

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Candida
lipolytica* (UPC 0988) UTILIZANDO ÓLEO DE PEQUI
COMO FONTE ALTERNATIVA DE CARBONO**

WILLMA JOSÉ DE SANTANA

**Recife
2012**

WILLMA JOSÉ DE SANTANA

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Candida lipolytica* (UCP 0988)
UTILIZANDO ÓLEO DE PEQUI COMO FONTE ALTERNATIVA DE
CARBONO**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas nível Doutorado da
Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki

**RECIFE
2012**

Santana, Willma José de

Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* (UPC 0988) utilizando óleo de pequi como fonte alternativa de Carbono/ Wilma José de Santana. – Recife: O Autor, 2008.

125 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Galba Maria de Campos Takaki

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Surfactantes 2. Biotecnologia 3. Óleos vegetais I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo II. Takaki, Galba Maria de Campos III. Título.**

668.1 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-142

**PRODUÇÃO DE BIODERACTANTE POR *Candida lipolytica* (UCP 0988)
UTILIZANDO ÓLEO DE PEQUI COMO FONTE ALTERNATIVA DE
CARBONO**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Leoni Asfora Sarubbo
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Bioquímica

Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Nutrição

Prof^a. Dr^a. Keila Aparecida Moreira
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Unidade Acadêmica de Garanhuns

Suplente:

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus

A Deus por estar sempre ao meu lado, concedendo a vida e esta oportunidade em minha carreira profissional. Ao Senhor devo tudo o que sou. Muito obrigada por tudo em minha vida. Te amo acima de todas as coisas.

À minha Mãe (*in memorian*)

A minha querida Mãe Maria José de Santana, sempre foi a fonte de minha vida, pois depois de sua partida a vida se tornou sem sentido, mesmo sozinha e distante de meus familiares, procuro pensar sempre em sua presença, como fonte de inspiração, gostaria que ela estivesse ao meu lado neste momento tão gratificante da vida. Amo-te muito e sei que um dia te encontrarei de novo.

Ao meu querido pai

Agradeço-te tudo que fizeste por mim, te amo muito e dedico esta tese a você e a mamãe, pois vencer os obstáculos, foram vossos ensinamentos, nunca os esquecerei. Que Deus te conceda tudo e muitos anos de vida para que possamos viver momentos como este.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos: Willamar, Washington e Wellington. A Minha cunhada Adriana Magno e meu cunhado Jefferson Luís. Aos meus sobrinhos pelos momentos de lazer e carinho: Wanessa, Wellington Júnior e meu Afilhado Thiago que sempre me faz sorrir com seu jeito especial de ser, a todos meu muito obrigado;

Ao meu esposo José Sampaio Gondim pela atenção e carinho durante o desenvolvimento deste trabalho;

A minha Cunhada Valzenir Gondim pelos momentos especiais de carinho e apoio. Diante de tantos obstáculos sempre me enfatizou que a vida é passageira, porém temos que lutar para sermos felizes ao lado de Deus, a você Val meu sincero agradecimento;

À minha orientadora Dr^a Ana Lúcia Porto, pela orientação no decorrer deste Doutorado;

À minha Co-orientadora Dr^a Galba Maria Takaki, pelo incentivo, orientação, atenção, amizade e por todos os conhecimentos científicos transmitidos durante todos esses anos;

Ao Prof. Dr. Benício de Barros Neto, pela atenção, orientação nos dados estatísticos;

À Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de realização deste doutorado;

À coordenadora do Doutorado em Ciências Biológicas Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos pela compreensão no desenvolvimento deste trabalho;

À secretária do doutorado, Adenilda Eugênia de Lima pela compreensão e ajuda durante todos estes anos;

Aos professores do Programa de Pós – graduação do Centro de Ciências Biológicas, pelos ensinamentos durante o curso;

Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J. pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) para realização deste trabalho;

Aos funcionários do NPCIAMB, Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim de Santana e Sônia Maria de Souza, pela atenção e apoio durante o decorrer do trabalho. Aos amigos do Núcleo de pesquisas Ambientais (NPCIAMB), Adriana, Marta, Hélvia e Ana Belle pelos momentos de apoio nas horas do desenvolvimento deste trabalho, em especial: Raquel Rufino Diniz pela amizade e ajuda na realização deste trabalho.

À técnica de laboratório de Microbiologia da FMJ-Ce Cremilda Delzira por todo apoio e amizade nesta etapa de minha vida;

Ao diretor do CENTEC Faculdade de Tecnologia do Cariri, Profº Cícero Alencar Leite por todo apoio ao desenvolvimento desta tese, ao Profº Afonso Bruno diretor da faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte-CE, pelo apoio e A Diretora da Faculdade leão Sampaio profª Sônia Romero pelos momentos de compreensão e apoio, a todos muito obrigado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro na realização deste trabalho;

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iii
1- INTRODUÇÃO	01
2- OBJETIVOS	03
2.1- Objetivo Geral	03
2.2- Objetivos Específicos	03
3- REVISÃO DA LITERATURA	04
3.1- Biossurfactantes	04
3.2- Classificação química dos Biossurfactantes	05
3.3- Propriedades dos biossurfactantes	05
3.4 – Função fisiológica dos biossurfactantes	08
3.5 - Microrganismos como ferramentas biotecnológicas na produção de surfactantes	09
3.6 - Produção de biossurfactante	15
3.6.1 - Produção de biossurfactantes por <i>Candida lipolytica</i>	17
3.6.2. – Substratos utilizados na produção de biossurfactantes	19
3.6.2.1 – Substratos hidrossolúveis	19
3.6.2.2 – Substratos lipossolúveis	19
3.6.2.2.1 – Óleo de pequi	20
3.6.2.2.2 - Características Botânicas do Pequi	21
3.7 – Vantagens na utilização dos biossurfactante	23
3.8 – Aplicações dos biossurfactantes	24
3.9 – Perspectivas econômicas dos biossurfactantes	27
REFERÊNCIAS	28
ARTIGO I Efeito do óleo de Pequi (<i>Caryocar coriaceum</i>) na produção de biossurfactante por <i>Candida lipolytica</i> (UCP 0988)	47

ARTIGO II

Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* (UCP 0988) utilizando o óleo da amêndoa de pequi (*Caryocar coriaceum*) como susbtrato 71

ARTIGO III

Aplicação de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando óleo da amêndoa do pequi (*Caryocar coriaceum*) na remoção de solo contaminado 97

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 01 - Principais classes de microrganismos e biossurfactantes produtores	07
Tabela 02 – Tensões superficiais do líquido metabólico de vários microrganismos produtores de biossurfactante	14
Tabela 03 – Produção de biossurfactante por <i>Candida lipolytica</i>	18
Tabela 04 - Composição dos ácidos graxos nos óleos do endocarpo (08,1%) e da amêndoa (44,2%) do pequi <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.	22
Tabela 05 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes	26

RESUMO

A produção de biossurfactantes tem sido amplamente investigada nos últimos anos, considerando seu potencial biotecnológico e suas aplicações nos mais diversos setores industriais. O objetivo desta pesquisa foi à produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* (UCP 0998), utilizando óleo da amêndoa e do endocarpo do pequi como fonte alternativa de carbono durante 72 horas a 150 rpm e 28° C através de planejamentos fatoriais. No primeiro planejamento fatorial completo 2^2 foram utilizadas as variáveis óleo da amêndoa e do endocarpo do pequi e glicose. Os resultados com o óleo da amêndoa do pequi, demonstraram uma tensão superficial de 30,51 mN/m, no ensaio 4 (20% de óleo e 1% de glicose), o melhor índice de emulsificação foi obtido com óleo de canola 50%, a produção de biomassa foi de 0,4396g/L. As atividades enzimáticas produzidas pela *Candida lipolytica* para esterase foi de 30mm e para lipase 15mm. Para óleo do endocarpo do pequi verificou-se a menor tensão superficial 31,96 mN/m, no ensaio 3 (10% de óleo e 1% de glicose), com o melhor índice de emulsificação com óleo de milho de 50%, a produção de biomassa foi 0,5107g/L. As atividades enzimáticas esterase foi de 23mm e de lipase 15mm. Foi realizado um segundo planejamento fatorial meia fração 2^{5-1} selecionando o óleo da amêndoa do pequi para aumentar a produção do biossurfactante, onde as variáveis avaliadas foram 5% da amêndoa do pequi, 1% de glicose, pH= 4,5, inoculo 10^7 e meio mineral (2:1 v/v) água do mar e água destilada tendo como variáveis resposta tensão superficial, índice de emulsificação e atividade de emulsificação. Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante apresentou uma tensão superficial 27,66 mN/m, no ensaio 11 (5% de óleo da amêndoa do pequi e 1% de glicose), índice de emulsificação 27%, atividade de emulsificação 3,790 U.A.E. A partir do melhor resultado do planejamento fatorial 2^{5-1} , um novo planejamento fatorial 2^2 foi realizado, com a finalidade de otimizar o meio de produção do biossurfactante. Os resultados demonstraram que o ensaio 6 (4% de óleo e 2% de glicose), apresentou a menor tensão superficial 30,32 mN/m e um índice de emulsificação de 31%. A estabilidade do biossurfactante foi verificada sob condições específicas de pH, temperatura e concentrações de NaCl utilizando como parâmetro o índice de emulsificação. Os resultados demonstraram que o pH = 12 emulsificou 89%, 8g de NaCl 34% e a temperatura a 0° C 70%. A aplicação do biossurfactante foi avaliada na remoção de areia contaminada com petróleo utilizando um tratamento com condições pré-estabelecidas 5% da amêndoa do pequi, 1% de glicose, pH= 4,5, inoculo 10^7 e meio mineral (2:1 v/v) água do mar e água destilada, após 32 horas ocorreu uma remoção de 58,17%, o melhor índice de emulsificação ocorreu com 8 horas 29,41% utilizando óleo de milho e com 24 horas 25,80% utilizando óleo de canola. Não houve formação de emulsão quando foi utilizado n-hexadecano. O biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* cultivada em óleo de pequi, representa uma alternativa de produção de um biopolímero com perspectivas para aplicações nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e em biorremediação de solos contaminados por óleos.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*, biossurfactante, óleo de pequi, remoção.

ABSTRACT

The biosurfactant production has been investigated thoroughly in the last years, considering his/her biotechnological potential and their applications in the most several industrial sections. The objective of this research went to the biosurfactante production for *Candida lipolytica* (CPU 0998), using oil of the almond and of the endocarp of the pequi as alternative source of carbon for 72 hours to 150 rpm and 28th C through factorial plannings. In the first complete factorial planning 2^2 were used the variables oil of the almond and of the endocarp of the pequi and glucose. The results with the oil of the almond of the pequi, demonstrated a superficial tension of 30,51 mN/m, in the rehearsal 4 (20% of oil and 1% of glucose), the best emulsification index was obtained with oil of canola 50%, the biomass production was of 0,4396g/L. The enzymatic activities produced by the *Candida lipolytica* for esterase went of 30mm and for lipase 15mm. For oil of the endocarp of the pequi it was verified to smallest tension superficial 31,96 mN/m, in the rehearsal 3 (10% of oil and 1% of glucose), with the best emulsification index with wheat germ oil of 50%, the biomass production was 0,5107g/L. The activities enzymatic esterase was of 23mm and of lípase 15mm. A second planning factorial stocking fraction 2^{5-1} was accomplished selecting the oil of the almond of the pequi to increase the production of the biosurfactant, where the appraised variables were 5% of the almond of the pequi, 1% of glucose, pH = 4,5, linoculate 10^7 and half mineral (2:1 v/v) water of the sea and distilled water tend as variables answer superficial tension, emulsification index and emulsification activity. The obtained results demonstrated that the biosurfactant presented a tension superficial 27,66 mN/m, in the rehearsal 11 (5% of oil of the almond of the pequi and 1% of glucose), index of emulsification 27%, emulsification activity 3,790 U.A.E. starting from the best result of the factorial planning 25-1, a new factorial planning 2^2 were accomplished, with the purpose of optimizing the middle of production of the biosurfactant. The results demonstrated that the rehearsal 6 (4% of oil and 2% of glucose), it presented to smallest tension superficial 30,32 mN/m and an index of emulsification of 31%. The stability of the biosurfactant was verified under conditions pH specifics, temperature and concentrations of NaCl using as parameter the emulsification index. The results demonstrated that the pH = 12 emulsified 89%, 8g of NaCl 34% and the temperature the 0° C 70%. the application of the biosurfactant was evaluated in the removal of polluted sand with petroleum using a treatment with pré-established conditions 5% of the almond of the pequi, 1% of glucose, pH = 4,5, I inoculate 10^7 and half mineral (2:1 v/v) water of the sea and distilled water, after 32 hours happened a removal of 58,17%, the best emulsification index happened with 8 hours 29,41% using wheat germ oil and with 24 hours 25,80% using canola oil. There was not emulsion formation when n-hexadecano was used. The biosurfactant produced by *Candida lipolytica* cultivated in pequi oil, it represents an alternative of production of a biopolymer with perspectives for applications in the pharmaceutical industries, cosmetics and in bioremediation of polluted soils for oils.

Word-key: *Candida lipolytica*, biosurfactant, pequi oil, removal

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes possuem estrutura molecular constituída por grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro ou micro emulsões, ação espumante, solubilidade e detergência (LANG & WULLBRANDT, 1999).

