Isolamento e identificação de leveduras do gênero *Candida* em sedimentos... 34
ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. Surfactants and interfacial phenomena. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012.
- ROSENBERG, E. ; RON, E. Z. Biosurfactants. In The Prokaryotes. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- ROSSMANN, M. Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melão e manipueira. [S.l.]: Universidade Federal de Viçosa., 2008.
- ROY, ABHIJIT SARMA. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 94, p. 79-86, 2014.
- RUFINO, R. D.; DE LUNA, J. M.; DE CAMPOS TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34-38, 2014.
- SABATINI, D. A.; MCINERNEY, M.J.; YOUSSEF, N.; NGUYEN, T. Evaluation of sub-micellar 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. 11-39, 2011.
- SALES, F. L. L. Uso de soro de leite para obtenção de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e de biossurfactantes. 2014. 2 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2014.
- SALGADO, J. P. Produção de biossurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549 utilizando resíduos industriais e substratos de baixo custo. [S.l.]: [s.n.], 2013. 45 p.
- SARAFIN, Y.; BIRDILLA, M. S. D.; VELMURUGAN, S.; MICHAELBABU B.; CITARASU, K. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 1-9, 2014.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M.L.G.; DE-ROSA, T. Brazilian Mangroves. *Aquat. Ecos. Health Manag.*, n. 3, p. 561-570, 2000.
- SENTHILRAJA, P., KATHIRESAN, K., SARAVANAKUMAR, K. Comparative analysis of bioethanol production by different strains of immobilized marine yeast. **J. Yeast Fungal Res.**, v. 2, n. 8, p. 113–116, 2011.
- SHANKAR, S.; KANSRAJH, C.; DINESH, M. G.; SATYAN, R. S.; KIRUTHIKA, S.; THARANIPRIYA, A. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil- contaminated soils. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 367-376, 2014.
- SHEKHAR, S.; SUNDARAMANICKAM, A.; BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, n. 45, p. 1522–1554, 2015.
- SILVA, G. P., AGUIAR, MARTINS V. M., MARTINS P. C., BOSCHERO R. A., HERNÁNDEZ, P. C. Influência do meio mineral na produção de biossurfactantes. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 7, n.

SILVA, M. Fungos filamentosos isolados de sedimentos estuarinos que metabolizam hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Tese de Doutorado. Campinas, São Pablo. 2002. [s.n.], 2002. 101p, 2002.

SILVA, N. R. A., LUNA, M. A. C., SANTIAGO, A. L. C. M. A., FRANCO, L. O., SILVA, G. K. B., OKADA, K., ALBURQUERQUE, C. D. C., SILVA, C. A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in the Northeast of Brazil. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 15377-15395, 2014.

SILVA, R. C. F. S. Resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de biossurfactantes para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo. Dissertação de Mestrado. Recife. Universidade Catolica de Pernambuco: [s.n.], 2012. 149 p.

SILVA, R. D. C. F., ALMEIDA, D. G., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SANTOS, V. A., SARUBBO, L. A. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523-12542, 2014.

SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresurce Technology*, v. 57, p.1-11, 1996.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R. M. Biosurfactants: a general overview. In *Biosurfactants*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2011. 1-11 p, 2011.

SOSOVELE, E. M.; HOSEA K. M. Impact of anthropogenic activities on genetic variability of yeasts inhabiting mangrove sediments of Dar es Salaam, Tanzania. **Journal of Environment and Ecology**, v. 4, n. 1, p 1-13, 2013.

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

SOUZA, E.C.; VESSONI-PENNA, T.C.; SOUZA OLIVEIRA, R.P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 89, p. 88-94, 2014.

THATOI, H.; CHANDRA. B. B.; RANJAN, R. M.; KUMAR S. D. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Ann Microbiol** v. 63, p. 1–19, 2013.

UZOIGWE, C.; ENNIS, C. J., RAHMAN, P. K. Production of biosurfactants using eco-friendly microorganisms. **In Environmental Sustainability**, p. 185-204, 2015.

VAN HAMME, JONATHAN D.; SINGH, AJAY; WARD, OWEN P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 604-620, 2006.

VATSA, P.; SANCHEZ, L., CLEMENT, C., BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid biosurfactants

VERMA, A., GUPTA, N.; VERMA, S. K.; DAS, M. D. Multifactorial approach to biosurfactant production by adaptive strain *Candida tropicalis* MTCC 230 in the presence of hydrocarbons. **Journal of Surfactants and Detergents.** v. 18, n. 1, p. 145-153, 2015.

VICENTE, G., BAUTISTA, F.; RODRÍGUEZ, R ;GUTIÉRREZ , J. ; SÁDABA I. ; RUIZ-VÁZQUEZ, R; TORRES-MARTÍNEZ, S; VICTORIANO, G. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 22-27, 2009.

VIJAKUMAR, S.; SARAVAN, V. In vitro cytotoxicity and antimicrobial activity of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain PBB3A, v. 8, n. 4, p. 510-518, 2015.

WACKETT, L. P. Bioremediation Strategies Derived From Enzyme Studies. **In Annual Meeting and Exhibition.** Simb: [s.n.], 2014.

ZHANG, C.; WANG, S.; YAN Y. Isomerization and biodegradation of beta-cypermethrin by *Pseudomonas aeruginosa* CH7 with biosurfactant production. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 7139– 7146, 2011.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1

Biotechnological production of biosurfactant in economic medium by *Candida* sp. and evaluation of biodegradation potential of petro derivatives

Trabalho aceito para ser publicado como capítulo do livro: *Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*. BrownWalker Press, 2016.

Biotechnological production of biosurfactant in economic medium by *Candida* sp. and evaluation of biodegradation potential of petro derivatives

D. Rubio-Ribeaux^{*1,2}, R. F. S. Andrade², D. Montero-Rodríguez^{1,2}, M. A. C. Luna², M. A. Pele^{1,2}, A. Antunes², L. O. Franco³, M. A. B. Lima³, G. M. Campos-Takaki²

¹Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Biology Department, Rural Federal University of Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author: drubioribeaux@yahoo.es Phone: +55-81-21194044

Biosurfactants are amphiphilic compounds that tend to accumulate at the interfaces of fluid phases with different polarities reducing surface and interfacial tensions. They can be synthesized from both hydrocarbons and renewable and low-cost substrates such as agro-industrial residues. Thus, the aims of this work was to evaluate the biosurfactant production by *Candida* sp. Using wastes and its potential for fuels biodegradation after its acclimatization in diesel. The lower surface tension of the biosurfactant produced by *Candida* sp. was 30.8 mN/m in medium containing 3% of whey, 7% of cassava wastewater and 10% of soybean post frying oil. The emulsification index obtained in this condition was 79% to diesel, 73% to biodiesel and 67% to engine oil. *Candida* sp. incubated on 30% of diesel showed excellent value of degradation to diesel (98%) and good to biodiesel (60%).

Keywords: *Candida* sp.; biosurfactants; agro-industrial wastes; biodegradation.

1. Introduction

Biosurfactants are molecules of biological origin with a polar head group and a hydrophobic tail. For that reason, they tend to accumulate at interfaces of different polarities (oil-water or air-water) lower the surface tension of a liquid [1]. These compounds have many advantages in comparison to their chemically synthesized equivalents because they are biodegradable, less toxic and non-hazardous. However, biosurfactants are usually effective at extreme environmental conditions but they are not competitive from an economic point of view [2,3].

In order to increase their competitiveness in the market, one possible strategy for reducing costs is the use of low-cost renewable feed-stocks and agro-industrial by-products and wastes as culture media. Thus, this can contribute to make their production economically viable and, at the same time, alleviate many industrial waste management problems [4]. In addition, their production is closely related to the ability of microorganism to grow and degrade hydrocarbons and fuels [5]. In this work, biosurfactant production by *Candida* sp. using wastes and its potential for fuels biodegradation after its acclimatization in diesel were evaluated.

2. Materials and Methods

Candida sp. isolated from mangroves sediments of Rio Formoso, Recife, Pernambuco state (Brazil). The microorganism was maintained in anamorph state at 5°C on Yeast Mold Agar (YMA) slants containing (w/v): yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1% and agar 2%. The yeast was grown in Erlenmeyer flasks of 250 mL of capacity, containing liquid medium 100 mL of Yeast Mold Broth (YMB) and incubated aerobically for one day at 27°C on a rotary shaker (150 rpm). Then, 0.5% of YMB culture contained 10^7 cells/mL was used to initiate growth in the Bushnell Haas medium (MgSO₄ 0.2 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, CaCl₂ 0.02 g/L, FeCl₃ 0.05 g/L and NH₄NO₃ 1.0 g/L), supplemented with whey, cassava wastewater and soybean post frying oil. The biosurfactant production was evaluated using a 23 full factorial design to verify the effects and interactions of whey concentration, cassava wastewater concentration and soybean post frying oil concentration on the production of biosurfactant. In this design, a set of 12 experiments, with four replicates at the central points, was developed. The analysis was performed by the software STATISTIC version 6.0 of StatSoft®. The experiments were performed in triplicate at temperature of 28°C and orbital agitation of 150 rpm during 96 hours. After this period, the mediums were centrifuged at 5000g for 20 min and filtrated. The surface tension was determined using a Tensiometer model Sigma 70 (KSV Instruments LTD - Finland) using the Du Nouy ring method at room temperature [6]. The emulsification index was analyzed according to Cooper and Goldenberg [7] for the better condition determined by measuring of surface tension.