Os biossurfactantes são geralmente constituídos por lipídeos, sendo produzidos por organismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e possuem a propriedade de emulsificar água e óleo. Diversos tipos de hidrocarbonetos alifáticos são potenciais substratos com variações quanto ao tamanho da cadeia, grau de ramificações e número de duplas ligações. Alguns microrganismos que crescem em substratos oleaginosos apresentam complexos enzimáticos responsáveis pela produção de substâncias surfactantes. Estas substâncias realizam a emulsificação, ou seja, formam pequenas gotas de óleo na água, o que aumenta a área de superfície entre as duas fases, sendo estas áreas mais eficientes para o crescimento microbiano (COOPER & ZAJIC, 1980). Os surfactantes possuem uma grande variedade de estruturas químicas tais como: glicolipídios, lipopeptídeos, complexos proteínas – polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros, podem ser produzidos por microrganismos quando cultivados em substratos insolúveis (óleo, resíduos e hidrocarbonetos) e solúveis (carboidratos). Apresentam uma grande variedade de propriedades e funções fisiológicas entre as várias famílias destes biopolímeros (KIM et al., 2000). Constituem uma classe de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais, uma vez que estes polímeros possuem propriedades para aplicação no controle.

Estudos voltados para a produção de tensoativos têm se intensificado com a finalidade de emprego na indústria, principalmente, do petróleo. Essas biomoléculas podem ser empregadas tanto na recuperação de petróleo quanto em processos de biorremediação e dispersão de derrames de óleo em terra e em mar (GUDIÑO & CRISPÍN, 2001). A dificuldade de biodegradação de compostos hidrofóbicos se deve a ligação destes as partículas do solo e a solubilidade em água, resultando numa biodisponibilidade reduzida para os

microrganismos, o que pode retardar ou até mesmo paralisar o processo de degradação (DANIEL *et al.*, 1998; MAKKAR & CAMEOTRA, 1999 b).

Os biossurfactantes têm sido testados em muitas aplicações ambientais, como na biorremediação, na dispersão de manchas oleosas e na recuperação de petróleo, substituindo os surfactantes químicos. Além disso, também, podem ser utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas, de detergentes e agrícolas (TULEVA *et al.*, 2002).

A busca por surfactantes naturais em substituição aos surfactantes sintéticos derivados do petróleo tem sido assunto de grande interesse da biotecnologia, em função da necessidade de preservação ambiental, por apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser aplicados em uma variedade de processos industriais; entretanto, ainda não são amplamente utilizados, devido aos altos custos de produção, associados aos métodos ineficientes e substratos dispendiosos (RON & ROSENBERG, 2001; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

A tecnologia utilizada para produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* vem sendo realizada com sucesso devido ao potencial em produzir biopolímeros, com alta atividade de emulsificação, utilizando substratos agroindustriais como fonte de carbono: óleos vegetais e resíduos industriais. A otimização da produção de biossurfactantes vêm sendo amplamente investigados no Brasil por um grupo de pesquisadores da Região Nordeste (VANCE-HARROP *et al.*, 1997; SARUBBO *et al.*, 1997; SARUBBO *et al.*, 1999; VANCE-HARROP *et al.*, 2000; SARUBBO *et al.*, 2001; VANCE-HARROP, 2003; RUFINO *et al.*, 2003; VANCE – HARROP, 2004; RUFINO, 2006; LUNA, 2007).

Neste contexto, considerando a importância da utilização dos substratos agroindustriais na produção de biossurfactantes, neste trabalho foi investigada a utilização do óleo de amendoa do pequi, através de planejamento fatorial, para obtenção de um novo meio de produção de um biopolímero com possibilidades de aplicação na área ambiental e ou industrial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988 utilizando o óleo da amendoa do pequi (*Caryocar coriaceum*), como fonte alternativa de carbono, na formulação de um meio de baixo custo, visando a aplicação na remoção de contaminantes ambientais.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar a utilização do substrato agroindustrial óleo de amêndoa do pequi como fonte alternativa de carbono através de planejamento fatorial na produção de biossurfactante por *C. lipolytica*;

Avaliar a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*, a partir do substrato selecionado, associado aos diferentes constituintes para a formulação de um meio de produção de baixo custo;

Determinar o perfil de crescimento de *C. lipolytica* e cinética de produção de biossurfactante no meio de baixo custo selecionado;

Avaliar as propriedades físico-químicas do biossurfactante tais como: atividade de emulsificação, tensão superficial, estabilidade;

Avaliar a eficiência do biossurfactante produzido na remoção de óleo de areia contaminada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, sintetizados por microrganismos contendo partículas hidrofóbicas (apolar) e hidrofílicas (polar), reduzindo a tensão superficial e interfacial entre moléculas (GAUTAM et al. 2006b).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridades (óleo/água e água/óleo) (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998). A formação de um filme molecular reduz a tensão superficial e interfacial sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (RON & ROSENBERG, 2001).

Os compostos de origem microbiana denominados de biossurfactantes são produtos metabólicos de microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras e exibem propriedades surfactantes com alta capacidade emulsificante e redutora da tensão superficial (HOLMBERG, 2002).

Vários compostos com propriedades tenso-ativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídeos) e também no organismo humano (saís biliares), sendo considerados surfactantes naturais (KOSARIC, 1996).

A grande maioria dos surfactantes hoje disponível são sintetizados a partir de derivados de petróleo. Entretanto, as novas legislações de proteção ao meio ambiente, bem como a preocupação ambiental entre os consumidores, têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A produção mundial de biossurfactante está em torno de 147 milhões de toneladas de óleos e gorduras por ano, e em torno de 77,3% dessa produção é de origem vegetal (CAMPOS - TAKAKI, 2007). A maior utilização dos surfactantes se concentra na indústria de petróleo e de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de cosméticos e produtos de higiene (BOGNOLO, 1999).

Nos países industrializados 70 – 75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que nos países em desenvolvimento os compostos de origem natural predominam (NITSCHKE & PASTORE, 2002; NITSCHKE *et al.*, 2005). Entretanto, as indústrias e as organizações de defesa do meio ambiente estão muito interessadas em encontrar uma forma de produzir surfactantes menos tóxicos, utilizando fontes alternativas renováveis (DELEU & PAQUOT, 2004).

3.2 Classificação química dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua composição química ou origem microbiana (Tabela 1). As classes principais são: glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (SOON *et al.*, 2004).

Os surfactantes podem ser aniônicos, com carga negativa, catiônicos com carga positiva e negativa. O maior grupo é formado por compostos dos tipos aniônico e neutro, enquanto que a utilização dos catiônicos é muito pequena (URUM, 2004).

Os surfactantes podem atuar na interface entre dois líquidos imiscíveis correspondendo a sua natureza anfipática. O grupo polar da molécula, constituído de mono, di ou polissacarídeo, ácidos carboxílicos, aminoácidos ou peptídeo, tem afinidade pela fase aquosa (hidrofílica) na qual se dissolve, enquanto que a porção apolar (hidrofóbica), composta por uma cadeia de hidrocarboneto, tem afinidade pela fase orgânica (DELEU & PAQUOT, 2004).

3.3 Propriedades dos biossurfactantes

Os surfactantes apresentam propriedades que facilitam a formação de uma emulsão devido à capacidade de reduzir a tensão superficial entre as duas fases distintas, estabilizando a emulsão formada (CRUEGER & CRUEGER, 1984; FIECHTER, 1992). Muitas estruturas e propriedades dos biossurfactantes diferem dos surfactantes sintéticos, fornecendo novas possibilidades para aplicações industriais (MERCADÉ, 1994).

A Concentração Micelar Crítica (CMC) é o parâmetro mais utilizado para avaliar a atividade surfactante, reconhecido como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a menor tensão superficial (LIN, 1996).

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

TIPO DE BIOSSURFACTANTE	MICROORGANISMOS
GLICOLIPÍDEOS	
Ramnolipideos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sorolipideos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.
Trealolipideos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp
LIPOPEPTÍDEOS E LIPOPROTEINAS	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDEOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDEOS	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
SURFACTANTES POLIMÉRICOS	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
SURFACTANTES PARTICULADOS	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Fonte: DESAI *et al.*, 1997.

Os surfactantes eficientes apresentam uma baixa CMC, determinando o mínimo de concentração necessária para formar micelas (STAMPFLI & NERSTEN, 1995).

A CMC é uma propriedade que caracteriza um surfactante, pode ser obtida a partir de um gráfico semi-logarítmico da tensão superficial de uma solução versus a concentração surfactante (KOSARIC, 1996).

A eficiência de um surfactante é medida através da CMC que varia de 1 a 2000 mg/L, enquanto que a sua efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais as quais devem atingir valores em torno de 31 e 1 mN/m, respectivamente (RON & ROSENBERG, 2001). O biossurfactante que contém uma baixa concentração micelar crítica (CMC) é promissor substituto dos surfactantes sintéticos. Uma larga quantidade de óleos das indústrias alimentícias, óleos residuais, sebo, óleos marinhos, Sabões em estoques, farinha de mandioca são importantes para produção de biossurfactante (GAUTAM *et al.*, 2006).

As propriedades químicas e físicas dos biossurfactantes, como a redução da tensão superficial, a capacidade espumante, a capacidade emulsificante e estabilizante, concentrações micelares críticas baixas e solubilidade, são muito importantes na avaliação de seu desempenho e na seleção de microrganismos com potencial de produção destes agentes (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

3.4 Função fisiológica dos biossurfactantes

A função fisiológica dos biossurfactantes ainda não está completamente elucidada, porém algumas funções têm sido atribuídas, dentre elas a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitam o crescimento de microrganismos nestes substratos (COOPER *et al.*, 1981).

Atividade antibiótica é uma função demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos. A surfactina de *B. subtilis* e os ramnolipídeos de *P. aeruginosa*, funcionam como antibióticos solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfactantes no meio,

os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN, 1996).

O transporte de hidrocarbonetos, função atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *Candida tropicalis*, foi detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido-graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte destes hidrocarbonetos. (FIECHTER, 1992),

Uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar, viabilizada graças a aderência e liberação da célula à superfícies. Os elementos mais importantes nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsável pela aderência das células a superfícies. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir dependendo da sua necessidade e encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes, ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG & RON, 1999).

O importante papel fisiológico dos biossurfactantes é permitir aos microrganismos crescerem em substratos insolúveis em água através da capacidade de redução da tensão superficial entre as fases, tornando o substrato mais disponível para a ingestão e metabolismo (TULEVA *et al.*, 2002). O alto e o baixo peso molecular dos biossurfactantes são de grande interesse devido as suas propriedades físicoquímicas e biológicas, podendo ser bem explorados nas indústrias alimentícias, de cosméticos e farmacêuticas (LANG, 2002).

3.5 Microrganismos como ferramentas biotecnológicas na produção de surfactantes

A utilização de novas tecnologias para obtenção de surfactantes a partir de microrganismos e suas aplicações tem sido alvo de especulações em várias indústrias (SEN & SWAMINATAN, 2005). Vários produtos microbiológicos com propriedades surfactantes foram identificados no passado. Os microrganismos mais estudados para a produção de biossurfactantes: *Arthrobacter*,

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Candida lipolytica* e *Torulopsis bombicola* (MULLIGAN, 2005).

A habilidade de fungos para degradar hidrocarbonetos foi relatada em 1906 por Rahn, que encontrou fungos do solo que degradavam hidrocarbonetos como única fonte de carbono (ZOBELL, 1946). Fungos filamentosos também podem apresentar a capacidade de produzir biossurfactantes, estes podem ser isolados de locais contaminados com óleo, realizando processos de biorremediação natural, como o *Cladosporium resinae*, conhecido como "fungo do querosene" (MURIEL et al., 1996).

Os biossurfactantes produzidos por uma variedade de microrganismos podem utilizar uma diversidade de substratos, desde os carboidratos até os substratos insolúveis (HITSATSUK, 1971; COOPER & PADDOCK, 1984; JAVERI & JENNEMAN, 1985). Muitos microrganismos produzem polímeros particularmente durante o crescimento em substratos imiscíveis. A maioria dos biossurfactantes encontrados são produzidos por bactérias, seguindo-se as leveduras e alguns fungos filamentosos (Tabela 2) (GUERRA – SANTOS & KAPPELI, 1986; SYLDATK & WAGNER, 1987).

Dentre as bactérias, a *Pseudomonas aeruginosa* tem demonstrado grande potencial como produtora de compostos ativos de superfície. Os estudos realizados demonstram sua habilidade de produzir glicerol, manitol (ROBERT et al., 1989), glicolípídios (RAMANA & KARANTH, 1989) e ramnolípídeos utilizando glicose como fonte de carbono e energia (GUERRA – SANTOS & KAPPELI., 1986).

Várias espécies de leveduras, como a *Candida lipolytica*, *Torulopsis bombicola* (COOPER & PADDOCK, 1984), apresentam complexos bioquímicos em suas paredes celulares, facilitando a produção de biossurfactante com substratos oleaginosos.

Tradicionalmente os hidrocarbonetos são bastante utilizados para produção de biossurfactantes. Contudo resíduos agroindustriais como resíduo da refinação do óleo de olívia são eficientes para produção de biossurfactante produzidos por *Pseudomonas* (MANRESA, 1994).

Bento e Gaylarde (1996) observaram a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas* em meio com glicose e óleo diesel. Para produção de biossurfactantes foi utilizado a *Pseudomonas aeruginosa* em meio

suplementado com glicose e n-hexadecano como substratos insolúvel e solúvel. A amostra reduziu a tensão superficial de 57 para 27 mN/m, sendo a produção de biossurfactante de 0,97 g/L (BANAT, 1995 a; SUDHAKAR-BABU *et al.*, 1996; CIRIGLIANO & CARMAN, 1985) isolaram um bioemulsificante produzido por *Candida lipolytica* cultivada em meio contendo n-hexadecano, demonstrando perspectivas e potencial para o uso em sistemas alimentares, enquanto MARÇAL (1991), demonstrou a produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* com alta atividade de emulsificação utilizando substratos regionais (babaçu, coco e dendê) SARUBBO *et al.*, (1999; 2001), utilizaram a *C. lipolytica* na produção de agentes surfactantes em meios contendo óleo vegetal de babaçu e glicose como substratos.

Duas linhagens de *Candida lipolytica* (1055 e 1120) foram utilizadas na produção de bioemulsificante, utilizando meio suplementados com de óleo de babaçu e 1% de glicose como fonte de carbono. A produção de bioemulsificante foi observada na fase exponencial e fase estacionária de crescimento (SARUBBO *et al.*, 1997).

Kitamoto e colaboradores (1999) estudaram a produção de biossurfactante por *Candida antarctica* quando cultivada em óleo de soja como fonte de carbono. O biossurfactante isolado consistia em glicolipídeos.

A *Candida bombicola* destaca-se entre as leveduras produtoras de biossurfactantes (PERSSON *et al.*, 1999). Esta levedura apresentou alto rendimento em biossurfactante (67 g/L) quando este foi produzido a partir de óleo de milho e glicose em fermentador.

Haba e outros pesquisadores (2000) selecionaram 36 microrganismos para produção de biossurfactantes em meio líquido, com 2% de resíduo de óleo de oliva ou óleo de girassol como fonte de carbono, onde este baixou a tensão superficial para 40 mN/m, medida utilizada como critério de seleção. Depois de 72 h horas de crescimento muitas espécies de *Pseudomonas* testadas apresentaram produção de biossurfactante. A condição com o óleo de oliva foi a melhor para o desenvolvimento do microrganismo e para a produção de biossurfactante, apresentando a menor tensão superficial de 35mN/m.

O biossurfactante surfactina produzido por *Bacillus subtilis* é utilizado em tratamento de solos por apresentar baixa toxicidade, biodegradabilidade e por ser eficiente na biodegradação e solubilização (MULLIGAN, 2005).

Sarubbo e colaboradores (2006) estudaram a produção de biossurfactante por *Candida glabrata* isolada de sedimento de mangue, verificou-se a atividade de emulsificação e a tensão superficial. A produção máxima de biossurfactante foi observada em cultivo com caldo contendo óleo e glicose. Atingindo valores de 10,0 g/L a 144 horas a 200rpm. A cultura em caldo contendo células foi examinada e apresentou uma tensão superficial mínima de 31 mN/m e uma atividade de emulsificação de 75%.

Pseudomonas aeruginosa SP4 isolada de petróleo contaminado do solo na Tailândia foram utilizados para produção de biossurfactante a partir de óleo de palmeira como fonte de carbono. O biossurfactante identificado foi ramnolipídeo, o qual reduziu a tensão superficial da água para 29,0 mN/m com uma concentração micelar crítica de aproximadamente 200mg/L e uma boa estabilização do pH (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2007).

Um grupo de culturas de *Bacillus subtilis* (EFBC) produziu o mycosubtilin um antifúngico pertencente aos lipopeptídeos, o qual foi removido continuamente em bioreator após a sua produção e extração completa (GUEZ *et al.*, 2007).

Dois biossurfactantes foram investigados Surfactin (SF) e Ramnolipídeo (RL), para biodegradação de diesel contaminando solo e água. O Ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (J₄), foi o glicolipídeo, enquanto o que foi produzido por *Bacillus subtilis* (ATCC 21332) surfactina (lipoproteína). A tensão superficial baixou para 30 mN/m e a concentração micelar crítica de 45 e 50mg/L para surfactina e ramnolipídeo respectivamente. A biodegradação com adição de surfactin foi de 95%, enquanto com ramnolipídeo foi de 100%. Os resultados confirmaram a eficiência de surfactin e ramnolipídeo na biorremediação em solo e água (WHANG *et al.*, 2008).

O biossurfactante ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* BS₂ foi avaliado para o processo de biorremediação, sendo utilizados na remoção de metais pesados cádmio e chumbo de solos contaminados. O biossurfactante ramnolipídeo removeu 92% de cádmio e 88% de chumbo em solos contaminados. Os ramnolipídeos favorecem a mobilização de metais pesados como cádmio e chumbo de solos. O presente estudo mostrou que o biossurfactante pode ser utilizado para biorremediação de solos contaminados com cádmio e chumbo (JUWARKAR *et al.*, 2007).

Um novo biossurfactante foi produzido por *Klebsiella* sp, isolado a partir de óleo de soja. Para verificar a atividade de emulsificação e a estabilidade do biossurfactante utilizaram-se hidrocarbonetos e óleo refinado. Os resultados demonstraram que a tensão superficial foi reduzida de 72mN/m para 32mN/m em uma concentração de 40mg/l (LEE *et al.*, 2008).

Estudos com *Pseudomonas citronellis* 222 A demonstraram o potencial desse microrganismo na degradação do ferro e na redução da tensão superficial. *Pseudomona aeruginosa* 332C estimulada na presença do ferro também reduziu a tensão superficial (SANTOS *et al.*, 2007).

Experimentos com *Chromobacterium violaceum* cultivado a 30°C a 150 rpm, durante 60 horas utilizando o óleo de pequi como fonte de carbono, produziu um biossurfactante que apresentou um índice de emulsificação de 40% (PAZ & BARBOSA, 2007).

Tabela 2 - Tensões superficiais do líquido metabólico de vários microrganismos produtores de biossurfactantes.

MICROORGANISMO	TENSÃO SUPERFICIAL	REFERÊNCIA
<i>Rhodococcus</i> sp.	28,5	Kuyukina <i>et al.</i> , 2001
<i>P. aeruginosa</i> MM1011	28,0	Tahzibi <i>et al.</i> , 2004
<i>Serratia</i> sp.	34,4	Cunha <i>et al.</i> , 2004
<i>Nocardia</i> sp.	28,0	Kim <i>et al.</i> , 2004
<i>P. aeruginosa</i> UW-1	27,7	Sim <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256	27,2	Sem e Swaminathan, 2005
<i>C.lipolytica</i>	33,0	Mulligan, 2005
<i>B. pumilus</i>	27,0	Mulligan, 2005
<i>P.aeruginosa</i> (MEOR 171)	29,0	Rocha <i>et al.</i> , 1992
<i>P.aeruginosa</i> (MEOR 172)	27,5	Rocha <i>et al.</i> ,1992
<i>B.subtilis</i> (MTCC1427)	28,0	Makkar e Cameotra, 1998
<i>P aeruginosa</i> (PA1)	30,0	Santa Anna <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus</i> sp. JF2	27,0	Jennings e Tanner, 2004
Bactéria Z1	45,0	Lu <i>et al.</i> , 2003
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC9027)	37,0	Chen, 2004
<i>Candida bombicola</i> (ATCC22214)	25,0	Lang, 2002
<i>P. aeruginosa</i> 47T2	32,0	Lang, 2002
<i>P.aeruginosa</i> AT10	28,0	Lang, 2002
<i>Bacillus</i> sp. LB2a	26,0	Nitschke, 2004
<i>R. erythropolis</i>	32,0 – 36,0	Rapp, 1979

Fonte: Rufino, 2007

3.6 Produção de biossurfactantes

A produção mundial de surfactantes excede três milhões de toneladas por ano (VATER, 1986; BROWN, 1991), sendo utilizados principalmente como matéria-prima na fabricação de detergentes de uso doméstico (FIECHTER, 1992; GERSON, 1993; MAYER & SOBERON – CHAVEZ, 2000). A globalização mobiliza, muitas indústrias clássicas para inovação e redirecionamento para novas tecnologias. Os rápidos desenvolvimentos na biotecnologia e o aumento da consciência ambiental entre os produtores e consumidores estão colocando os produtos biológicos na preferência do mercado (ZHOU & KOSARIC, 1995; SHEPHERD *et al.*, 1995).

Na indústria alimentícia, os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes e espessantes para o processamento de matérias-primas. A emulsificação é muito importante na formação da consistência e textura e também na dispersão de fases em alimentos (BANAT *et al.*, 2000).

O mercado mais promissor para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (BANAT, 1995 a; LIN, 1996). Outra aplicação dos biossurfactantes é na biorremediação e dispersão de derramamentos de óleos e na recuperação melhorada de petróleo (COBENAS & HOOG, 1998; CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

São valiosos os biossurfactantes e suas moléculas com efetiva atividade superficial e propriedades biológicas para as várias aplicações industriais. Os microrganismos sintetizam substratos durante o seu crescimento, produzindo uma alternativa química no preparo convencional de surfactantes. Dentre eles: lipídios, lipopeptídios e ácidos graxos. Essas moléculas são utilizadas nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, como em processos de emulsificação e preparação de detergentes (CAMEOTRA & MAKKAR, 2002).

Os biossurfactantes estão amplamente distribuídos no mercado de produtos de higiene pessoal, por apresentarem propriedades de baixa umidade e compatibilidade com a pele (BORDAS *et al.*, 2001). Incluem outras aplicações, na agricultura, onde são utilizados na fabricação de pesticidas e herbicidas (MEYLHEUC & HENRY, 2001). Na indústria farmacêutica

(NITSCHKE & PASTORE, 2002), Nas indústrias têxtil e cerâmica (RON *et al.*, 2002, VAN HAMME *et al.*, 2003; MULLIGAN, 2005).

Comumente as indústrias utilizam componentes químicos e estes apresentam atividade superficial. Os biossurfactantes são produzidos por uma variedade de microrganismos produtores de biomoléculas. Ganham uma importância devido a sua atividade de recuperação de ambiente, no processamento de alimentos e produtos farmacêuticos por apresentarem baixa toxicidade e biodegradabilidade (MANEERAT, 2005b; MUKHERJEE, 2006).

Os biossurfactantes são produzidos extracelularmente por bactérias e fungos incluindo: *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida bombicola* com uma elevada produção de sorolípídios. *Bacillus subtilis* produziu lipopeptídios e surfactin, estes biossurfactantes são utilizados em tratamento de solos, sendo promissores por apresentarem biodegradabilidade, baixa toxicidade e eficientes na biodegradação e solubilização (MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes são sintetizados por microrganismos e apresentam moléculas com atividade superficial com benefício e para o meio ambiente, a demanda por biossurfactante tem aumentado devido sua estabilidade, substituindo os químicos por naturais. Os biossurfactantes produzidos por microrganismos marinhos tem tido uma atenção, em particular para bioremediação de solos poluídos (MANEERAT, 2005a).

Manana-lípido-proteínas são (MELs) são glicolípídeos (biossurfactantes), produzidos por leveduras do gênero *Pseudozyma*. O MELs produzido por *Pseudomonas tsukubaensis*, apresenta uma excelente atividade superficial e uma ótima constituição bioquímica (FUKUOKA *et al.*, 2007).

Estudos da interação do biossurfactante com membranas biológicas são de grande interesse para atividades biológicas e outros mecanismos moleculares. A presente pesquisa reporta a interação da bactéria com a produção de trealolípídeos produzido por *Rhodococcus* sp com fosfolípídeos de membranas. Os resultados demonstraram que os trealolípídeos e fosfolípídeos apresentam uma interação relevante com atividades de membranas biológicas (ARANDA *et al.*, 2007).

A produção de biossurfactante por *Candida glabrata* UCP 1002, foi estudada através de substratos contendo óleo, glicose e extrato de levedura. O índice de emulsificação foi trabalhado com n-hexadecano e uma concentração

média de óleo 7,5%, 5% de glicose, 0,3% de extrato de levedura. O biossurfactante produzido apresentou uma concentração micelar crítica de 2,5% e uma tensão superficial de 31mN/m (LUNA *et al.*, 2006).

3.6.1 Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*

Leveduras do gênero *Candida* têm sido largamente utilizadas na produção de compostos ativos de superfície. *Candida lipolytica* produziu o bioemulsificante Liposan utilizando n-hexadecano como fonte de carbono, enquanto com glicose, a produção foi insignificante (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984).

Em 1999, Pareilleux observou a produção de um polímero extracelular por *Candida lipolytica* com propriedades emulsificantes quando crescida em n-hexadecano ou uma mistura de hidrocarbonetos lineares. Os polímeros recuperados do líquido metabólico demonstraram ser moléculas complexas constituídas por uma fração lipídica, uma protéica e outra constituída por carboidratos, estando esta última em maior quantidade.

Pesquisas desenvolvidas no Brasil no estado de Pernambuco, demonstraram a produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* em meio suplementado com óleos vegetais, babaçu, coco e dendê e óleos vegetais de refinarias, utilizados na culinária das regiões Norte e Nordeste, verificando-se os melhores resultados com óleo de babaçu (MARÇAL *et al.*, 1991; HARROP *et al.*, 2003; SARUBBO *et al.*, 1997,1999, 2006; RUFINO, 2007).

VANCE HARROP e colaboradores (2003) realizaram estudos com *Candida lipolytica*, propondo um meio de cultivo de baixo custo utilizando água do mar, suplementado com óleo de babaçu, formulado para o crescimento e produção de bioemulsificante.

Estudos utilizando meios de cultura, para produção de emulsificação em resposta a tensão superficial por *Candida lipolytica*, apresentou efeitos e interações com concentrações de óleos, uréia, sulfato de amônia e potássio de hidrogênio. A emulsificação ativa produzida foi de respectivamente 0,544% (m/v), 2,131% (m/v) e 2,628% (m/v) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006).

Candida lipolytica produziu surfactante quando cultivada em um meio suplementado com óleo de canola e glicose como fontes de carbono. O

surfactante foi produzido após 48 horas de produção por fermentação e apresentou uma constituição de proteínas, lipídios e polissacarídeos, sendo influenciado pelo adição de sal, temperatura e pH. Os substratos utilizados na emulsificação foram: n-hexadecano e óleos vegetais. O biossurfactante produzido apresentou uma tensão superficial de 30mN/m (SARUBBO et al., 2006).

Estudos utilizando *Candida lipolytica* como produtora de um novo biossurfactante, durante o crescimento em substrato de óleo vegetal de uma refinaria demonstrou que o surfactante isolado reduziu a tensão superficial de 71mN/m para 31mN/m. Sua caracterização química consistiu em 50% proteínas, 20% de lipídios e 8% de carboidratos (RUFINO et al., 2007).