After 24 h, the emulsification index (EI_{24}) was calculated by dividing the measured height of the emulsion layer by the mixture's total height and multiplying by 100 to expressing in percentage. The biodegradation tests were carried out using the wild strain of *Candida* sp. Acclimatized in medium YMA with diesel 30% (v/v) and was incubated at 28°C for 24 h. The cells were centrifuged at 5000 x g for 20 min, washed twice with distilled water and transferred to sterile water to obtain a suspension of 10^7 cells/mL. After acclimation in diesel oil, test tubes containing 5 mL of Bushnell-Haas medium were added with 5 µg/mL of the redox indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP), 50 µL of hydrophobic substrates and 1 mL of cell suspension (10^7 cells/mL). The biodegradation potential was determined after 30 days by visualization of decolourization of the medium and determination of degradation percentage by optical density at 610 nm.

3. Results and Discussion

3.1 Production of biosurfactant by *Candida* sp. in alternative medium

The use of culture medium formulated with cheaper agro-industrial wastes and by-products can contribute to reduce their production costs and increase their competitiveness [4,8]. Thus, in order to establish the optimum concentration for biosurfactant production by *Candida* sp. in this study, the Bushnell Haas medium with different concentrations of whey, cassava wastewater and soybean post frying oil was used. Table 1 shows from the numbers one (1) to eight (8) the runs corresponding to the experimental conditions obtained by the combination of the variables tested and numbers nine (9) to twelve (12) are the runs corresponding to the experimental conditions of the central point. As it can be seen from the results obtained, the higher reduction in surface tension of the water was observed from 70 to 30.8 mN/m in condition 7 of factorial design, in medium constituted by 3% of whey, 7% of cassava wastewater and 10% of soybean post frying oil. The results obtained were similar to those described for other biosurfactants produced by yeasts grown in vegetable oils: *C. lipolytica* (31 mN/m) [9] and *C. glabrata* (31 mN/m) [10].

3.2 Effect of variables used on the surface tension

Figure 1 illustrates the Pareto Chart, with 95% confidence level, for effect estimates, in absolute values. As it can be seen from the chart, only soybean post frying oil was the independent variable that most influenced in reducing the surface tension. Thus, this result indicates the capacity of this residue for its use as carbon source in the production of biosurfactants by *Candida* sp.

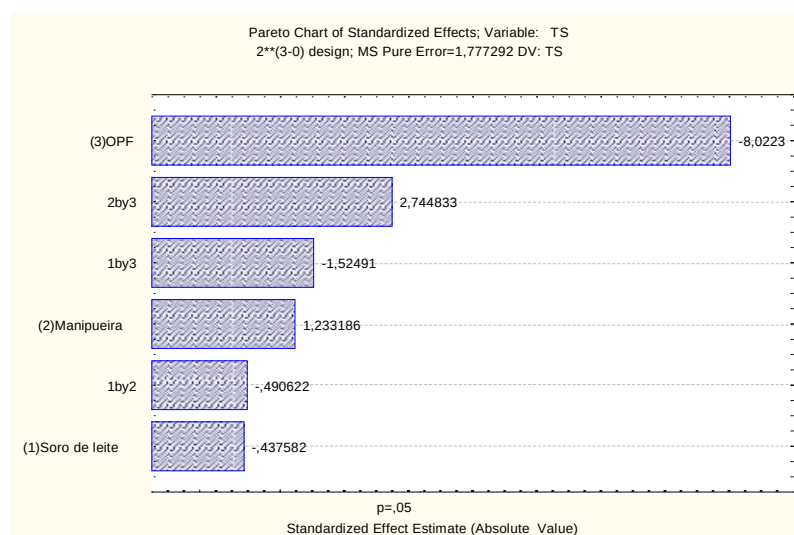


Fig. 1 Pareto Chart of standardized effects for surface tension of the cell-free broth from *Candida* sp. after 96 hours of cultivation for the 2^3 full factorial design. The point at which the effect estimates were statistically significant (at $p = 0.05$) is indicated by the broken vertical line.

Table 1- Surface tension values obtained in the 2^3 full factorial design used for biosurfactant production by *Candida* sp. at 28 °C and 150 rpm during 96 hours.

Conditions	Whey	Cassava wastewater (%)	Soybean post frying oil (%)	Surface tension (mN/m)
1	3.0	5.0	0.0	41.9
2	9.0	5.0	0.0	43.7
3	3.0	7.0	0.0	41.3
4	9.0	7.0	0.0	41.5
5	3.0	5.0	10.0	33.5
6	9.0	5.0	10.0	31.8
7	3.0	7.0	10.0	30.8
8	9.0	7.0	10.0	37.4
9	0	0	0	34.2
10	0	0	0	31.7
11	0	0	0	31.6
12	0	0	0	31.4

3.3 Biosurfactant emulsification capacity

Biosurfactant production is sometimes detected by measuring emulsification [11]. The emulsifying index against different hydrophobic substrates of the biosurfactant produced by *Candida* sp. in the condition 7 of the 23 full factorial design is presented in Fig. 2. The results showed that the significant values were 79% to diesel, 73.2% to biodiesel and 67% to engine oil. The property of biosurfactants to form stable emulsions with hydrocarbon-water mixtures has been demonstrated to increase hydrocarbon degradation and suggests its potential application in oil spill management and enhanced oil recovery [12].

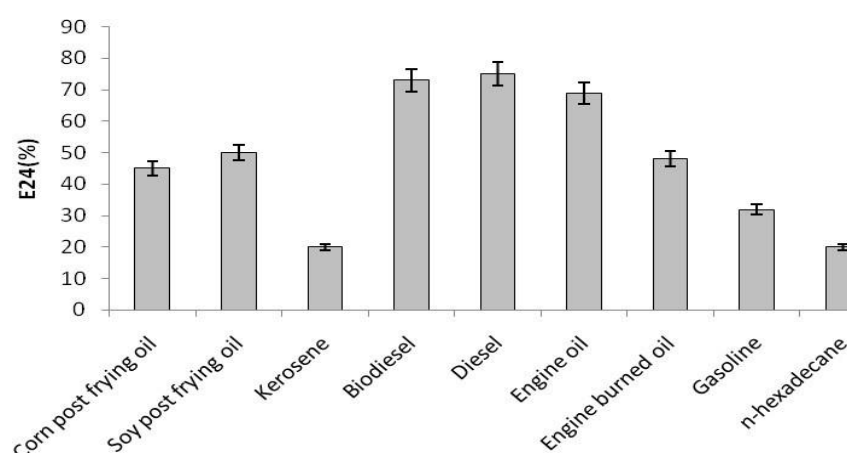


Fig. 2 Emulsification index (E24) of the biosurfactant produced by *Candida* sp. in medium consisting in 3% of whey, 7% of cassava wastewater and 10% of soy post frying oil

3.4 Fuels biodegradation assay

Biosurfactants are directly involved in the process of hydrocarbon removal from the environment through increased bioavailability and subsequent biodegradation of the hydrocarbons by direct cell contact [13]. For this reason, it is considered that biosurfactant production is closely related to the ability of microorganism to grow and degrade hydrocarbons and fuels.

In this study, it was tested a biosurfactant-producing yeast *Candida* sp. to evaluate its potential for biodegradation of fuels: diesel, engine burned oil, diesel, biodiesel and kerosene after acclimatization on diesel at 30%. The qualitative determination (visualization) showed that this strain acclimatized in 30% diesel showed a great potential to biodegrade the fuels tested, with colour changes of Bushnell Haas medium from dark colour to light colour or colourless (Figure 3).

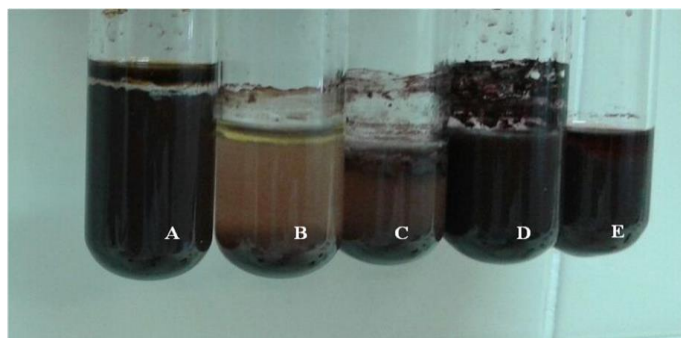


Fig. 3 Test of fuels biodegradation by *Candidasp.* acclimatized to 30% diesel, using the redox indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol: (A) control, (B) degradation of diesel, (C) degradation of biodiesel, (D) degradation of engine burned oil and (E) degradation of kerosene.

These results were confirmed by determination of percentage of biodegradation, which are shown in Figure 4. It was shown that the strain acclimated to 30% diesel showed excellent value of degradation to diesel (97.50%) and good to biodiesel (59.57%).

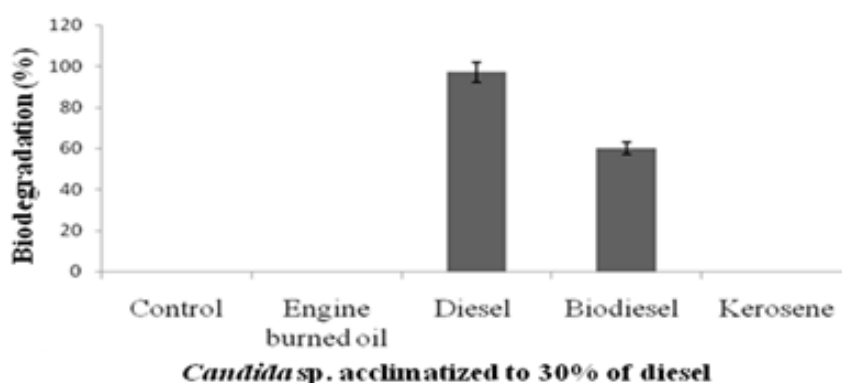


Fig. 4. Potential of fuels biodegradation (%) of *Candidasp.* acclimatized on 30% diesel after incubation for 30 days.