Tabela 3 - Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*

MICROORGANISMO	BIOSSURFACANTE	REFERÊNCIA
<i>Candida lipolytica</i>	Liposan	Cirigliano & Carmam, 1984
<i>C. lipolytica</i>	Biopolímeros	Cooper & Paddock, 1984
<i>C. lipolytica</i>	Biopolímeros	Marçal et al., 1991
<i>C. lipolytica</i>	Biopolímeros	Pareilleux, 1999
<i>C. lipolytica</i>	Biopolímeros	Vance- Harrop et al., 1997, 2000, 2003, 2004
<i>C. lipolytica</i>	Biopolímeros	Sarubbo et al., 1997, 1999, 2001, 2006
<i>C. lipolytica</i>	Biopolímeros	Rufino et al., 2003, 2006
<i>C. lipolytica</i>	Biopolímeros	Albuquerque, 2006

3.6.2 Substratos utilizados na produção de biossurfactantes

3.6.2.1 Substratos hidrossolúveis

Estudo realizado por Pareilleux, 1999 na produção de um polímero extracelular por *Candida lipolytica* com propriedades emulsificantes utilizou o n-hexadecano ou uma mistura de hidrocarbonetos.

Substratos da indústria do processamento de batatas foram avaliados para produção de biossurfactante (FOX & BALA, 2000).

Banat e colaboradores (1995), estudaram a produção de biossurfactantes com um isolado de sedimento de *Pseudomonas aeruginosa* em meio suplementado com glicose e n-hexadecano como substratos.

3.6.2.2 Substratos lipossolúveis

O óleo de oliva tem sido utilizado na produção de biossurfactante pelo gênero *Pseudomonas* (MANRESA, 1994).

Haba e outros pesquisadores (2000) selecionaram 36 microrganismos para produção de biossurfactantes em meio líquido, com 2% de resíduo de óleo de oliva ou óleo de girassol como fonte de carbono.

Vance Harrop e colaboradores (2003), realizaram estudos com *Candida lipolytica*, propondo um meio de cultivo de baixo custo utilizando água do mar, suplementado com óleo de babaçu na produção de biossurfactante.

A *Candida lipolytica* tem sido bastante utilizada na produção de biossurfactante em meios suplementados com óleos vegetais, babaçu, coco e dendê e óleos vegetais de refinarias (MARÇAL *et al.*, 1991; HARROP *et al.*, 2003; SARUBBO *et al.*, 1997,1999, 2006; RUFINO, 2007).

Candida lipolytica produziu surfactante quando cultivada em um meio suplementado com óleo de canola e glicose como fontes de carbono (SARUBBO *et al.*, 2006).

Rufino (2007) utilizou *Candida lipolytica* cultivada em substrato de óleo vegetal de uma refinaria na produção de biossurfactante.

Paz & Barbosa (2007), estudaram a produção de surfactante utilizando *Chromobacterium violaceum* cultivado em meio com o óleo de pequi como fonte de carbono.

3.6.2.2.1 Óleo de Pequi

A palavra pequi vem do tupi "pieui" onde py =casca, e qui =espinho. O pequizeiro é uma árvore do cerrado, bioma que ocupa grandes extensões do Centro do Brasil e alguns pontos do Nordeste e Sudoeste brasileiro e que tem sido continuamente devastado. A utilização sustentável de recursos do Cerrado, que possibilitem o desenvolvimento das regiões onde eles ocorrem, tem sido um desafio para órgãos governamentais que buscam a exploração racional de seus recursos, considerados ameaçados pelo desenvolvimento urbano e econômico (VILELA-MORALES & VALOIS, 2000).

O pequizeiro é uma planta nativa do cerrado brasileiro, pertencente ao gênero *Caryocar*, com cerca de quinze espécies e cinco subespécies disseminadas em alguns estados do Brasil, especialmente no Norte, Nordeste e Mato Grosso, sendo também distribuída na faixa tropical do continente americano. É uma árvore de porte mais ou menos robusto, madeira de boa qualidade, com frutos de cor esverdeada e polpa amarela – alaranjada de alto valor nutritivo e possuindo em média duas sementes/endocarpo, com peso médio de 8 g (LIMA, 1980).

A importância econômica do pequizeiro está relacionada ao fato dos seus frutos possuírem sabor agradável e serem ricas em óleo e proteínas. Além disso, contêm fibras, sais minerais e vitaminas, constituindo-se um alimento altamente energético. O sabor agradável torna o pequi um produto destinado também ao consumo *in natura*, como saborizantes de comidas, licores e doce. Os frutos também podem ser utilizados para extração do óleo, empregado diretamente na alimentação humana, na indústria de cosméticos para fabricação de sabonetes e cremes, e em produtos medicinais, atuando como agente terapêutico (MORAIS & VALOIS, 2000). Sendo assim, um novo estudo poderá determinar novas oportunidades de industrialização.

Na década de 40, o óleo de pequi era usado no preparo da "emulsão de pequi" e o "pequióleo", para o tratamento das doenças do aparelho respiratório.

Além do aspecto medicinal, o óleo de pequi é usado na indústria de cosmético para fabricação de cremes e sabonetes (VILELA, 1998). Apresenta uma composição triglicerídica, utilizando como matéria-prima para modificações enzimáticas visando à obtenção de um produto, com composições adequadas, que poderá ser utilizado na produção de equivalentes de manteiga de cacau, que são viáveis através da reação de interesterificação enzimática na presença de ácido esteárico (FACIOLI, 1998).

3.6.2.2.2. Características Botânicas do Pequi

A denominação pequi abrange três espécies, *Caryocar coriaceum*; *Caryocar brasilienses* e *Caryocar glabrum*, todas classificadas na família Caryocaraceae. São espécies arbóreas que apresentam folhas largas e frutos arredondados, com até dez centímetros de diâmetro. A castanha do pequi é recoberta por invólucro rico em espinhos pretos e finos (FERRI, 1981) e uma polpa amarela (às vezes mais esbranquiçada), pastosa, farinácea, oleaginosa e rica em vitamina A e proteínas (ALMEIDA & SILVA, 1984).

O pequizeiro é uma árvore do cerrado Brasileiro, bioma que ocupa grandes extensões do Centro do Brasil e alguns pontos do Nordeste e Sudoeste. Sendo bastante estudado pelo seu valor nutritivo e propriedades química. Na sistemática botânica o pequizeiro apresenta a seguinte classificação: reino: plantae, divisão: angiospermae, classe: dicotyledonae, ordem: parietales, família: Caryocaraceae, gênero: *Caryocar*, espécie: *coriaceum* (ALMEIDA & SILVA, 1994).

É uma planta semidecídua, heliófita, seletiva xerófita, característica do cerrado brasileiro (LORENZI, 2000). A árvore alcança geralmente 25 a 240 metros de altura, com circunferência da base do tronco chegando a 2 metros.

O fruto do pequizeiro é uma drupa de tamanho de uma laranja que contém de uma a quatro sementes volumosas indeiscentes, apresentando pericarpo carnoso, endocarpo lenhoso, mesocarpo fibroso mais ou menos espesso de notável valor nutritivo e coloração amarelada ou esbranquiçada, e epicarpo fino, de cor verde ativo (DUARTE, 1989; DANTAS, et al., 1989).

Segundo Dantas (1989), as sementes são duras, em forma de rim; protegidas pelo endocarpo lignificado e lenhoso, com revestimento de espinhos

finos e resistentes, reunidos pela base e com as pontas viradas em direções ao centro. A amêndoa compõe-se de dois cotilédones de massa branca, oleosa, pouco resistente, adocicada, protegida por uma pele pardacenta, que se destaca com facilidade.

A polpa do mesocarpo quando seca, apresenta 67% de gordura amarela de gosto muito agradável, e que pode servir para uso na cozinha mesmo sem refinação e a amêndoa descascada contém 70,4% de óleo branco, meio sólido, com cheiro característico do pequi (LIMA, 1980).

Os ácidos presentes no óleo da amêndoa e da polpa do pequi se encontram distribuídos conforme (Tabela 4)

Tabela 4 - Composição dos ácidos graxos nos óleos do endocarpo (8,1%) e da amêndoa (44,2%) do pequi *Caryocar coriaceum* Wittm.

ÓLEO DA AMÊNDOA	(%)	ÓLEO DO ENDOCARPO	(%)
Ácido cáprico (C8)	4,7	Ácido palmítico (C16)	49,4
Ácido láurico (C12)	1,1	Ácido esteárico (C 18)	1,5
Ácido mirístico (C19)	47,8	Ácido oléico (C18:1)	4 7,6
Ácido palmítico(C16)	0,8	Ácido araquidônico (C20)	0,7
Ácido palmitoléico (C16:1)	0,7	Não apresenta	
Ácido oléico (C18:1)	25,1	Não apresenta	

Fonte: LIMA, 1980.

Devidos os seus constituintes e a qualidade de seus ácidos graxos, o pequi representa uma fonte alimentícia importante para suplementar dieta deficiente em nutrientes nas áreas mais pobres do mundo, sendo chamado pelos cearenses com a “carne dos pobres” (DANTAS, 1989; SANTOS *et al.*, 2006).

As propriedades do pequi se concentram principalmente no fruto cru, pois quando cozidos, perdem de 20% a 30% dos nutrientes. Estudos relatam que o valor médio de carotenóides e de vitamina A foi de 231,09g e 494 ER/100g, respectivamente, na polpa *in natura*, e quando esta foi cozida esses

valores passaram para 154,06g/g e 375 ER/100g respectivamente (RAMOS *et al.*, 2001).

A análise da composição química do pequi revelou que a amêndoa do pequi (100g), fornece 89 calorias; 21,6g de glicídeos; 1,2g de proteínas; 0,9 de lipídeos; 14 mg de cálcio; 10mg de fósforo e 1,2mg de ferro. A análise da polpa para cada 100gramas: 6,76g de glicídeos; 1,02g de proteína; 10g de lipídeos; 4,9mg de cálcio; 0,21mg de fósforo; 1,39mg de vitamina B₂; 12 mg de vitamina C (ALMEIDA & SILVA, 1984).

3.7 Vantagens na utilização dos biossurfactantes

Os surfactantes apresentam várias vantagens uma vez que podem ser sintetizados a partir de substratos renováveis, possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações (DESAI & BANAT, 1997). Apresentam outras características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos no que se refere a sua eficiência (REISER *et al.*, 1989). As pesquisas biotecnológicas para produção de biossurfactantes estão direcionadas em função das vantagens desses compostos frente aos surfactantes sintéticos (MULLIGAN, 1993). Dentre as principais, destacam-se:

Baixa toxicidade: os biossurfactantes apresentam baixa toxicidade, permitindo o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (FLASZ *et al.*, 1998).

Biodegradabilidade: apresentam propriedades que os difere dos surfactantes químicos, sendo facilmente degradáveis na água e no solo, apresentando aplicações para a biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN *et al.*, 1993).

Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados) e produzem a menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactantes (COOPER & PADDOCK, 1984). A atividade superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m, enquanto que a concentração micelar crítica (CMC), ou seja, medida de eficiência, varia entre 1-2000 mg/L (BOGNOLO, 1999).

Tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes suportam concentrações e 10% de NaCl, enquanto que uma concentração salina de 2-3 % é suficiente para inativar surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999).

Uma grande vantagem dos biossurfactantes é de não ser derivado do petróleo, fator importante economicamente, devido aos aumentos do petróleo. A grande possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas, através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento do produto para vários tipos de necessidades (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

3.8 Aplicações dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes são amplamente utilizados em muitos produtos comercializados, como cosméticos e em indústrias farmacêuticas (Tabela 5). Muitos produtos necessitam de surfactantes em seus ingredientes, entre eles: repelentes de insetos, antiácidos, soluções para lente de contato, desodorantes, produtos para unhas, pasta de dentes entre outros (KLECKNER & KOSARIC, 1993; MAYER E SOBERON-CHAVEZ, 2000).

Os biossurfactantes destacam-se quimicamente, por ser utilizados em diversas áreas, aumentando a recuperação de óleos, na biorremediação de poluentes insolúveis em água e na indústria de alimentos (MCINERNEY *et al.*, 1990). Os biossurfactantes têm sido bastante explorados nas indústrias alimentícias, de cosméticos em fármacos e na dermatologia (PELLERIN *et al.*, 1992).

Os biossurfactantes têm sido bastante utilizados na biorremediação de áreas poluídas por hidrocarbonetos (SHEPHERD *et al.*, 1995).

Os surfactantes sintéticos também têm sido utilizados no controle da podridão do pepino e da pimenta causada por *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora capsici* (STANGHELLINI *et al.*, 1996).

Os biossurfactantes produzidos por *Candida bombicola* tem sido amplamente utilizados nos processos de solubilização parcial do carvão (CAMEOTRA & MAKKAR, 1999).

Os biossurfactantes produzidos por microrganismos têm chamado atenção devido as suas várias propriedades e a largas aplicações. Dentre as varias atividades dos biossurfactantes podemos enfatizar em especial (antibiótico, antifúngico, inseticidas, antiviral, antitumoral e enzimas inibitórias) (MULLIGAN, 2005).

A poluição de sedimentos de solos por metais pesados (cobre, zinco e níquel) no meio ambiente tem ocorrido. O biossurfactante rhamnolipidio tem sido revelado como um potente agente de biorremediação. Os estudos indicaram a importância do pH em conjunto com soluções de rhamnolipídeos no processo de biorremediação de metais pesados no solo (DAHRAZMA et al., 2007).

A potente remoção do cadmo e do cobre diluído em soluções aquosas com derivados de seivas de plantas (biossurfactante) foi investigado. Os parâmetros verificados foram: pH inicial, proporções de metais e a ionização com NaCl. O máximo de remoção para cobre e cádmio foi de 89,95%, 81,13% e 71,17% respectivamente (YUAN et al., 2008).