After 30 days the results showed that diesel presented the higher value of degradation by this strain. Chandran and Das [14] obtained similar results (98% biodegradation of diesel) with *C. tropicalis* isolated from petroleum-contaminated soil. Thus, in this work it was demonstrated the capacity of *Candida sp.* to diesel degradation, which would have great application in bioremediation of contaminated sites with this hydrocarbon.

4. Conclusions

In conclusion, this work showed the capacity of *Candida* sp. to produce biosurfactant using wastes as substrates, what allows a reduction in costs of the process. At same time, it demonstrated its potential for diesel biodegradation that suggests its likely biotechnological applications on the bioremediation of polluted environments.

Acknowledgements: This work was financially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal Superior (CAPES) and Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB), Catholic University of Pernambuco (Recife-PE, Brazil).

References

- [1] Satpute S. K., Banpurkar A. G., Dhakephalkar P. K., Banat I. M., Chopade B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit Rev Biotechnol*, 30: 127-144, 2011.
- [2] Lima, T. M., Procópio, L. C., Brandão, F. D., Carvalho, A. M., Tótola, M. R., and Borges, A. C. Biodegradation, 22, 585–592, 2011.
- [3] Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z. and Shiina, T. *International Journal of Molecular Science*, 12, 462–475, 2011.
- [4] Gudiña, E. J., Rodrigues, A.I., Alves, E., Domingues, M. R., Teixeira, J. A., and Rodrigues, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. *Bioresour. Technol.* 177, 87–93, 2015.
- [5] Zheng, G., Selvam, A. and Wong, J. W. Oil-in-water microemulsions enhance the biodegradation of DDT by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biores techn.*, 126:397-403, 2012.
- [6] Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., Ritchkova, M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *J Microbiol Methods*. 46 (2):149-156, 2001.
- [7] Cooper, D. G., Goldenberg, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(2):224 –229, 1987.
- [8] Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Sylatk, C., Hausmann, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochem.* 47, 1207–1219, 2012.
- [9] Rufino, R. D.; Sarubbo, L. A.; Campos-Takaki, G. M. J. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 729-734, 2007.
- [10] Sarubbo, L.A. and Luna, J. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electron. J. Biotechnol.* 54, 68-73, 2006.
- [11] Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 20:48–52, 1998.
- [12] Neto, D. M., J.A. Meira, J. M. de Araujo, D. A. Mitchel and N. Krieger. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 441-448, 2008.
- [13] Banat, I. M., Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508, 2000.
- [14] Chandran, P. and Das N. Role of Sophorolipid biosurfactant in degradation of diesel oil by *Candida tropicalis*. *Bior. Journal.* 16:1, 19-30, 2012.

CAPÍTULO 3

ARTIGO II

Physicochemical and functional characterization of biosurfactant produced by a new *Candida tropicalis* isolated from mangrove sediment in Northeast of Brazil

* Manuscrito submetido para publicação ao periódico: Colloid and Surface B

Physicochemical and functional characterization of biosurfactant produced by a new *Candida tropicalis* isolated from mangrove sediment in Northeast of Brazil

Daylin Rubio-Ribeaux^{1,2}, Rosileide Fontenele da Silva Andrade², Dayana Montero-Rodríguez^{1,2}, Rodrigo Assunção de Holanda³ Maria Aparecida de Resende Stoianoff ³ and Galba Maria de Campos-Takaki ^{2*}

¹Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. da Engenharia, s/n - Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-Pernambuco, Brazil.

²Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife-Pernambuco, Brazil

³Institute for Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-010, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco. 50050-590 Recife-Pernambuco, Brazil. Phone/Fax: +55-81-21194044; +55-81-21194043. E-mail address: galba_takaki@yahoo.com.br

ABSTRACT

The current work using the agro-industrial wastes to obtain them is one of the strategies for reduction overall biosurfactant production costs by new *Candida tropicalis* strain. The yeast was isolated from mangrove sediments, and was grown for 96 h in the optimized medium containing whey (3%), cassava wastewater (7%) and soybean post frying oil (10%), to determine the kinetics of growth and biosurfactant production. The yeast was reduced significantly the surface tension from 70 to 28.8 mN/m, with a critical micelle concentration of 1.5%. The yield of biosurfactant was 4.9 g/L, respectively. In addition, the biosurfactant was characterized as an anionic polymeric molecule, composed by proteins (51%), lipids (37%) and carbohydrates (11%), and confirmed by FTIR analysis. The biosurfactant was formed stable emulsions at different ranges of temperature, pH and salinity. The purified biosurfactant showed no toxicity against different vegetable seeds *Brassica oleracea*, *Lactuca sativa* L. and *Solanum lycopersicum*. The biosurfactant was further investigated to antimicrobial activity showing effectiveness against Gram positive and Gram negative bacteria, and yeasts. The results obtained with biosurfactant produced by *C. tropicalis* in low-cost medium suggest potential application to pharmaceutical, as well as in petroleum and oil industry.

Keywords: *Candida tropicalis*, mangrove sediment, oil dispersion, biosurfactant

1. INTRODUCTION

The presence of surfactants in the daily activities of man makes life easier. These compounds possess in their composition both hydrophilic and hydrophobic structural moieties. This duality gives them the ability to lower the surface tension, critical micelle concentration, and interfacial tension between liquid–liquid/liquid–solid systems [1,2]. Biosurfactants are the main classes of natural surfactants produced by fungi, yeast and bacteria. According to their chemical structures, they are grouped into five major classes of lipopeptides, glycolipids, phospholipids, neutral lipids, and polymeric compounds [3,4].

Microbial surfactants have numerous advantages when compared to their chemically synthesized counterparts due to their lower toxicity, higher biodegradability, better environmental compatibility, ability to be synthesized from renewable resources, higher foaming, higher selectivity and specific activity at extreme temperature, pH and salinity [5]. These properties confer them commercial importance evidenced through the biotechnological applications in pharmaceutical, biomedical, cosmetic, petroleum, and food industries [6,7].

However, due to the high costs of the production associated with inefficient methods of recovery of the product and the use of expensive substrates, the biosurfactant have not yet been employed extensively in industry [8]. Therefore, the economic problem of their production can considerably be reduced through the use of alternative sources easily available and of low cost [7,9].

Besides other aspects to consider are the absence of toxicity and the antimicrobial activity. These properties are fundamentals for the biotechnological applications of biosurfactants [10]. The present paper was focused on the characterization of the biosurfactant produced by *Candida tropicalis* isolated from mangrove sediment in Northeast of Brazil. The biosurfactant was extracted and characterized through compositional analyze, ion charge and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The stability of the biosurfactant under different conditions of pH, temperature and salinity was also studied and it was verified its efficacy in the phytotoxicity assay and antimicrobial activity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Mangrove sediments collection

The samples isolated from of mangrove sediments of Rio Formoso (localized at 08° 39' 50" S 35° 09' 32"), Recife, Pernambuco state, Brazil, were collected on July, 2015. To the collect of samples different parts of the mangrove were previously marked and the separate area in homogeneous plots. The samples were taken placed in sterile bags and immediately conducted to the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB), of the Catholic University of Pernambuco.

2.2 Yeast Isolation

To isolation of yeast 1g of sediment was added to Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 100mL of Yeast Mold Broth (YMB) with the following composition (w/v): yeast extract (0.3%), malt extract (0.3%), tryptone (0.5%), d-glucose (1.0%). A 200 mg/L of chloramphenicol was supplemented after sterilization to minimize bacterial growth. The flasks were incubated at 150rpm and 28 °C for 48 h. After this period, serial dilutions from 10^{-1} to 10^{-5} were prepared and aliquots of 0.1 mL of each dilution were added to Petri dishes containing Yeast Mold Agar with the following composition (w/v): yeast extract (0.3%), malt extract (0.3%), tryptone (0.5%), d-glucose (1.0%) and agar (5%). The plates were then incubated at 30°C for 72 h.

2.3 Identification of the isolated yeast

The colonial morphology of yeast was identified according with Accorsini et al., (2012) by color, borders and size of the colonies, texture, surface appearance and elevation. The DNA-ITS1-5.8S ITS2 locus was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). The amplicons were resuspended in 10 L of water injection, quantified in spectrophotometer NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) and stored at -20°C. Purified amplicons were sequenced by capillary electrophoresis (Sanger method) in ABI3130 platform (Life Technologies) by the company Myleus (Belo Horizonte/ MG, Brazil). The chromatograms generated underwent the Phred-Phrap software to read quality check of the base during the sequencing step. The consensus sequences were submitted for analysis of similarity to sequences deposited in GenBank (NCBI) using the BLASTn online tool. Percentages above 95% similarity between the sequences of interest is deposited into the database from a microorganism were considered identical [11].

2.4 Culture conditions

Cell grown of yeast strain on a slant were transferred to 50 mL of Yeast Mold Broth (YMB). The culture was incubated in orbital shaker at 150 rpm and 28°C for 24 h. Erlenmeyers flask containing medium with the following composition: MgSO₄ 0.2 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, CaCl₂ 0.02 g/L, FeCl₃ 0.05 g/L and NH₄NO₃ 1.0 g/L, supplemented with whey (3%), cassava wastewater (7%) and soybean post frying oil (10%), adjusting the pH to 5.3. After this period 0.5% of YMB culture contained 10^4 cells/mL was used to initiate the growth. The culture was incubated at 28°C in orbital shaker at 150 rpm during 96 h in triplicate and at regular intervals every 24 h samples was taken to determinate surface tension and biomass.

2.5 Biomass determination

For biomass determination, 5 mL samples were mixed in pre weighed tubes with chilled distilled water and centrifuged at 5000 rpm for 20 min. After two washing cycles the cell pellet was dried in an oven at 90°C for 24 h. All the assays were carried out in triplicate and did not vary more than 5%.

2.6 Determination of surface tension

The determination of surface tension was carried out in the cell-free broth obtained by centrifugation of the cultures at $5,000 \times g$ for 20 min at room temperature, using a Sigma 700 digital surface tensiometer (KSV Instruments LTD, Finland) and working on the principle of the Du Nuoy ring method [12].

2.7 Stability assay

In order to demonstrate biosurfactant stability under different conditions, superficial tension of its partially purified solution (1 g/L) was examined. Samples were heated at 0, 5, 28, 70, and 100°C and cooled to room temperature, after which the surface tension was measured. In the case of pH, this was adjusted to various pH values (2–12) by adding HCl or NaOH to solution at room temperature and the surface was measured. The effect of NaCl concentrations (2%–12%) was also determinate. The tests were performed in triplicate.

2.8 Extraction, Isolation of biosurfactant and Critical Micelle Concentration (CMC)

The biosurfactant was isolated by the precipitation method using the cell-free metabolic liquid with acetone 1:1 (v/v) [13]. The precipitate was allowed to stand for 24 h at 4°C, and after this period was centrifuged at 4000 rpm for 15 min, at 5°C. The supernatant was discarded and the isolated biosurfactant was submitted to dialysis against deionized water, which was changed every 3h, for 96 h at 5°C. The biosurfactant was collected and freeze-dried.

The concentration at which micelles began to form was defined Critical Micelle Concentration (CMC). From known amounts of crude precipitate resuspended in distilled water were determinate the critical micelle concentration (CMC). The measurements were realized using a DuNouy Tensiometer model Sigma 70 (KSV Instruments LTD, Finland) at room temperature. The CMC was reached by measuring the surface tension until observing a constant value of the surface tension. All experiments were performed in triplicate [14].

2.9 Compositional analysis and Ionic charge

The protein content in the isolated biosurfactant was determined using the total protein test kit from Labtest Diagnóstica S.A., Brazil. The phenol-sulphuric acid method allowed determinate the total carbohydrate content [15]. In the case of the lipid content 0.5 g of the isolated material was extracted with chloroform: methanol in different proportions (1:1 and 1:2, v/v). The organic extracts were then evaporated under vacuum and the lipid content determined by gravimetric estimation [16]. The identification of functional groups in the isolated biosurfactant was determined using a Fourier Transformation Infra-Red (FTIR) spectrophotometer (Bruker IFS 66) with KBr in pestle. The FTIR spectrum was obtained at a frequency range of $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

The ionic charge of the biosurfactant was determined by using a Zeta potentiometer model ZM3-D-G, Zeta Meter System 3.0+, with direct images to the video of the Zeta Meter, San Francisco, CA, USA. The top row was filled with a pure compound of a known ionic charge. The substance is known as anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) at a concentration of (0.02 M) cationic substance and barium

chloride (0.05 M). The Petri dish was kept at room temperature for 48 h. The result was calculated when the precipitation lines appear [17].

2.10 Oil displacement area

The oil spreading test was carried to evaluate preliminarily the presence of biosurfactant. The test was carried with 1mL of burnt engine oil onto the surface of 40 mL of distilled water layer contained in a Petri dish (9mm in diameter). Then, was added 1mL of the crude biosurfactant onto the surface of the oil layer. The positive control for oil displacement was the anionic synthetic surfactant Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and negative control was the water. The average value of the diameters of the clear zones of triplicate experiments calculated according with Morikawa et al. [18].

2.11 Phytotoxicity assay

The phytotoxicity of the biosurfactant was evaluated based on seed germination and root elongation of cabbage (*Brassica oleracea*), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum*). Solutions of the isolated biosurfactant were prepared with distilled water at concentrations of 0.2, 0.4 and 0.6 g/L. After five days of incubation in the dark, seed germination, root elongation (≥ 5 mm) and the germination index (a factor of relative seed germination and relative root elongation) were determined as follows:

Relative seed germination (%) = (number of seeds germinated in the extract/number of seeds germinated in the control) x 100

Relative root length (%) = (mean root length in the extract/mean root length in the control) x 100

Germination index = [(% of seed germination) x (% of root growth)]/100%.

Controls were prepared with distilled water to replace the biosurfactant solutions. Mean and standard deviation values of triplicate samples were calculated for each concentration [19].

2.12 Antimicrobial assay

The isolated biosurfactant was evaluated by the agar disc diffusion method [20]. Sterile discs (0.6 cm) soaked with the biosurfactant solution in methanol was assayed on the surface of and nutrient agar and malt extract medium for bacteria and yeast, respectively inoculated with the tested microorganism. After incubation period for 24 h at $37 \pm 2^\circ\text{C}$ and for 48 h at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for bacteria and yeast, respectively, the diameter of inhibition zones was measured [21]. Negative controls were prepared using the same solvents as employed to obtain the extract. As positive controls, ofloxacin (5 μg , Oxoid) was used for Gram-positive bacteria, cefaperazone–sulbactam (10 μg , Oxoid) for Gram-negative bacteria and amphotericin B (30 μg , Sigma) for *Candida albicans*. All the experiments were conducted in triplicates.

3. Results and discussion

3.1 Morphological and molecular identification of the yeast producer of biosurfactant isolated of mangrove sediment

Morphological observations of strain yeast named *Candida* sp. showed cream, smooth, glossy colonies whereas microscopical analysis revealed cells with small and medium sized with budding and no filaments characteristic [22, 23] (Figure 1). The sequences of ITS region were compared with the nucleotide data base using the NCBI-blast tool. *Candida* sp. showed highest genetic agreement with *Candida tropicalis* with a similarity of 99%.

<PLEASE INSERT FIGURE 1>

3.2 Kinetics of growth and biosurfactant production

The use of agro-industrial residues for the production of biosurfactant by members of the genus *Candida* have been previously described for several researchers [24,25]. The ability of these microorganisms to grow and produce biosurfactants in wastes-based medium, has been used to reduce the high costs of production of surface active compounds of biotechnological interest.

In this study, *C. tropicalis* was cultivated in medium containing the agro-industrial substrates whey, cassava wastewater and soybean post frying oil during 96 h at 28°C. As shown in Figure 2, the growth of microorganism started rapidly after inoculation and remained increasing to 96 h of cultivation, when biomass reached 7.7 g/L. The surface tension dropped rapidly from around 70 mN/m to 32.9 mN/m in the first 24 h and continued decreasing to 28.5 mN/m at 48 h of growth, indicating excellent surface-active properties. Biosurfactant production started in the early stages of the exponential growth phase, simultaneously to the surface tension reduction, and increased significantly until the end of cultivation, when was attained the maximum biomass yield. This biosurfactant showed a growth-associate production, similar to the ones produced for *C. sphaerica* cultivated in distilled water supplemented with ground-nut oil refinery residue and corn steep liquor as substrates [26] and for *C. lipolytica* cultivated in soybean oil refinery residue and glutamic acid [14].

<PLEASE INSERT FIGURE 2>

Although the biosurfactants produced by bacteria are more effective in reducing the surface tension, with values up to 25-26 mN/m, several yeasts biosurfactants described in the last few decades have shown similar values to those obtained by bacteria [14, 27, 28]. One example is the biosurfactant produced by *C. tropicalis* in this study, which reduced the surface tension of medium to 28.5 mN/m after 48 h of cultivation. This value is lower than that of another biosurfactants produced by *C. tropicalis*: 35 mN/m [29] and 35.44 mN/m [30].

3.3 Biosurfactant yield

The yield of the crude biosurfactant produced by *C. tropicalis* was 4.9 g/L after 96 h of cultivation in medium containing 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil. This result was better than the reported for *C. tropicalis*

cultivated in waste frying oil with 3.61 g/L [31]. However, other *Candida* members showed highest biosurfactant yields, for example: *C. lipolytica* (8.0 g/L) cultivated during 72 h in optimized medium containing soybean oil refinery residue and glutamic acid [12] and *C. sphaerica* (9.0 g/L) cultured during 144 h in medium composed by ground-nut oil refinery residue and corn steep liquor [32]. Also, *C. utilis* achieved 12.52 g/L after 88 h of cultivation in waste canola frying oil and ammonium nitrate [33]. These results demonstrate that the medium composition and culture conditions influence on yields of biosurfactants produced by *Candida* strains [12]. Also it was confirmed the suitability of whey, cassava wastewater and soybean post frying oil as alternative substrates for biosurfactant production [17,28, 34].