O biossurfactante rhamnolipídeo foi utilizado para remoção de metais pesados: cobre, zinco e níquel de sedimentos de um canal no Canadá. A remoção dos metais pesados do sedimento corresponderam a 37 % Cu, 13 % Zn e 27 % de Ni (DARAZMA, 2007).

Uma variedade de métodos foi empregada para avaliar o potencial do biossurfactante em fontes naturais. O método eficiente e minucioso foi baseado considerando 96 células em cultura. A eficiência do método foi demonstrada pela seleção da bactéria produzindo o biossurfactante, onde reduziu a tensão superficial da água de 72 mN/m para 28,75 mN/m (CHEN et al., 2007).

Tabela 5 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

FUNÇÕES	APLICAÇÕES
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene e cosméticos
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistema de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos, recuperação do petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Demulsificantes	Tratamento de resíduos oleosos

Fonte: Banat, 2000; Mulligan, 2005

3.9 Perspectivas Econômicas dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes competem com uma grande dificuldade com os surfactantes derivados do petróleo, por apresentarem alguns aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção (PANDEY et al., 2000).

Alguns fatores podem ser enfatizados na redução dos custos de produção dos biossurfactantes, entre eles podemos citar: o processo de produção, que pode ser melhorado para redução de custos operacionais e utilização de substratos renováveis, como fonte nutritiva de microrganismos e microrganismos geneticamente modificados (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

A produção de biossurfactantes é onerosa, porém, a perspectiva futura dos biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos de baixo custo e da utilização de matérias primas que não ultrapassem 10 – 30% do custo total. Os biossurfactantes usados em produtos de valor econômico como: cosméticos, medicamentos e outros apresentam um custo na produção favorável para o mercado (KOSARIC *et al.*, 1996).

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C. D .C; FILETTI, A.M.F. CAMPOS-TAKAKI, G. M. Optimizing the médium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. Can. J. microbial. v.52, p.575 – 583. 2006.

ALMEIDA, S. P. de & SILVA, J.A. da. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: Embrapa-CPAC.38 p. 1994.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa – CPAC. 464 p. 1998.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. Process Biochemistry, v.40, p.328-336. 2004.

ARRANDA, F.J.; TERUEL, J.A.; ESPUNY, M.J.; MARQUÉS, A.; MANRESA, A.; LIDÓN, E.P.; ORTIZ, A. Domain formation by a *Rhodococcus* sp. Biosurfactant trehalose lipid incorporated into phosphatidylcholine membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes v. 1768, p.2596-2604, 2007.

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

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

BARTH, G. & GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews v. 29, nº.4, pp. 219-237. 1997.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAC, M.; TOMASIK, J.; PLASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. Bioresource technology. v.95, p.15-18, 2004.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel. Internacional Biodeterioration and biodegradation. v.38. p.31-33. 1996.

BONGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. V. 152, p. 41-52, 1999.

BORDAS, F.; LaFRANCE, P. utilization de biosurfactants (rhamnolipides) pour le traitement d' un sol sableux contamine par le pyrene-Essais em colonnes de sol. Etude et Gestion des Sols, v.8, p. 187 -188. 2001.

BROWN, M. J. Biosurfactants for cosmetic applications. International Journal of Cosmetic Science, v. 13, p.61-64, 1991.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 50. p.520-529.1998.

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

CIRIGLIANO, M. C. & CARMAN, G. M. A Plating Technique for the Selective Isolation of Yeast Utilizing Water Immiscible Carbon. *Journal of Food Science*, v. 48, p. 1554 – 1555, 1983.

CIRIGLIANO, M. C. & CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. v.48, p. 747-750.1984.

CIRIGLIANO, M. C. & CARMAN. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.50, p 846-850. 1985.

COBENAS, W. H.; HOOG, S.L. Mejoramiento de la producción de petróleo mediante el uso de aplicaciones biotecnológicas. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. v. 2. p. 1-12, 1998.

COOPER, D.G., MACDONALD, C.R., DUFF, S.J.B.KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from bacillus subtilis by continuous product removal and metal cation additions.applied and Environmental Microbiology. v. 42, p. 408 – 229. 1981.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of biosurfactant from *Touropsis bombicola*.*Applied and Environmental Microbiology*. v. 47, N. 1, p. 173 - 176, 1984.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J.E. Surface-active compounds from microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, v.26, p. 229-253. 1980.

CHEN, C.Y.; BAKER, C.Y.;DARTON,R.C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods*. v. 70. p. 503-510.2007.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotechnology: a text book of industrial microbiology. Madison: Science Technology v.30. p. 297- 300.1984.

DAHRAZMA, B & MULLIGAN, C.N. Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration. Chemosphere. v. 69. p. 705-711. 2007.

DAHRAZMA, B.; MULLIGAN, C.N. & NIEH,P. Effects of additives on the structure of rhamnolipid (biosurfactant): A small-angle neutron scattering (SANS) study. Journal of Colloid and Interface Science. v. 319. p. 590-593. 2007.

DANIEL, H. J., RESS, M., SYLDATK, C. Production of sorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola*. Biotechnology Letters, v.20, p.1153-1156, 1998.

DANTAS, M.E.L.;FELIX, S.R.A.; FERREIRA, M. do S.; PIMENTA, M. do S; ROCHA, D. . pequi. Universidade Regional do Cariri. Boletim informativo. p. 1 - 2.Crato. 1989.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms; new trends in surfactants. Computers Rendus Chimie, v.7, p. 641-646,2004.

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

DUARTE, A.R. Resposta do Pequizeiro (*Caryocar coriaceum* Wittm) como uso da vegetação na chapada do Araripe Ceará. Universidade Regional do Cariri. Boletim Informativo. p. 1 -2. Crato. 1989.

FACIOLI, N. L. Interesterificação enzimática do óleo de piqui pela lipozyme. Química Nova v. 21,n. 1, p. 16-19. 1998.

FRANCY, D.S., THOMAS, J.M., Raymond, R.L., WARD, C.H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. Journal Industrial Microbiology v.8, p. 237 -246, 1991.

FERREIRA, F. R.; BIANCO, S.; DURIGAN, J. F.; BELINGIERE, P. A. Caracterização física e química de frutos de Pequi. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 9., 1987. Campinas, SP. Anais... Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. 643 – 646 p.

FERRI, M. G. Botânica : Morfologia Externa das Plantas. (organografia 15) ed. Nobel. São Paulo. 1981.

FIECHTER, A. biosurfactants: moving towards industrial application. Trends in Biotechnology, v.10, p. 208 -217. 1992.

FOX, S.L.; BALA, G. A. Production of surfactant from bacillus subtilis ATCC 21332 using potato substrates. Bioresour. Technol. v.75, p. 235 -240.

FUKUOKA, T.; MORITA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis* produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid – B. carbohydrate Reserch. V. 343, p. 3 – 25. 2008.

GAUTAM, K.K & TYAGI, V.K. Microbial surfactants: A Review. *Journal of Oleo science*. v. 55, n.4, p.155-166. 2006.b

GARCIA – OCHOA, F. & CASAS, J.A. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology* . v 25, p. 613 -621, 1999.

GEORGIU, G.; LIN. S. C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*, v.10, p. 60-65, 1992.

GERSON, D.F. Biosurfactants: production – properties – applications. In: *biotechnology*. 1993.

GUDINO, J.M.T.; CRISPÍN, J.A.S. Producción de um biosurfactante microbiano por *Torulopsis magnoliae* em cultivos sumergidos por carga. *Ciência*, v.9, p.305-312. 2001.

GUERRA-SANTOS, L.H., KAPPELI, O, FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.24, p.443-448,1986.

GUEZ, J.S.;CHENIKHER, J.Ph.; CASSAR & JACQUES.P.Setting up and modeling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. *Journal of Biotechnology*. v. 131, p. 67-75. 2007

GIANELLA, M.C.; VILELA, A. Projeto Pequeno Plano de Negócios. Crato: Instituto Brasileiro de Educação em Negócios Sustentáveis – IBENS, 2003.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomona aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. Journal of Applied Microbiology, v.88, p.379-387, 2000.

HARROP, M. H. V. ; ROCHA, J. A. M. R.; SARUBBO, L. A.; CARNEIRO DA CUNHA, M. G. & CAMPOS-TAKAKI, G. M. Utilization of Babassu Oil to Produce Biosurfactant with candida lipolytica. XXVI Reunião Annual da sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Caxambu, 03 a 06 de maio de 1997.

HARROP, M. H. V; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. New Bioemulsifiers Produced By *Candida lipolytica* Using d- Glucose and Babassu Oil as Carbon Sources. Brazilian Journal of Microbiology, v. 34, p.120 -123. 2003.

HISTATSUK, K.I. formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. Agricultural and biological Chemistry Journal. v.5, p.686 – 692. 1971.

HOLMBERG, K. Handbook of applied surface and colloid chemistry. John wiley, New York. v.1, 2002.

JAVERI, M.; JENNEMAN, G.E.;McINERNEY, M.J. Anaerobic production of a biosurfactante by *Bacillus licheniformis*. Applied and environmental Microbiology. v.50, n3, p. 698 - 700, 1985.

JUWARKAR, A.A.; NAIR.A.;DUBEY.K.V.;SINGH.S.K.; DEVOTTA, S. biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. Chemosphere. v.68, p. 1996-2002.2007.

KLECKNER, V.; KOSARIC, N. Biosurfactants for cosmetics. In Kosaric, N (ed) Biosurfactants. Surfactant science series. Dekker, New York. v.48, p. 373 – 389. 1993.

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

KITAMOTO, D. D.; AKIBA, S.; HIOKI, C.; TUTUCHI, T. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida Antarctica*. Agricultural and Biological Chemistry Journal, Tokyo, v.54, n.1, p.31-36, 1999.

KITANCHAROEN, N. & HATAI, K. some biological characteristics of fungi isolated from salmonid eggs. Mycoscience, v. 39, p. 249-255. 1998.

KOSARIC, N. Biosurfactants. In Rehm H. J, Reed G, Puffier a, Stadler P (eds) Biotechnology, VCH, Weinheim. V.6, p 659 – 717, 1996.

LANG, S. & WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial surfactants. Applied Microbiology Biotechnology. v.51, p.21-32, 1999.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Elsevier Science v. 7, p. 12 -20, 2002.

LIMA, M.T. Caracterização química e física do fruto do piquizeiro (*Caryocar coriaceum* Wittm). Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Ceará. 61p. 1980.

LIN, S. C.; SHARMA, M.; & GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactante by *Bacillus licheniformis* JF -2. *Biotechnology Progress*, v. 9, p. 138 -145. 1993.

LEE,S.-S.;LEE,S-J.;KIM,S-H.;PARK,I-H.;LEE,Y-S.;CHUNG,S.-Y.;CHOI,Y-L. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil. *Bioresource Technology* v.99, p. 2288-2292. 2008.

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 66, p. 109 – 120. 1996.

LOPES, P. S. Influencia da papaína e do óleo de pequi na penetração percutânea do diclofenato de sódio. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 128p. 1999.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum. v.1. 2000.

LUNA, J. L. Influência do óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção de biossurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.66p.2006.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions. *Journal of Surfactants and Detergents*. v.2, p.371-376, 1999.

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

MANEERAT, S. Biosurfactants from marine microorganisms. Songklanakarin Journal Science Technology v.27, n. 6, p.1263-1273.200a.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources.Songklanakarin Journal Science Technology v. 27, n.3, p.675 – 683. 2005b.

MANRESA, A. 1996. screening and selection of surfactant – producing bactéria from waste lubricating oil. Journal Applied Bacteriology. V.8, p. 161 -168.

MARÇAL, M.C.R. produção de biopolímeros por candida lipolytica em meio suplementado por óleos vegetais (babaçu, coco e dendê) tese de Mestrado, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências Biológicas, UFPE,1991.

MARQUES, M. C. S. Estudo fitoquímico e biológico dos extratos de pequi (*Caryocar brasilienses* Camb.) mineiros – MG. Tese de Mestrado. Faculdade de Agronomia. Agronomia Universidade Federal de Lavras, 91p. 2001.

McCAFFREY, W. C. & COOPER, D.G. *Sophorolipids* production by *Candida bombicola* using self-cycling fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 79, n. 2, p. 146 -151. 1995.

MAYER, R.M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosíntesis and potencial applications. Applied Micobiology and iotechnology. v. 54, p. 625 -633. 2000.

MERCADE, M.E & MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. JAOCS, v.71, n.1,p.61 64. 1994.

MEYLHEUC, T.; HENRRY, J-M.; BELLON-FONTAINE, M-N. Science Aliments, v.21,p.591, 2001.

MCINERNEY, M. J.; JAVAHERI, M. & NAGLE JR., D.P. Properties of the biosurfactant produced by bacillus licheniformis strain JF – 2. Journal of Industrial Microbiology, v. 5, p. 95 – 102. 1990.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants.TRENDS in Biotechnology. v. 24, n.11,p.509 -515. 2006.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F.Factors influencing the economics of biosurfactants. In: kosaric, N (Ed), Biosurfactants, production, Properties, Applications. Marcel Dekker, New York. p. 329 – 371.1993.

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

MURIEL, J. M.;BRUQUE, J. M.;OLÍAS, J. M. &JIMÉNEZ – SÁNCHEZ, A. Production of biosurfactans by *Cladosporium resinae*. Biotechnology Letters, v. 18, n. 03, p. 235 – 240, 1996.

NASCIMENTO, A. E. & CAMPOS-TAKAKI, G. M. Effects of sodium dodecyl sulfate on lipase of *Candida lipolytica*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 49, p.93-99.1994.

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

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

OLIVEIRA, A. L. de A; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Hidrólise parcial enzimática da gordura de babaçu. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. v.19, n.2, p. 23- 25, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D.A. new developments in solid-state fermentation: i-bioprocess and products. *Process Biochem*. v.35, p. 1153 – 1169, 2000.