3.4 Critical micelle concentration (CMC)

The critical micelle concentration (CMC) is defined as the minimal concentration of a biosurfactant required to yield maximal surface tension reduction of water and initiate micelle formation [35]. The biosurfactant produced by *C. tropicalis* showed a great surface tension reduction capacity since the water surface tension was reduced from 70 to 28.5 mN/m with the increase of the biosurfactant concentration up to CMC of 1.5%, and then remained constant (Figure 3). These results demonstrate that the biosurfactant produced by *C. tropicalis* has a greater capacity to reduce surface tension in comparison to biosurfactants from *C. glabrata* (31 mN/m) [36], and *C. lipolytica* (32 mN/m) [34] (33 mN/m) [37]. Furthermore, the biosurfactant produced in the present study also has lower CMC than that reported for other yeast surfactants, considering rates of 2.5% for biosurfactant from *C. lipolytica* [38] and *C. glabrata* [36].

<PLEASE INSERT FIGURE 3>

3.5 Characterization of biosurfactant

Microbial surfactants are heterogeneous in nature, complex and have structurally different group of surface active agents. They are classified according to their molecular structure into glycolipids, lipopeptides, phospholipids, fatty acids, lipopolysaccharides, protein complexes, neutral lipids and polymers [33,39].

In this study, the determination of the biochemical composition of the biosurfactant revealed the presence of 51% proteins, 37% lipids and 11% carbohydrates, suggesting its lipopeptide nature. Recently, Verma et al. [40] confirmed the lipopeptide composition of biosurfactant produced by *C. tropicalis* MTCC 230. *C. lipolytica* UCP 0998 has been also reported as producer of lipopeptide biosurfactant, composed of 50% protein, 20% lipids and 8% carbohydrate [41]. However, surfactants produced by this genus can differ widely from one species to another [12].

Furthermore, the biosurfactant showed an anionic profile by Zeta meter with -57.4 ZPmv, 3, 4. $\mu\text{S}/\text{cm}$ at 25.3 °C. The zeta potential determines the function of the surface charge of the particle that serves to predict and control the stability of colloidal suspensions and emulsions. Thus, the higher values obtained indicate good stability by repulsion between hydrophilic particles, as per the literature [41]. Other biosurfactants produced by *Candida* species also show an anionic character [27, 28].

Moreover, the identification of the biosurfactant produced by *C. tropicalis* was done using the FTIR analysis. The compound was identified as biosurfactant by observing the presence of carbonyl moiety of the ester linked type.

<PLEASE INSERT TABLE 1>

The data are consistent with Gartshore and Cooper [42], due to the presence, in most biosurfactants, a carbonyl radical, or carboxylic acid ester linkage which absorbs energy in the infrared region of the electromagnetic spectrum. According to the results showed in Table 3, stretching bonds of the functional groups indicated the presence of a polymeric structure. All these data verified the compositional analysis described above and it is in accordance with the FTIR data obtained for the biosurfactant produced by *C. tropicalis* MTCC 230 [40].

3.6 Biosurfactant stability

Environmental factors such as pH, salinity and temperature affect biosurfactants activity and stability. Therefore, it is important to study the influence of these parameters when considering specific applications for these compounds [43].

Figure 4 shows the effects of temperature, pH and NaCl variation on the surface tension of the biosurfactant produced by *C. tropicalis*, respectively. As is showed, the surface tension of the biosurfactant remained stable over a wide range of temperature, pH and NaCl concentrations. These results suggest the feasibility of application in industries that works under extreme conditions of salinity, temperature and pH, as it was informed for other biosurfactants from *Candida* species [26, 44].

<PLEASE INSERT FIGURE 4>

3.7 Oil spreading test

Another way to detect the biosurfactant activity is the ability to provoke a clearing zone on an oil surface [45, 46]. Generally, the area of displacement by a surfactant-containing solution is directly proportional to the concentration of the biosurfactants tested and its diameter increased linearly with the surfactant quantity [47]. However, in this study was not determined concentration biosurfactant compared to the spread oil activity, but a qualitative assay for check the presence of surfactant in the cell-free broth was conducted. Figure 5 illustrates the dispersant activities of Triton X-100 and crude biosurfactant produced by *Candida tropicalis*. The synthetic surfactant showed a dispersion rate of 97%, whereas the cell-free metabolic liquid (crude biosurfactant) achieved a dispersion rate of 82%, showing its potential in the dispersion of oil. Others result of oil displacement test show the effectiveness of yeast grown in renewable substrates.

<PLEASE INSERT FIGURE 5>

Luna et al., [32] obtained a dispersion rate of 90% of the initial diameter of the oil with *Candida sphaerica* when used the cell-free broth (crude biosurfactant), whereas the dispersion rate obtained with the isolated biosurfactant was 50%. *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 cultivated in soy processing waste as substrate gave 100% oil displacement, while Triton X-100 gave 80% oil displacement [48]. *C. sphaerica* UCP

0995 grown in medium containing 2.5% corn steep liquor and 5.0% vegetal oil refinery waste demonstrated an oil spreading efficiency of approximately 75%. It is important to say that the application of dispersants to oil slicks is one of the oil spill remediation techniques. Surfactants, solvents and additives comprise the formulation of dispersants using for this purpose. The impact of oil spills on marine birds and mammals decrease with the application of dispersants due to it removes the oil from the water surface [40].

3.8 Biosurfactant phytotoxicity

The absence of toxicity of a biosurfactant is of fundamental importance for its application in the environment. Eco-toxicity bioassays are analytical methods that allow characterizing the toxicity of chemical substances. The exposure of living organisms employed as bio-indicators to these substances constitutes a valuable environmental analysis tool [47]. The use of plants in toxicity tests offers several advantages, among them low maintenance cost and rapid results, with a special benefit assessment of the potential eco-toxic compounds in terrestrial environments [48]. The germination index (GI), which combines measures of relative seed germination and relative root elongation, has been used to evaluate the toxicity of the biosurfactant on vegetables *Brassica oleracea*, *Lactuca sativa* L., *Solanum gilo* and *Cichorium intybus* [10,26,49]. In this study, the biosurfactant isolated from *C. tropicalis* did not show phytotoxic effect against seeds of *B. oleracea*, *L. sativa* L. and *S. lycopersicum* (Tables 2-4), since a GI of 80% is considered as an indicator of the absence of phytotoxicity [19]. Similar results were observed by Luna et al. [41] and Rufino et al. [13] who investigated the phytotoxic potential of the biosurfactant produced by *C. sphaerica* UCP 0995 and *C. lipolytica* UCP 0988, respectively. It was also possible to conclude that the increase in biosurfactant concentration led to the leaf growth and elongation of the secondary roots in all tested plants, confirming the positive effect of biosurfactants in seedling development, as reported by Krawczyńska et al. [50] Alsohim et al. [51] and Silva et al. [52].

<PLEASE INSERT TABLE 2>

3.9 Antimicrobial activity of biosurfactant

One useful property of many biosurfactants that has been reviewed recently is their antimicrobial activity (antibacterial, antifungal and antiviral) [7,53,54]. In the present study, the polymer produced by *C. tropicalis* exhibited interesting antimicrobial activities. Table 5 showed that all the tested microorganisms showed susceptibility to the biosurfactant, albeit to different degrees. *Lactobacillus* sp., *Serratia marcescens* UCP 1549 and *Candida albicans* were the most sensitive strains to biosurfactant at three concentrations tested, while *Bacillus licheniformis* UCP 1013 was the less inhibited. Biosurfactants produced by *C. sphaerica* and *C. lipolytica* have also demonstrated antimicrobial activity against different species of fungi and bacteria, suggesting the use of these biomolecules as alternative antimicrobial agents in the medical field [24].

<PLEASE INSERT TABLE 3>

4. Conclusions

In the present study with the new yeast isolated from mangrove sediments was identified as *Candida tropicalis* showed biosurfactant production using industrial as substrates. The production of biosurfactant had been found promising due to its costs by use of the wastes whey, soybean post frying oil and corn steep liquor. The biosurfactant produced had shown an effective antimicrobial activity and low toxicity, as well as stable emulsification and oil displacement to crude oil. The biosurfactant was characterized as polymeric which is different which chemical composition suggesting a new biosurfactant can be used in bioremediation process for hydrophobic pollutants.

5. Acknowledgements

This work was financially supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES) and Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE). The authors are grateful to Graduate Student Agreement Program (PEC-PG) of CNPq for the Master scholarship, to the technicians Severino Humberto de Almeida and André Felipe, and also to the Catholic University of Pernambuco for the use of laboratories.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sharma, D., Saharan, B. S., Chauhan, N., Bansal, A. and Procha, S. 2014. Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. The Scientific World Journal, 2014.
2. Marchant, R. and Banat I.M. 2012. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends Biotechnol, 30(11):558-65.
3. Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Re. 61:47-64.
4. Khopade, A, Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L. and Kokare, C. 2012. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. Desalination, 285:198–204.
5. Zheng C., Wang, M, Wang, Y. and Huang Z. 2012. Optimization of biosurfactant-mediated oil extraction from oil sludge. Bioresour Technol, 110:338–42.
6. Nitschke, M. and Costa, SGVAO. 2007. Biosurfactants in food industry. Trends in Food Sci. & Technol, 18:252-259.
7. Smyth, T. J. P., Perfumo, A., Marchant, R., and Banat, I.M. 2010. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids,” in Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Part 2, Chap. 28, ed. K. N. Timmis (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 3705–3723.
8. Makkar, R.S., Cameotra, S.S. and Banat, I.M. 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Express, 1:5.