PAZ, M.C.F.; BARBOSA, M. C.M. II Congresso de Pesquisas e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. JOÃO Pessoa – PB – 2007.

PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant effects on respiratory activity and growth. *European Journal of Applied Microbiology and biotechnology*, berlin, v.8, p. 91-101, 1999.

PERSSON, A., MOLIN, G.; ANDERSSON, N & SJOHOLM, J. Biosurfactant yields and nutrient consumption of *Pseudomonas fluorescens* studied in microcomputer controlle multifermmentation system. *Biotechnology and Bioengineering*. v.36, p.252-255,1999.

PELLERIN, N.B.; STALEY, J.T., REN, T., GRAFF, G.L. TREADWELL, D.R., ASAY, I.A. 1992. Acidic biopolyme as dispersants for ceramic processing. *Mater Res Soc Symp Proc*. v. 218: 123- 128. 1992.

PIRT, S. J. 1975. principles of microbe and cell cultivation. London: Blackwell Scientific. 214-215.

POZO, O. V. C. O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do Cerrado do Norte de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Lavras. 100p. 1997.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; CHAVADEJ, S.; ABE, M.; RUJIR AVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude

biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP\$ isolated from petroleum – contaminated soil. *Bioresource Technology*. v. 99, p.1589-1595, 2007.

QUEIROGA, C.L.; NASCIMENTO, L.R.; SERRA, G.E. evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 34, p.1321 – 1324, 2003

RAMANA, K. V. & KARANTH, N.G. production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. *Biotechnology Letters*, v. 11, n. 6, p. 437 – 442, 1989.

RAMOS, M. I. L.; UMAKI, M.C. S.; HIANE, P. A.; RAMOS FILHO, M.M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró- vitamínicos “A” da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). v 19, n.1 Curitiba: B. CEPPA, Jan/Jun. 2001.

RAU, U.; MANZKE, C. & WAGNER, F. influence of substrate supply on production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Biotechnology Letters*, v. 18, n. 2, p. 149 -154. 1996.

REILING, H. E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA – MSANTOS, L. H.; HIRT, R.; KAPPELI, O. & FIECHTER, a. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 51, n. 5, p. 985 – 989, 1986.

REISER, J.; KOCH, A.K.; JENNY, K.; KAPPELI, O. *Advances in Applied Biotechnology Series*, 1989.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Optimización de la producción de biotensioativos por

Pseudomonas aeruginosa 44T11. Grasas y Aceites, Servilla, v.42, n.1, p.1-7, 1989.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A. & GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotechnology Letters, v. 11, n. 12, p. 871 – 874, 1991.

RODRIGUEZ, C. & DOMINGUEZ A. Nutritional factores causing mycelial development of *Saccharomycopsis lipolytica*. Canadian Journal of Microbiology, v. 30, p. 605 – 612, 1984.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. Zeitschrift fur Naturforschung. v.3, p.229-236, 2001.

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

ROSENBERG, E., RON, E.Z. surface active polymers from the genus acinetobacter in: Kaplan DL (ed) Biopolymers from renewable resources. Springer, berlin Heidelberg New York. p.281- 291, 1999.

RUFINO, R.D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS TAKAKI, G.M. Enhancement of stability of produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. World Journal Microbiology Biotechnology .v. 23, p. 729 – 734, 2007.

SANTOS, E.C.; JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.N.; PERALBA, C.M.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S & CAMARGO, F.A.O. Anthracene biodegradation and surface activity by iron-stimulated *Pseudomonas* sp. Bioresource technology. v. 99, p. 2644-2649, 2007

SANTOS, B.R.; PAIVA, R., DOMBROSKI, J.L.D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.S.; SILVA, A. A. N. Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) uma espécie promissora do cerrado brasileiro. Disponível em:

<http://www.editora.ulfla.br/boletim/pdf/bol_64.pdf.htm>. Acesso em 25 mar.2006.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C. R.; CAMPOS TAKAKI, G.M. Estudo comparativo da produção de bioemulsificantes por amostras de *Candida lipolytica*. Arquivos de Biologia e Biotecnologia, v. 40, n. 3, p. 707- 720. 1997.

SARUBBO, L. A. Otimização da produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* utilizando óleo de babaçu como fonte de carbono. Tese de Mestrado Universidade Federal de Pernambuco. p.108. 1997.

SARUBBO, L. A.; PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. Canadian Journal of Microbiology, v. 45, p. 423-426, 1999.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C.R.; NEVES, M.L.C.; SILVA, M.P.C.; PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 95, p.59-67, 2001.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C.B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Co- utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. Current Microbiology. v. 20, p. 1-7, 2006.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida Glabrata* UCP 1002. Electronic Journal of Biotechnology. vol.9, N.4 pp.400-405. 2006.

SEN, R., SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process Biochemistry*. v.40, p. 2953 – 2958, 2005.

SOON, E.L.; SALLEH, A.B.; BASRI, M.; RAHMAN, R.N.Z.A.; KAMARUDDIN, K. Response surface methodological study on lipase – catalyze synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochemistry*. v.39, p. 1511 – 1518, 2004.

SUDHAKAR-BARU P.: et. Al. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. *Biotechnology Letters*. v.18, p.263-268, 1996.

SHEPHERD, R. Novel Bioemulsifier from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology*. v.40, p.207 -217, 1995.

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry, Oxford*. v.52, p. 353 – 360, 1995.

STANGHELLINI, M.E., RAMUSSEN, S.L.; KIM, D.H.; RORABAUGH, P.A. Efficacy of non ionic surfactants in control of zoospore spread of *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system. *Plant Disease*.v.80, p. 422 – 428, 1996.

SYLDAK. C.; WAGNER, F. Production of biosurfactants. In N KOSARIC, W.L. CIRNS, N. C.C. gray. *Biosurfactants and Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, v.89-p.120. 1987.

CAMPOS-TAKAKI, G.M. 2007. 5º Congresso Brasileiro de Micologia. Recife – Pe. 12 a 16 de Novembro de 2007.

TORRES, J.R. Riqueza do Cerrado. Correio brasiliense. Brasília: Brasília. 10 de Agosto 2004.

TULEVA, B.K.; IVANOV, G.R. CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* Strain. Zeitschrift fur Naturforschung. v. 57, p. 356 - 360, 2002.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of oil contaminated soils. Journal of Colloid and interface Sciencw, v. 276, p. 456-464, 2004.

UYSAL. A. & TURKMANN. A. Biodegradation of 4-CP in na activated sludge reactor: effects of biosurfactant and the sludge age. Journal of Hazardous Materials. v. 148, p. 151-157, 2007.

VANCE-HARROP, M.H.V. Influência das fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biossurfactantes. Recife, p.72. Dissertação de Mestrado em Biologia de Fungos. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Permanbucu.2000.

VANCE-HARROP, M.H.V.; ROCHA, J.A.M.R.; SARUBBO, L.A.; CARNTILIZAÇEIRO DA CUNHA, M. G.; CAMPO-TAKAKI, G. M. Utilization of babassu oil to produce biosurfactant with *Candida lipolytica*. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ. Caxamba, 03 a 06 de maio de 1997.

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

VAN HAMNE, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology. Reviews.* v. 67, n.4, p.503-549, 2003.

VENÂNCIO, A. A. D. Caracterização de novos sistemas para partição bifásica aquosa de biomoléculas. Minho, 199. 145p. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 1996.

VATER, P.J. Lipopeptides in food applications. In Kosaric N (ed) *Biosurfactants-production, properties and applications.* Dekker, New York. p.419-446,1986.

VILELA, G. F. Variações em populações naturais de *Caryocar brasilienses* Camb. (caryocaceae): Fenólicas genéticas e de valores nutricionais de frutos”. Santana da Vargem- MG. Tese de Mestrado em Engenharia Florestal Universidade de Lavras UFLA, 88p. 1998.

VILELA-MORALES, E. A. & VALOIS, A. C. C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v.17, n.2, p.11-42, 2000.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological Reviews*, v. 10, nº 1 -2, p. 1- 49. 1946.

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. effect of lactose and olive oil on intra-and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnologia Letters*, v.15, p.477-482, 1993.

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. Utilization of Canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. Journal American oil Chemistry Society. v.72, p.67-71, 1995.

WHANG. L-M.; LIU, P.-W.G.; M^a. C-C.; CHENG, S-S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of Hazardous Materials. v. 151, p.155-163, 2008.

YOUSSEF, N.H.; DUCAN, K. E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; McINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. Journal of Microbiological Methods, v.56, p.339-347, 2003.

YUAN, X.Z.; MENG, Y.T.; ZENG, G.M.; FRANG.; SHI.; J.G. Evaluation of tea-derived biosurfactant on removing heavy metal ions from dilute wastewater by ion flotation. Engineering Aspects. v.317, p. 256-261, 2008.

**1º. Artigo: Efeito do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*) na
produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP
0988**

Trabalho a ser submetido para publicação

Brazilian Journal of Microbiology

* Corresponding author: E-mail; takaki@unicap.br

Fax Number: + 55- 81- 21194043

Efeito do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*) na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988

Santana, W.J;^{1,2,3}; Rufino, R.D^{4,5}; Porto T.S⁷; Barros-Neto, B⁶; Campos-Takaki, G.M^{4*}; Porto, A.L.F⁷

¹ Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil; ² Faculdade de Juazeiro do Norte –FJN Ceará, Brasil;³ Faculdade de Tecnologia do Cariri (FATEC), Ceará, Brasil; ⁴ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil; ⁵ Doutorado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil;⁶ Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil;⁷ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife-Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos produzidos por bactérias e fungos durante o crescimento em diferentes substratos e apresentam um grande potencial de utilização em diferentes setores industriais. Neste trabalho foi investigado o efeito do óleo da amêndoa e do endocarpo do pequi (*Caryocar coriaceum*), na presença e ou ausência de glicose, sobre a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando um planejamento fatorial 2², tendo como variáveis as concentrações de glicose e do óleo de pequi (amêndoa e endocarpo). A seleção do substrato hidrofóbico (óleo de pequi amêndoa e endocarpo) foi realizada em frascos agitados a 150 rpm, à temperatura de 28°C por 72 h, tendo como variáveis respostas: tensão superficial, pH, atividade e índice de emulsificação, além das atividades enzimáticas lipásica e esterásica. Os resultados indicaram como melhor condição o meio contendo 20 % óleo da amêndoa do pequi com 1% de glicose, estando associado à atividades lipásica e esterásica de 15 e 30mm de diâmetro, respectivamente. Nesta mesma condição foi obtida a menor tensão superficial (30,51 mN/m) e índice de emulsificação de 20% com o n-hexadecano. As investigações realizadas demonstraram que o óleo de pequi como substrato agroindustrial, apresenta grande potencial na produção de biossurfactante por *C.*

lipolytica, representando uma alternativa regional e de baixo custo, com perspectivas futuras de utilização em diversos setores industriais e ambientais.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*, biossurfactante, óleo de pequi, glicose

ABSTRACT

Biosurfactant are compounds produced by bacteria and fungi during the growth in different substrates and show great potential for use in different industrial sectors. This work was investigated the effect of almond and endocarp oils of pequi (*Caryocar coriaceum*), and in the presence or absence of glucose, on the production of biosurfactant by *Candida lipolytica* using a factorial design 2^2 , with the variables concentrations of glucose and pequi oil (almond and endocarp). The production was carried out in agitated flasks at 150 rpm, temperature of 28°C for 72 hours, where were evaluated the variables-response: superficial tension, pH, activity and emulsification index and activities of lipase and esterase. The results indicated that these variables influence significantly the biosurfactant production, being the best condition obtained from pequi almond oil (20%) with 1% glucose, and associated with the lipase and esterase activities of 15 and 30mm diameter, respectively. In the same condition was obtained at lower superficial tension (30.51 mN / m) and 20% emulsification index, using as emulsifying agent the n-hexadecane. Therefore, the results demonstrated that the pequi oil shows great potential as substrate in the agroindustrial biosurfactant production by *C. lipolytica*, representing an regional and low cost alternatives with future prospects for use in several industries sections and environment.

Keywords: *Candida lipolytica*, biosurfactant, pequi oil, glucose

INTRODUÇÃO

Os surfactantes incluem uma importante classe de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, esses compostos tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade, reduzindo, desse modo à tensão interfacial e superficial. Os biossurfactantes consistem em produtos metabólicos produzidos por bactérias, fungos e leveduras, a partir de fontes renováveis de baixo custo. Entre as leveduras, o gênero *Candida*, tem sido bastante utilizado no processo de emulsificação e solubilização de substratos insolúveis como hidrocarbonetos, através da produção de biossurfactantes. Essas substâncias têm atraído grande atenção devido às suas características de biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e habilidade de utilizar fontes de carbono renováveis e de baixo custo (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

As principais classes dos biossurfactantes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas (RON, 2001). Outra importante vantagem do uso dos biossurfactantes é de não ser derivado do petróleo. A facilidade da modificação das estruturas químicas e das propriedades físicas dos biossurfactantes através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, vem facilitando a sua aplicação em várias indústrias como de detergentes, têxteis, farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos, e também na recuperação de petróleo e formulação de lubrificantes (RAHMAN et al., 2003).

Os biossurfactantes ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, métodos ineficientes e ao uso de substratos onerosos. A problemática da produção de biossurfactante, tendo sido sugerida utilizando-se fontes alternativas agroindustriais e de baixo custo, como efluente industrial de óleo de pequi, óleo de oliva, resíduos de óleo lubrificantes e óleos vegetais domésticos. Em muitos processos de produção de biossurfactantes a fonte de carbono representa cerca de 50% do custo total da produção (MERCADÉ et al., 1993; MERCADÉ et al., 1996; VOLLBRECHT et al. 1999; DELEU et al, 2004).

A produção mundial de biossurfactante está em torno de 147 milhões de toneladas de óleos e gorduras por ano, e em torno de 77,3% dessa produção é de origem vegetal (OILWORD, 2006). No Nordeste do Brasil, os resíduos oleaginosos são produzidos em grande quantidade nas refinarias de óleos

vegetais (1890 ton/ano), e estes podem ser utilizados como fontes de carbono com grande potencial comercial para as indústrias alimentícia e cosmética (MIRANDA, *et al.*, 1999).

Um grande número de fontes de carbono, incluindo rejeitos agrícolas, como açúcares e óleos, são considerados atrativos para a produção de biossurfactantes com potencial de aplicação ambiental e industrial (ZHOU & KOSARIC, 1993).

Várias espécies de leveduras, como *Candida lipolytica*, *Torulopsis bombicola* e *C. bombicola* apresentam vias metabólicas e habilidade de transformar substratos oleaginosos, promovendo o crescimento de microrganismos e produção de substâncias com capacidade surfactante (COOPER & PADDOCK, 1984).

O óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*) produzido na região Nordeste e em outras regiões do Brasil apresenta uma composição química bastante diversificada em ácidos graxos (ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico e ácido oléico), sendo utilizado com finalidade medicinal, na indústria de cosméticos para fabricação de cremes e sabonetes (VILELA, 1998). Por apresentar uma composição triglicerídica o óleo de pequi pode ser utilizado como matéria-prima, que através de modificações enzimáticas se obtêm um produto com propriedades adequadas para ser utilizado como manteiga de cacau (FACIOLI, 1998).

Este trabalho investigou a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando o óleo de pequi obtido da amêndoa e do endocarpo, através da utilização de planejamento fatorial de 2^2 , tendo como variáveis as concentrações de glicose e do óleo de pequi, e variáveis-resposta tensão superficial, pH, índice e atividade de emulsificação e atividades enzimática (lípase e esterase).

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo: Os estudos foram realizados utilizando *Candida lipolytica* UCP 0988, como microrganismo produtor de biossurfactante, pertencente à coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco, a qual foi mantida em meio Yeast Mold Agar (YMA) constituído por extrato de levedura (0,3%), extrato de malte (0,3%), triptona (0,5%), glicose (1%) e ágar (2%), água destilada q.s.p. (100mL) e pH 5,5.

Substrato: Os substratos utilizados para produção do biossurfactante foram os óleos da amêndoa e do endocarpo do pequi. A composição em ácidos graxos do óleo da amêndoa do pequi é a seguinte: ácido cáprico (4,7%); ácido láurico (1,1%); ácido mirístico (47,8%); ácido palmítico (0,8%); ácido palmitoléico (0,7%) e ácido oléico (25,1%), enquanto que o óleo do endocarpo apresenta a seguinte composição de em ácidos graxos: ácido palmítico (49,4%), ácido esteárico (1,5%), ácido oléico (47,6%) e ácido araquidônico (0,7%)(LIMA, 1980).

Condições de Cultivo e Produção do Biossurfactante:

A *Candida lipolytica* UCP 0988 foi crescida em meio Yeast Mold Broth (YMB): contendo: extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3% , triptona (0,5%) e D-glicose (1%). O pH do meio foi ajustado para 5,5. Os cultivos para a produção do biossurfactante foram realizados em frascos Erlenmeyer com 1000mL de capacidade contendo 300mL de meio de produção descrito por Vance – Harrop *et al.*, (2003), suplementados com diferentes concentrações de óleo da amêndoa e do endocarpo do pequi de acordo com o planejamento experimental utilizando um inóculo de 10^8 células/ mL, foram incubados em agitador orbital a 150 rpm por 72 horas a 28°C. Após o tempo máximo de cultivo as células foram separadas do líquido metabólico por centrifugação a 5000 rpm, e o sobrenadante foi filtrado em filtro com porosidade de 0,22 µm. A biomassa foi utilizada para avaliar o crescimento e no líquido metabólico livre de células foram determinados: pH, o índice de emulsificação, atividade de emulsificação, tensão superficial e atividade das enzimas lipase e esterase.

Biomassa

A biomassa foi determinada ao final do crescimento celular, por gravimetria (Garcia-Ochaoa & Casas, 1999).

Índice de emulsificação (IE) e atividade de emulsificação (AE)

A determinação da atividade de emulsificação, das amostras do líquido metabólico livre de células foi analisada conforme descrito por Cooper e Goldenberg (1987); onde 1,0 mL dos compostos: n-hexadecano, óleo de canola, milho, foram adicionados a 2 ml do líquido metabólico livre de células em tubos

graduados e agitados em vórtex durante 2 min. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24h, logo após foi calculado o índice de emulsificação (E) foi calculado pela razão entre a altura da emulsão e a altura total, sendo o valor multiplicado por 100, sendo o resultado expresso em porcentagem. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

A atividade de emulsificação foi realizada conforme Cirigliano e Carman (1984), 1mL do líquido metabólico livre de células foi colocado em tubos de ensaio (15 x 125 mm), adicionado 1mL de solução tampão acetato de sódio 0,1M (pH 3,0), e 0,5 ml dos substratos: óleo de milho, óleo de canola e n-hexadecano. Em seguida, o tubo foi agitado por 2 minutos a 25⁰C em vórtex. A emulsão obtida foi deixada em repouso por 10 minutos e em seguida determinada à absorbância a 540 nm, sendo o líquido metabólico utilizado como branco. A Unidade de Atividade de Emulsificação (U.A.E) foi definida com a quantidade de emulsão produzida.

Determinação do pH

A determinação do pH do líquido metabólico livre de células foi realizada em potenciômetro Orion (modelo 310).

Tensão superficial

A tensão superficial foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kuyukina et al., (2001), em tensiômetro automático (Sigma 70-KSV Instruments LTD, Finland), utilizando o anel de DuNuoy, a temperatura ambiente (28⁰ C), sendo o resultado expresso em mN/m.

Determinação de Atividade Enzimática

Atividade esterase

A atividade de esterase foi realizada pelo método descrito por Kitancharoen & Hatai (1998). *Candida lipolytica* (UCP 0988) foi cultivada durante 72 horas a 28°C sob agitação orbital de 150 rpm, no meio de produção YMB suplementado com óleo de pequi a 5%; foi utilizado como controle o mesmo meio adicionado de glicose a 1%.

Alíquotas de 1ml foram retiradas e centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rpm, para separação de células do sobrenadante, os quais foram inoculados 100 µl no centro da placa de Petri contendo meio de cultura com a seguinte composição: peptona - 1%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,75, NaCl - 0,085, agar 1,5%, púrpura de Bromocresol- 0,002%, tween 20 - 10%). Depois de autoclavados a 121°C e resfriados a uma temperatura de 43°C. Adicionou-se o TWEEN 20 para atividade esterásica, o meio foi agitado e distribuído em 14 placas de Petri, sendo 7 para o óleo de amêndoa e 7 para óleo do endocarpo até a solidificação. No centro das placas foi retirado um cilindro de 3mm de diâmetro, onde foram adicionados 100 µl de líquido metabólico. As placas foram incubadas a uma temperatura de 28°C durante 48 horas. A mudança de cor para púrpura foi considerada como resultado positivo. O halo formado foi expresso em milímetro.

Atividade lipase

A determinação da atividade lipásica, foi utilizada segundo o método de Kouker & Jaeger (1987), modificado por Nascimento & Campos Takaki (1994).

O líquido metabólico livre de células foi avaliado, com a finalidade de determinar a atividade esterásica. No centro da placa de Petri contendo o meio de cultura descrito por Kitancharoen & Hatai (1998): peptona 10g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 5g/l, NaCl - 0,1g/LB, agar 20g/l, 1% tween 20. Foi retirado um cilindro de 3 mm de diâmetro, no qual foram colocados 10µl do líquido metabólico da *C. lipolytica* livre de células. As placas foram incubadas a 28°C durante 48 horas. Ao final deste período foram observados os halos fluorescentes através da luz ultravioleta 350 nm. O resultado foi expresso em milímetros.

Planejamento Fatorial completo 2²

Um planejamento fatorial 2² com 3 repetições do ponto central foi realizado, para avaliar a influência das variáveis independentes: concentração de glicose e concentrações de óleo da amêndoa e do endocarpo do pequi, sobre a variável resposta tensão superficial, pH, atividade de emulsificação e índice de emulsificação e atividades lipásicas e esterásicas. Os níveis das variáveis independentes e resultados dos planejamentos experimentais encontram-se especificados na Tabela 1 (Óleo do endocarpo) e na Tabela 2 (Óleo da Amêndoa).

Foram realizadas análises estatísticas dos resultados do planejamento com o auxílio do software Statistica 8.0. (Statsoft, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do óleo de pequi (endocarpo e amêndoa) no crescimento e na produção de biossurfactante por *C. lipolytica*

Os meios utilizados para a produção de biossurfactantes por microrganismos incluem três principais nutrientes: carboidrato (glicose), óleo vegetal e extrato de levedura. Cada um desses componentes pode exercer uma função específica no processo de síntese de biossurfactante (GARCIA-OCHOA et al., 1999). O carboidrato, quando consumido pela glicólise é dirigido para a produção de biomassa. A glicose, particularmente, é assimilada durante o crescimento da levedura até outra fonte essencial, normalmente o nitrogênio é esgotado, sendo importante também para o processo de produção de biossurfactante. A produção de biossurfactante ocorre através da utilização de ácidos graxos obtidos a partir da fonte hidrofóbica, reduzindo os ácidos graxos até acetil Coenzima A pela via da beta-oxidação para manutenção da energia no processo de oxidação incompleta e formação de metabólitos secundários. O extrato de levedura contém nitrogênio, fosfato e oligoelementos requeridos para o crescimento da levedura, e conseqüentemente, complementar a produção de biossurfactante, os quais são importantes também para aumentar as concentrações de biomassa (CASAS, 1996).

Inicialmente foram realizados experimentos com o óleo do endocarpo de pequi para verificar a influência das concentrações de óleo e de glicose sobre a produção de biossurfactantes por *C. lipolytica*. Um planejamento completo foi utilizado para avaliar os efeitos destas variáveis, bem como suas interações. A estatística é uma importante ferramenta matemática para a interpretação dos resultados, na qual os efeitos das variáveis sobre as respostas (tensão superficial, pH, atividade de emulsificação, índice de emulsificação e atividades lipásicas e esterásicas). Os resultados da produção de biossurfactante com o óleo do endocarpo do pequi estão apresentados na Tabela 1.

O diagrama de Pareto representa os efeitos estimados das variáveis (efeito principal ou de primeira ordem) e das interações entre as variáveis (efeito de segunda ordem), sobre a variável resposta em ordem de magnitude. O

comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significantes, pois as barras que se estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significantes com nível de confiança de 95% (Porto, 2008).

A análise estatística demonstrou que na maioria das respostas estudadas, as variáveis não apresentaram efeito significativo, com exceção da atividade esterásica e do índice de emulsificação do biossurfactante com o óleo de milho.

A Figura 1 apresenta o diagrama de Pareto para a atividade esterásica, onde o efeito da concentração do óleo de endocarpo foi significativo e positivo, indicando que uma maior concentração de óleo favoreceu a maior atividade esterásica. A formação de enzimas lipolíticas pode ser observada tanto como um precipitado visível, devido à formação de cristais de cálcio do ácido láurico liberado pela enzima, ou como um clareamento de tal precipitado ao redor da colônia, devido à degradação completa do sal e do ácido graxo. A melhor atividade esterásica foi 40 mm, a qual está presente nas condições de 20% de óleo do endocarpo (ensaios 2 e 4 na Tabela 1). Já para a atividade lipásica a melhor atividade foi 20 mm nas condições de 15% de óleo e 0,5% de glicose (ensaio 7 na Tabela 1).

Para a variável-resposta o índice de emulsificação para o óleo de milho, os efeitos das concentrações de óleo e de glicose foram significativas, bem como a interação entre esses efeitos (Figura 2). O efeito negativo para o óleo do endocarpo significa que quanto menor for a concentração, melhor é o índice de emulsificação do biossurfactante, por outro lado, o efeito para a concentração de glicose foi positivo, indicando que uma maior concentração favoreceu esta resposta.

Quando uma interação for significativa, isto indica que uma variável não atua sozinha sobre as respostas, o seu efeito depende da outra variável. Este efeito de interação é melhor evidenciado nos gráficos de interpretação geométrica (Porto, 2008). A Figura 3 representa o diagrama de interpretação geométrica dos efeitos concentração de glicose e concentração de óleo do endocarpo sobre o índice de emulsificação. O maior valor de efeito corresponde a condição de 1% de glicose e 10% de óleo do endocarpo (ensaio 3 da Tabela 1).

Índices de emulsificação foram obtidos a partir do líquido metabólico livre de células utilizando os óleos: canola, milho e n-hexadecano. Os resultados

demonstraram que o óleo de milho obteve 50% no ensaio 3 (15% de óleo de pequi do endocarpo e 1% de glicose), óleo de canola 50% no ensaio 4 (20% de óleo de pequi e 1% de glicose) e n-hexadecano 40% no ensaio 6 (15% de óleo de pequi e 0,5% de glicose).

Estudos realizados com *Candida lipolytica* na produção de biossurfactante utilizando ácido glutâmico e resíduo industrial como substratos apresentaram um índice de emulsificação de 79% com óleo motor, embora o óleo de milho e o n-hexadecano não tenham sido efetivamente emulsificados (RUFINO, 2007).

A escolha do melhor resultado para a produção de biossurfactante por *C. lipolytica* utilizando o óleo do endocarpo de pequi levou em consideração principalmente a resposta tensão superficial, pois um biossurfactante necessita apresentar baixas tensões superficiais, sendo a melhor tensão obtida neste estudo foi 31,96 mN/m. Com o objetivo de obter valores de tensão superficial ainda menores, optou-se por utilizar óleo da amêndoa do pequi e proceder com a mesma metodologia de planejamentos experimentais.