9. Banat, I. M. Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R. and Nyayanit, N. V. 2014. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in microbiology*, 5: 1-18.
10. Sobrinho, H.B.S., Luna, J.M., Rufino, R.D., Porto, A.F.L. and Sarubbo, L.A. 2013. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(4): 4-4.
11. Holanda, R. A. Profile keratinolytic and Molecular Characterization of *Microsporum* isolates. 2011. 66 p. – Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, 2011.
12. Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Makarov, S.O., Litvinenko, L.V., Cunningham, C.J., Philip and J.C. 2005. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environ. Int.*, 31: 155–161.
13. Pacwa-Plociniczak, M.; Plaza, G.A.; Piotrowska-Seget, Z. and Cameotra, S.S. 2011. Review Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci*, 12: 633–654.
14. Rufino, R. D., de Luna, J. M., de Campos Takaki, G. M. and Sarubbo, L. A. 2014. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(1): 34-38.
15. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 29: 350–356.
16. Manocha, M.S., San-Blas G. and Centeno, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. 1980. *Microbiology*, 117:147–54.
17. Silva, N.R.A., Luna, M.A., Santiago, A.L., Franco, L.O., Silva, G. K., de Souza, P. M., Okada, K., Albuquerque C.D.C., Alves, Ca. S. and Campos-Takaki, G. M. 2014. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in the Northeast of Brazil. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9): 15377-15395.
18. Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi and T. Imanaka, 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol.*, 175: 6459-6466.
19. Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y. and Hodgkiss, I.J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*, 93(3): 249-256.
- Meylheuc T., van Oss C.J. and Bellon-Fontaine M.N. Adsorption of biosurfactants on solid surface and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. 2001. *J. Appl. Microbiol.*, 91:822–832.
20. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Am. J. Clin Pathol.*, 44: 493-496.

21. Bradshaw, L.J. Laboratory Microbiology. Fourth Edition. USA; 1992. 13-55.
22. Kurtzmann CP, Fell JW, Boekhout T (2011). The Yeasts - A Taxonomic Study. 5th ed. Burlington, MA, USA: Elsevier.
24. Luna, J. M., Rufino, R. D., Sarubbo, L. A., Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A. and Campos-Takaki, G. M. 2011. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. Current Microbiology, 62(5): 1527-1534.
25. Brasileiro, P., Almeida D., Luna, J., Rufino, R., Santos and V., Sarubbo L., 2015. Optimization of the biosurfactant production from *Candida guilliermondii* using a central composite rotatable design. Chemical Engineering Transactions, 43: 1411-1416.
26. Sobrinho, H.B.S., Rufino, R.D., Luna, J.M., Salgueiro, A.A. and Campos-Takaki GM, Leite L.F.C., Sarubbo, L.A. 2008. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. Process Biochem, 43:912–917.
27. Luna, J., Rufino, R., Campos, G. and Sarubbo, L. 2012. Properties of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. Chemical Engineering, 27:67-72.
28. Andrade, R. F., Antunes, A.A., Lima, R.A., Araújo, H.W. Resende-Stoianoff, M. A., Franco, L. O. and Campos-Takaki, G. M. 2015. Enhanced production of an glycolipid biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP/WFCC1556 for Application in dispersion and removal of petroderivatives. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 4(7): 563-576.
29. Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. and Manresa, A. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. Journal of Applied Microbiology, 88(3): 379-387.
30. Coimbra, C. D., Rufino, R. D., Luna, J. M. and Sarubbo, L. A. 2009. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. Current Microbiology, 58(3): 245-251.
31. Almeida, D. G., Silva, R.C.F.S., Brasileiro, P. P. F., Luna, J.M., Sarubbo, L. A. (2015). Utilização de planejamento experimental na produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* a partir de resíduos industriais. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 1(2), 2686-2693.
32. Luna, J.M., Rufino, R.D., Jara, A.M.A.T., Brasileiro P.P.F., Sarubbo L. A. 2015. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 480: 413–418.
33. Campos, J.M., Stamford, T.L. and Sarubbo, L.A. 2014. Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. Appl Biochem Biotechnol, 172(6):3234-52.

34. Montero-Rodríguez, D., Andrade, R. F., Ribeiro, D. L. R., Rubio-Ribeaux, D., Lima, R. A., Araújo, H. W. and Campos-Takaki, G. M. 2015. Bioremediation of petroleum derivative using biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in low-cost medium. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 4(7): 550-562.
35. Santos, D.K., Rufino, R. D., Luna, J.M., Santos, V.A. and Salgueiro, A.A. and Sarubbo, L. A. 2013. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 105, 43-50.
36. Luna, J.M. D., Sarubbo, L. and Campos-Takaki, G.M.D. 2009. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4): 785-793.
37. Rufino, R.D., Sarubbo, L.A. and Campos-Takaki, G.M. 2007. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5): 729-734.
38. Sarubbo L.A, Farias C.B.B. and Campos-Takaki GM. 2007. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr Microbiol.* 54:68–73.
39. Aparna, A., Srinikethan, G. and Smitha, H. 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 23-29.
40. Verma, A., Gupta, N., Verma, S. K. and Das, M. D. 2015. Multifactorial approach to biosurfactant production by adaptive strain *Candida tropicalis* MTCC 230 in the presence of hydrocarbons. *Journal of Surfactants and Detergents*, 18(1), 145-153.
41. Rufino, R.D., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M., Ferreira, S. R. and Sarubbo, L. A. 2012. Application of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the remediation of heavy metals. *Chemical Engineering*, 27: 61-66.
42. Gartshore J.D., Lim, Y.C., Cooper D.G. 2000. Quantitative analysis of biosurfactants using FT-IR spectroscopy. *Biotechnology Letters*, 22: 169-172.
43. Velmurugan, M., Baskaran, A., Kumar, S.D., Sureka, I., Raj, E.A., Emelda, J. and Sathiyamurthy, K. 2015. Screening, stability and antibacterial potential of rhamnolipids from *Pseudomonas* sp., isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(8): 26-33.
44. Gusmão, C. A., Rufino, R. D., and Sarubbo, L. A. 2010. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(9): 1683-1692.
45. Rodrigues R.L., Teixeira A.J., Van der Mei C.H., Oliveira R. 2006. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf B* 49:79–86

46. Thavasi R., Sharma S., Jayalakshmi S. 2011. Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria. J Phylogenetics Evol Biol S1:001. doi: 10.4172/2157-7463.S1-001
47. Mnif, I., Ghribi, D. 2015. Microbial derived surface active compounds: properties and screening concept. World J Microbiol Biotechnol., 31:1001–1020.
48. Sitohy, M.Z., Rashad, M.M., Sharobeem, S.F., Mahmoud, A.E., Nooman, A.S., Al Kashef, M.U., 2010. Bioconversion of soy processing waste for production of surfactants. African J. Microbiol. Res. 4, 2811–2821.
49. National Research Council, Committee on Understanding Oil Spill Dispersants, Oil Spill Dispersants: Efficacy and Effects, Ocean Studies Board, The National Academies Press, Washington, DC, 2005.
50. Fletcher, J. 1991. A brief overview of plant toxicity testing. In: Goruch, J.W., Lower, W.R., Lewis, M.A., Wang, W. (Eds.), Plants for Toxicity Assessment. ASTM, Philadelphia, 1–11.
51. Farré, M., Barceló, D. 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22(5): 299-310.
52. Rocha e Silva, N.M.P., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A. and Sarubbo, L. A. 2014. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(2): 132-139.
53. Luna, J.M., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A. and Campos-Takaki, G.M. 2013. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 102: 202-209.
54. Rufino, R. D., De Luna, J. M., De Campos Takaki, G. M., Sarubbo, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. Electronic Journal of Biotechnology, v. 17, n. 1, p. 34-38, 2014.
55. Krawczyńska, M., Kołwzan, B., Rybak, J., Gediga, K. and Shcheglova, N. S. 2012. The influence of biopreparation on seed germination and growth. Polish Journal of Environmental Studies, 21: 175-180.
56. Alsohim, A.S., Taylor, T. B., Barrett, G.A., Gallie, J., Zhang, X. X., Altamirano-Junqueira, A. E., Johnson, L.J., Rainey, P.B. and Jackson, R. W. 2014. The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. Environmental Microbiology, 16(7): 2267-2281.
57. Silva, V.L., Lovaglio, R.B., Tozzi, H.H., Takaki, M. and Contiero, J. 2015. Rhamnolipids: A new application in seeds development. Journal of Medical and Biological Science Research, 1(8): 100-106.

58. De Rienzo, M. A.D., Banat, I.M., Dolman, B., Winterburn, J. and Martin, P.J. 2015. Sophorolipid biosurfactants: possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New Biotechnology*, 32(6):720-726.
59. Borsanyiova, M., Patil, A., Mukherji, R., Prabhune, A. and Bopegamage, S. 2016. Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents. *Folia microbiologica*, 61(1): 85-89.

Table 1. FTIR spectrum of extracted biosurfactant produced from *C. tropicalis* using whey, cassava wastewater and soybean post frying oil.

Peak	Functional group	Compound
3,514-cm-1	-N-H	peptide
1756 cm-1	-C=O	ester
1448 cm-1	-CH=CH ₂ and -CH ₃	fatty acid
1200-1000 cm-1	-C-C and -C-O-P	polysaccharides

Table 2. Phytotoxicity of biosurfactant isolated from *C. tropicalis* cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil against *Brassica oleracea*. Experiments were performed in duplicate and the results represent means $\pm$ standard deviations of the two independent experiments.

Phytotoxicity against <i>Brassica oleracea</i>	Biosurfactant concentration (%)		
	1	1.5	2
Seed germination (%)	100 $\pm$ 0.2	100 $\pm$ 0.1	100 $\pm$ 0.2
Root elongation (%)	100 $\pm$ 0.4	121 $\pm$ 0.2	135 $\pm$ 0.1
Germination index (%)	100 $\pm$ 0.1	121 $\pm$ 0.4	135 $\pm$ 0.2

Table 3. Phytotoxicity of biosurfactant isolated from *C. tropicalis* cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil against *Lactuca sativa* L. Experiments were performed in duplicate and the results represent means $\pm$ standard deviations of the two independent experiments.

Phytotoxicity against <i>Lactuca sativa</i> L.	Biosurfactant concentration (%)		
	1	1.5	2
Seed germination (%)	100 $\pm$ 0.1	100 $\pm$ 0.4	100 $\pm$ 0.2
Root elongation (%)	100 $\pm$ 0.2	102 $\pm$ 0.2	118 $\pm$ 0.4
Germination index (%)	100 $\pm$ 0.1	102 $\pm$ 0.2	118 $\pm$ 0.1

Table 4. Phytotoxicity of biosurfactant isolated from *C. tropicalis* cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil against *Solanum lycopersicum*. Experiments were performed in duplicate and the results represent means $\pm$ standard deviations of the two independent experiments.

Phytotoxicity against <i>Solanum lycopersicum</i>	Biosurfactant concentration (%)		
	1	1.5	2
Seed germination (%)	100 $\pm$ 0.3	100 $\pm$ 0.1	100 $\pm$ 0.2
Root elongation (%)	132 $\pm$ 0.2	145 $\pm$ 0.1	157 $\pm$ 0.3
Germination index (%)	132 $\pm$ 0.3	145 $\pm$ 0.3	157 $\pm$ 0.4

Table 5 - Antimicrobial activity of the biosurfactant produced by *Candida tropicalis*.

Microorganism	Biosurfactant concentration (%)/Inhibition diameter (mm)		
	1	1.5	2
<i>Pseudomonas</i> sp.	13.0±0.3	18.0±0.2	24.0±0.4
<i>Salmonella typhimurium</i> UCP 6017	16.0±0.4	23.0±0.3	25.3±0.1
<i>Serratia marcescens</i> UCP 1549	18.0±0.2	27.0±0.2	35.0±0.1
<i>Escherichia coli</i>	15.5±0.5	24.0±0.2	28.0±0.3
<i>Lactobacillus</i> sp.	19.0±0.4	29.0±0.1	39.0±0.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.0±0.3	19.3±0.3	24.0±0.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12.5±0.1	18.0±0.4	23.0±0.3
<i>Bacillus licheniformis</i> UCP 1013	11.0±0.2	15.0±0.3	18.0±0.1
<i>Candida albicans</i>	17.5±0.1	25.0±0.3	33.0±0.2
<i>Candida lipolytica</i>	14.3±0.2	18.0±0.3	23.7±0.2

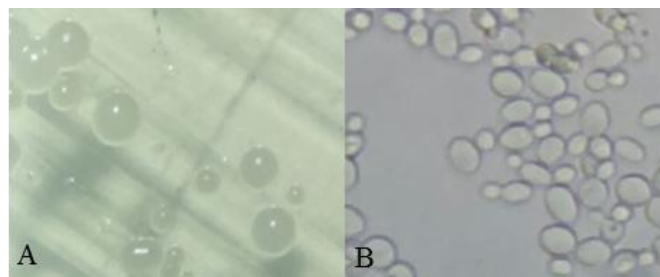


Figure 1. Colonies of yeast strain *Candida* sp. on Yeast Mold Agar medium (A) and observation at optic microscopy (40X) (B).

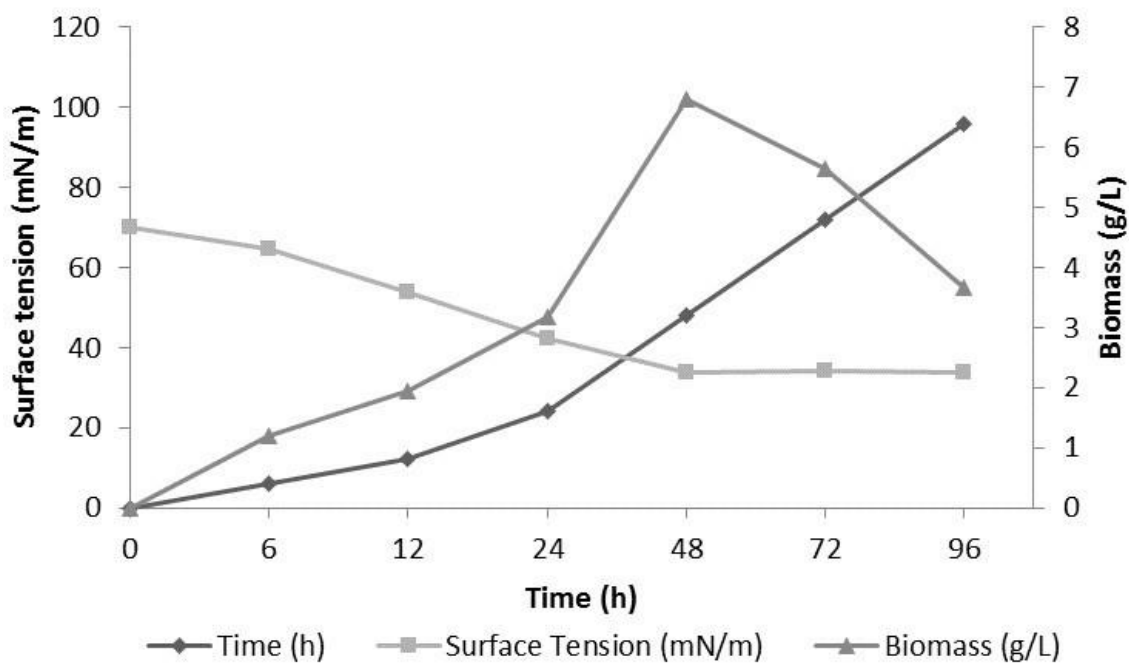


Figure 2. Growth, surface tension and yield of biosurfactant isolated from *C. tropicalis* cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil.

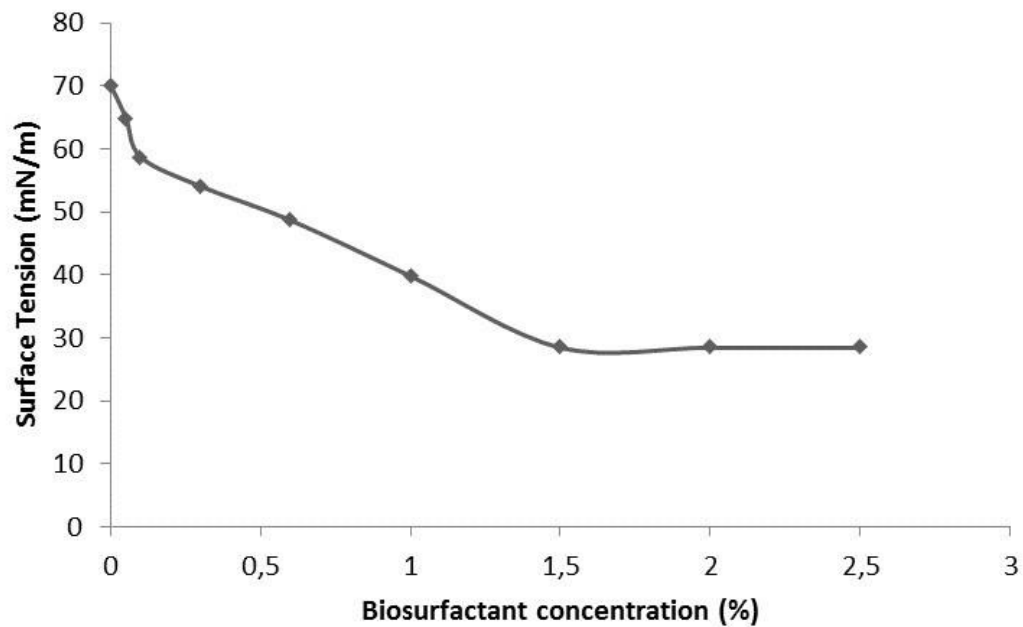


Figure 3. Surface tension versus concentration of the biosurfactant isolated from *C. tropicalis* cultured in mineral medium with 3% whey, 7% cassava wastewater and 10% soybean post frying oil.

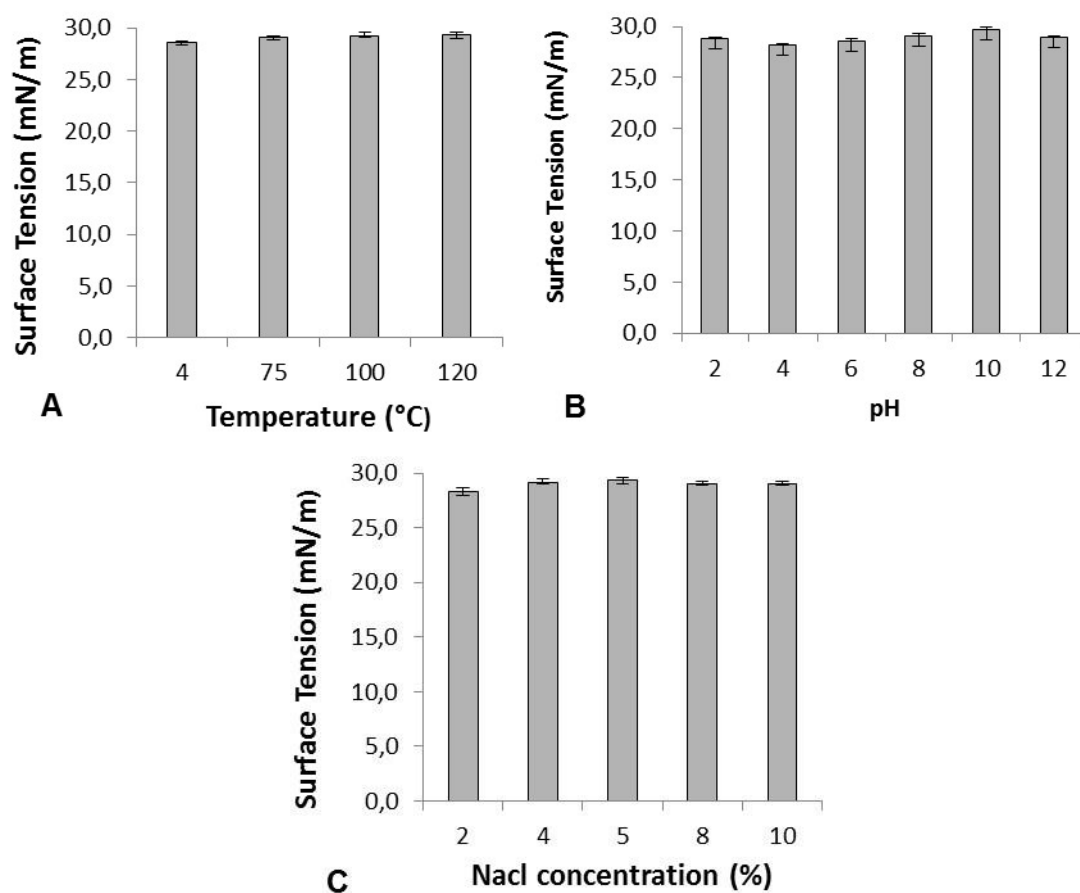


Figure 4. Stability of surface tension of biosurfactant produced by *Candida tropicalis* using whey, cassava wastewater and soybean post frying oil. Influence of temperature (A), pH (B) and sodium chloride concentrations (C) on surface tension stability.

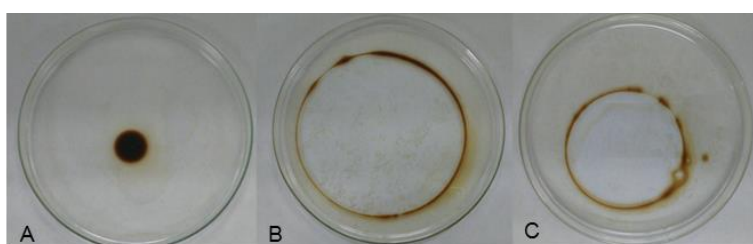


Figure 5. Oil displacement activity of crude biosurfactant produced by *C. tropicalis*. Motor oil droplet without application of surfactant (A), after dispersion with synthetic surfactant (B) and after dispersion with crude biosurfactant produced by *C. tropicalis* (C).

4. CONCLUSÕES GERAIS

- A partir de sedimentos de mangue do Rio Formoso foi isolada e identificada a levedura *Candida tropicalis* de acordo com a identificação molecular.
- *C. tropicalis* mostrou potencial para biodegradar petroderivados (diesel e biodiesel) sugerindo sua aplicação biotecnológica na biorremediação de ambientes contaminados.
- *C. tropicalis* demonstrou habilidade para utilizar resíduos agro-industriais (soro de leite, manipueira e óleo de soja pós-fritura) como substratos para a produção de biossurfactante.
- O biossurfactante produzido por *C. tropicalis* demonstrou habilidade para reduzir a tensão superficial a 28,8 mN/m em meio mineral suplementado com 3% de soro de leite, 7% de manipueira e 10% de óleo pós-fritura.
- O biossurfactante produzido foi identificado como polimérico, com uma composição de 51% proteínas, 37% lipídeos e 11% carboidratos, com uma concentração micelar crítica de 1,5%.
- O biossurfactante produzido demonstrou estabilidade na redução da tensão superficial frente a diferentes valores de pH, temperatura e NaCl. Além, mostrou excelentes propriedades antimicrobianas indicando sua potencial aplicação no setor industrial.
- O biossurfactante produzido não mostrou toxicidade frente a sementes de *Brassica oleracea*, *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicum*.

5. ANEXOS

Dear Daylin Rubio Ribeaux,

We are pleased to inform that your paper entitled:

"Biotechnological production of biosurfactant in economic medium by *Candida* sp. and evaluation of biodegradation potential of petro derivatives"

related to a work presented during the last VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015 (Barcelona, Spain, 28-30 October 2015), has been accepted for publication in the Proceedings Book, which will be entitled: "Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms".

The book will be published and internationally distributed by BrownWalker Press, and it is expected to be released in spring 2016.

Meanwhile, the Publisher requests you to transfer the copyright of your paper. Please read and fill in the copyright form attached to this email. For jointly authored material, all joint contributors should sign, or one of the contributors should sign as authorized agent for the others.

Once filled in, please send back the form to the email conference@biomicroworld2015.org or the fax number: +34 924 263053 no later than 12 February 2016.

As soon as the book is released, you will be informed about all the necessary details for full citation of your paper.

Thank you very much for your contribution to the book.

Best regards,

Aurora

Solano

BioMicroWorld2015

Conference Phone: +34 924

25 86 15

Fax: +34 924 26 30 53

e-mail:

conference@biomicroworld2015.org

<http://www.biomicroworld2015.org>

TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO

-XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental (ENAMA 2014) João Pessoa, 2014. Biotechnological potential of *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 for biosurfactant production using agro-industrial wastes. Rodríguez, D.M., Andrade, R.F.S., Ribeiro, D.L.R., Ribeiro, D.R., Figueiredo, A.L., Araújo, H.W.C., Takaki, G.M.C.

-III Fórum Mundial de Educação Profissional e Tecnológica, Pernambuco, Brasil, 2015. Aproveitamento de resíduos agro-industriais por *Candida* sp. na produção de biossurfactante com potencial aplicação na biorremediação. Daylin Rubio Ribeiro, Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Dayana Montero Rodríguez, Goretti Sonia da Silva, Galba Maria de Campos Takaki.

-8º Encontro Internacional das Águas, Pernambuco Brasil, 2015. Tratamento biológico aeróbio da manuseira por consorcio microbiano autóctone. Roberto Albuquerque Lima, Sergio Carvalho de Paiva, Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, Daylin Rubio Ribeiro, Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Alexandra Amorim Salgueiro.

-8º Encontro Internacional das Águas. Aplicação do biossurfactante produzido por *Candida* sp. na dispersão de poluente hidrofóbico em água. Daylin Rubio Ribeiro, Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Dayana Montero Rodriguez, Goretti Sonia Silva, Sergio Carvalho de Paiva, Galba Maria de Campos Takaki.

-XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología, Cartagena de Indias, Colombia. 2014. Isolation and characterization of yeasts in mangrove sediments of the Rio Formoso, Pernambuco. Daylin Rubio Ribeiro, Deborah de Souza Pereira Silva, Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Dayana Montero Rodríguez, Goretti Sonia Silva, Paulo Henrique da Silva, Thayse Alves de Lima e Silva, Galba Maria de Campos- Takaki.

-XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología, Cartagena de Indias, Colombia. 2014. Microbial lipids produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549: a promising potential feedstock for biodiesel production. Dayana Montero Rodríguez, Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Roberto Albuquerque Lima, Grayce Kelli Barbosa da Silva, Daylin Rubio Ribeiro, Paulo Henrique da Silva, Hélvia Waleska Casullo de Araújo, Galba Maria de Campos-Takaki.

-VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Research (BioMicroWorld 2015), Madri, Espanha, 2015. Kinetics of lipid accumulation of *Candida lipolytica* (UCP 0988) in synthetic medium and industrial waste. A. F. de Souza; D. R. Ribeiro; M. Luna; H. M. Galindo; J.R.N. Cavalcanti Filho; N.B. de Gusmão; G.M. Campos-Takaki.

-VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Research (BioMicroWorld 2015), Madri, Espanha, 2015. A low-cost solid fermentation medium for potential prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 D. Montero-Rodríguez, R. F. S. Andrade, D. Rubio-Ribeaux, R. A. Lima, D. L. R. Ribeiro, G. K. B. Silva, H. W. C. Araújo, G. M. Campos-Takaki.

-VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Research (BioMicroWorld 2015), Madri, Espanha, 2015. Biotechnological production of biosurfactant in economic medium by *Candida* sp. and evaluation of biodegradation potential of petro derivatives. D. Rubio-Ribeaux, R. F. S. Andrade, D. Montero- Rodríguez, M. A. C. Luna, M.

A. Phele, A. Antunes, L. O. Franco, M. A. B. Lima, and G. M. Campos.

-IBIC 5th International Conference on Industrial Biotechnology, 2016. Conversion of agro-industrial wastes by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 into lipids suitable for biodiesel production. Montero-Rodriguez D., Andrade R., Lima R., Silva G., Rubio- Ribeaux D., Silva T., Araujo H. , Campos Takaki G.