A menor tensão superficial é analisada como um fator importante para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes, embora agentes emulsificantes e dispersantes não possuam, necessariamente, habilidade em reduzir a tensão superficial (YOUSSEF, 2004; SHEPHERD *et al.*, 1995).

A análise estatística da produção de biossurfactantes utilizando óleo da amêndoa demonstrou que o efeito da concentração de glicose foi significativo para a diminuição do pH do meio, o que favoreceu a obtenção de menores valores de tensão superficial (Figura 4).

Os valores de pH mais ácido foram os que expressaram os melhores valores de tensão superficial para os dois óleos (Tabela 1 e 2). Deste modo, o pH do meio externo deve ser modificado antes que o pH do interior seja afetado (SHEPHEERD *et al.*, 1995). O nível mais baixo de pH depende, em parte, da concentração de ácidos orgânicos presentes no meio, como produtos da fermentação realizada pelos microrganismos, principalmente de carboidratos, como glicose (HISTATSUK, 1971). Portanto, a presença de glicose nos cultivos de *Candida lipolytica* é um fator determinante da acidez do meio.

A manutenção do pH do meio de crescimento de *Candida lipolytica* é um fator importante a ser considerado em experimentos futuros para produção de biossurfactantes, sendo o meio mais ácido importante fator na produção.

Os resultados da avaliação do planejamento em relação à variável-resposta tensão superficial demonstraram que a utilização do óleo da amêndoa foi mais eficiente para a obtenção de menores valores deste parâmetro. A Figura 5 apresenta o gráfico de Pareto, onde os efeitos das concentrações de óleo e glicose foram estatisticamente significativos. Os valores negativos destes efeitos significam que quanto maior os valores de concentrações de glicose e óleo, menores serão os valores para a tensão superficial.

Os efeitos de interação significativos podem ser melhor visualizados na Figura 6, a qual apresenta menores valores de efeitos para a tensão superficial nas condições do ensaio 4 (20% de óleo da amêndoa e 1% de glicose).

O biossurfactante obtido através do cultivo de *C. lipolytica*, em meio contendo óleo da amêndoa de pequi, apresentou os melhores valores de tensão superficial (30,51 mN/m), com pH na faixa ácida (pH= 2,64), e uma produção de biomassa de 0,4396g/L.

Segundo RUFINO, *et al.*, (2003) a utilização de pH ácido (pH 5,5) do meio de cultivo para a produção de biossurfactante utilizando *Candida lipolytica*, demonstrou ser mais eficiente para produção de biossurfactante.

Os resultados obtidos em relação à tensão superficial neste trabalho foram mais promissores do que os obtidos por MULLIGAN (2005). O biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* atuou na redução da tensão superficial do meio de cultivo para 27mN/m; enquanto que, SEN & SWAMINATHAN (2005), demonstraram que surfactin produzido por *Bacillus subtilis* (DSM3256) reduziu a tensão superficial do meio de cultivo para 27,2 mN/m. A produção de biossurfactante por planejamento fatorial, por *Candida lipolytica* utilizando ácido glutâmico e resíduo industrial como substratos, apresentou uma ótima tensão superficial em torno de 25,5 mN/m (RUFINO *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com Sarubbo *et al.*, (1997), que estudaram a produção de bioemulsificantes por duas linhagens de *Candida lipolytica* UCP 1055 e 1120, utilizando meio suplementado com 5% de óleo de babaçu e 1% de glicose como fonte de carbono.

A atividade emulsificante depende da afinidade do biossurfactante com o substrato testado (URUM & PEKDEMIR, 2004). Estudos com *Candida glabrata* utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura por planejamento fatorial contendo 7,5% de óleo de algodão, 5% de glicose e 0,3% de extrato de levedura,

demonstraram uma atividade de emulsificação com n-hexadecano de (66%) após 96 horas de cultivo (LUNA, 2007).

Os resultados demonstraram que o biossurfactante pode apresentar um bom índice de emulsificação e uma tensão superficial mais elevada. Sendo assim, o biossurfactante produzido pode ser um ótimo agente emulsificante. Porém sua tensão superficial pode não ser considerada uma das mais apropriadas para o uso industrial, uma vez, que outros trabalhos para produção de biossurfactante, revelaram tensões mais baixas que 27mN/m (MULLIGAN, 2005). O biossurfactante produzido nas condições estabelecidas neste estudo demonstrou aplicabilidade como agente emulsificante.

A maior atividade de emulsificação (2,668 U.A.E) com o líquido metabólico livre de células foi obtida com óleo da amêndoa do pequi no ensaio 4 (20% de óleo e 1% de glicose) adicionado ao n-hexadecano, a maior atividade de emulsificação 2,5 U.A.E. Estudos realizados por Kim e colaboradores (1996), observou-se uma maior atividade de emulsificação para o n-hexadecano e óleo de milho. Outros estudos em relação a atividade de emulsificação com *Candida lipolytica* utilizando diferentes substratos: óleo de milho, canola, algodão e n-hexadecano, demonstraram atividades de emulsificação de 4,8 a 5,5 U.A.E. para todos os substratos testados (LUNA, 2006). Testes realizados por Ghurye e outros pesquisadores (1994), demonstraram que a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Escherichia coli* JM101 não foi significativa, uma vez que as emulsões formadas apresentaram valores 0,90 U.A.E.

O líquido metabólico proveniente da condição com óleo de amêndoa, demonstrou uma maior emulsão, em relação ao endocarpo, podendo ser utilizado nas indústrias, competindo com os surfactantes sintéticos. Alguns surfactantes comerciais surfactina e viscosina foram testados como controle. Os resultados apresentaram valores abaixo de 2,58 U.A.E. (GHURYE *et al.*, 1994). Estudos recente da produção de biossurfactante com *Chromobacterium violaceum* utilizando óleo de pequi como fonte de carbono apresentou uma atividade de emulsificação (1,108 U.A.E). Estes resultados confirmam a propriedade de emulsificação do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* utilizando o óleo de pequi como fonte alternativa de carbono de baixo custo.

Os resultados obtidos demonstraram que todos os ensaios do óleo da amêndoa de pequi apresentaram uma boa atividade lipásica, sendo 17mm o maior valor obtido a pH 2,98 (Tabela 4).

CONCLUSÕES

Candida lipolytica (UCP 0988), apresenta um grande potencial na produção de biossurfactante, utilizando o óleo de pequi como fonte alternativa de carbono. As variáveis utilizadas concentração de glicose e de óleo de pequi (amêndoa e endocarpo) apresentaram um resultado promissor na produção do biossurfactante. Diante da grande importância dos biossurfactantes em vários setores industriais, são necessárias pesquisas utilizando óleos vegetais como fonte de carbono, visando tornar o processo competitivo no setor produtivo. O óleo de pequi é um substrato lipossolúvel, rico em ácidos graxos, representa uma alternativa como fonte de carbono para produção de biopolímero estável, para aplicações futuras.

REFERÊNCIAS

- Bednarski, W.; Adamczak, M.; Tomasik, J.; Plaszczyk, M. (2004). Application of oil refinery waster in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology*. 95, 15-18.
- Cooper, D. G.; Paddock, D.A. (1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. 47 (1), 173-176.
- Deleu, M & Paquot. (2004). M. from renewable vegetables resources to microorganismos; new trends in surfactants compters rendus chimie. (article in press).
- Desai, J.D.; Desai, (1992). A. in: n kosaric (ed.), biosurfactants. Marcel Dekker inc. New York, 65-86.
- Garcia-Ochoa, F; Casa, J.A. (1999). Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology*. 25, 613 – 621.
- Guerra-Santos, I; Kappeli, O.; Flechter, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactante production in continous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*. 48.(2), 301-305.
- Haba, E.; Espuny, M.J.; Busquets, M.; Manresa. (2000). A. screening and production of rhamnolipidos by *Pseudomonas aeruginosa* 47t2 NCIB 40044 from waste frying oils J. Appl. Microbiol. 88, 379-387.
- Hlstatsuk, K. I. (1971). Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*. 5. 686-692.

- Kuyukina, M.S.; Ivishina, I.B.; Philp, J.C.; Christofi, N.; Dunbar, S.A.; Ritchkova, M.I. (2001). Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary- butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*. 46, 149 – 156.
- Luna, J.M.; Sarubbo, L. A ; Campos-Takaki, G.M.(2007). Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electronic Journal of Biotechnology*.
- MARKkar, R.S.; Camarotra, S.S. (1998). Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20, 48-52.
- Mercadé, M.E.; Moneon, L. de Andes; C. Rondon, I.; Martinez, E.; Espuny, M.J. & Manresa. (1996). Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *Journal Applied Bacteriology*. 8, 161-168.
- Miranda, O.A.; Salgueiro, A.A.; Pimentel, M.C.B.; Lima Filho, J.L.; Melo, E.H.M.; Durán, N. (1999). Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technol.* 69. 145-147.
- Muriel, J. M.; Bruque, J. M.; Olías, J. M. & Jiménez – Sánchez, (1996). A. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. *Biotechnology Letters*. 18 (03), 235 – 240.
- Porto, T. S. Extração da ascorbato oxidase de *Cucurbita maxima* por processo descontínuo e contínuo em coluna de discos rotativos perfurados utilizando sistemas de duas fases aquosas. Tese de Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, 2008, 123pp.
- Robert, M.; Mercadé, M.E.; Bosch, M.P.; Parra, J.L.; Espuny, M.Y.; Omanresa, M.A.; Guinea, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production *Pseudomonas aeruginosa* 44t1. *Biotechnology Letters*. 11(12), 871-874.
- Ron, E.Z.; Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants, *Zeitschrift fur Naturforschung*. 3, 229-236.
- Rufino, R.D.; Sarubbo, L. A.; Campos Takaki, G.M. (2007). Enhancement of stability of produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 729 – 734.
- Sarubbo, L. A. (1997). Otimização da produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* utilizando óleo de babaçu como fonte de carbono. Tese de Mestrado Universidade Federal de Pernambuco. 108.
- Sarubbo, L. A.; Porto, A.L.F.; Campos-Takaki, G.M.(1999). The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. *Canadian Journal of Microbiology*. 45, 423-426.
- Vance-Harrop, M.H.; Gusmão, N. B.; Campos-Takaki, G.M. (2003). New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34, 120-123.
- Takaki, G.M.C. (2007). Remoção de derivados do petróleo por biossurfactante produzido por leveduras. 5^o Congresso Brasileiro de Micologia. 44.
- Shepherd, R.; Rockey, J.; Shutherland, I. W.; Roleler, S.(1995). Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology*. 40. 207-217.

Paraszkiewicz, K.; Kanwal, A.; Dlugonski, J. (2002). Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. Journal of Biotechnology.92.,287-294.

Paz, M.C.F.; Barbosa, M. C.M. (2007). II Congresso de Pesquisas e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. João Pessoa – PB .

Vollbrecht, E.; Rau, U.; Lang, S. (1999). Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-tri- and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. Fett/Lipid. 101, 389-394.

Zobell, C.E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriological Reviews. 10 (1), 1 - 49.

Zhou, Q. H.; Kosaric, (1993). N. effect of lactose and olive oil on intra-and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. Biotechnology Letters.15, 477-482.

ANEXOS

Tabela – 1: Resultados do planejamento fatorial 2² do óleo do endocarpo de pequi e glicose para a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*.

Ensaio	Óleo (%)	Glic (%)	pH	Biom (g/L)	TS (mN/m)	AT Lip. (mm)	AT Est. (mm)	AE n – hex (UAE)	AE Milho (UAE)	AE Canola (UAE)	IE n – h %	IE M %	IE C %
1	10	0	3,04	0,4528	33,51	15	30	1,978	0,170	1,074	16	20	40
2	20	0	2,97	0,2029	36,12	18	40	1,920	0,602	0,380	27	19	42
3	10	1	2,82	0,5107	31,96	15	25	0,598	1,768	0,612	18	50	33
4	20	1	2,93	0,34908	35,83	14	40	0,434	1,164	0,390	27	18	50
5	5	0,5	3,03	0,3399	32,25	15	25	2,528	0,888	2,030	21	21	15
6	5	0,5	2,93	0,2075	33,06	17	25	1,588	2,472	1,528	40	19	35
7	5	0,5	3,10	1,6955	35,71	20	20	2,054	1,674	1,346	34	21	38

TS- Tensão Superficial; **AT Lip** – Atividade Lipásica; **AT Est** – Atividade Esterásica; **AE** – Atividade de Emulsificação; **IE** – Índice de Emulsificação

Tabela – 2: Resultados do planejamento fatorial 2² do óleo da amêndoa do pequi e glicose para a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*.

Ensaio	Óleo (%)	Glic (%)	pH	Biom (g/L)	TS (mN/m)	AT Lip. (mm)	AT Est. (mm)	AE n – ho (UAE)	AE M (UAE)	AE C (UAE)	IE n– h %	IE M %	IE C %
1	10	0	3,65	0,1332	41,38	15	25	1,956	1,674	2,048	20	22	13
2	20	0	2,98	0,3259	33,13	17	29	0,832	0,516	0,070	20	25	22
3	10	1	2,85	0,3622	33,73	15	30	1,076	1,418	2,586	30	20	17
4	20	1	2,64	0,4396	30,51	15	30	2,668	0,586	0,026	16	18	15
5	5	0,5	2,91	0,4324	33,38	13	45	1,048	0,896	2,566	22	24	15
6	5	0,5	3,13	0,3187	33,20	15	30	1,952	0,546	1,488	24	20	16
7	5	0,5	3,00	0,3905	33,87	14	30	2,540	1,108	2,612	29	30	20

TS- Tensão Superficial; **AT Lip** – Atividade Lipásica; **AT Est** – Atividade Esterásica; **AE** – Atividade de Emulsificação; **IE** – Índice de Emulsificação

FIGURAS

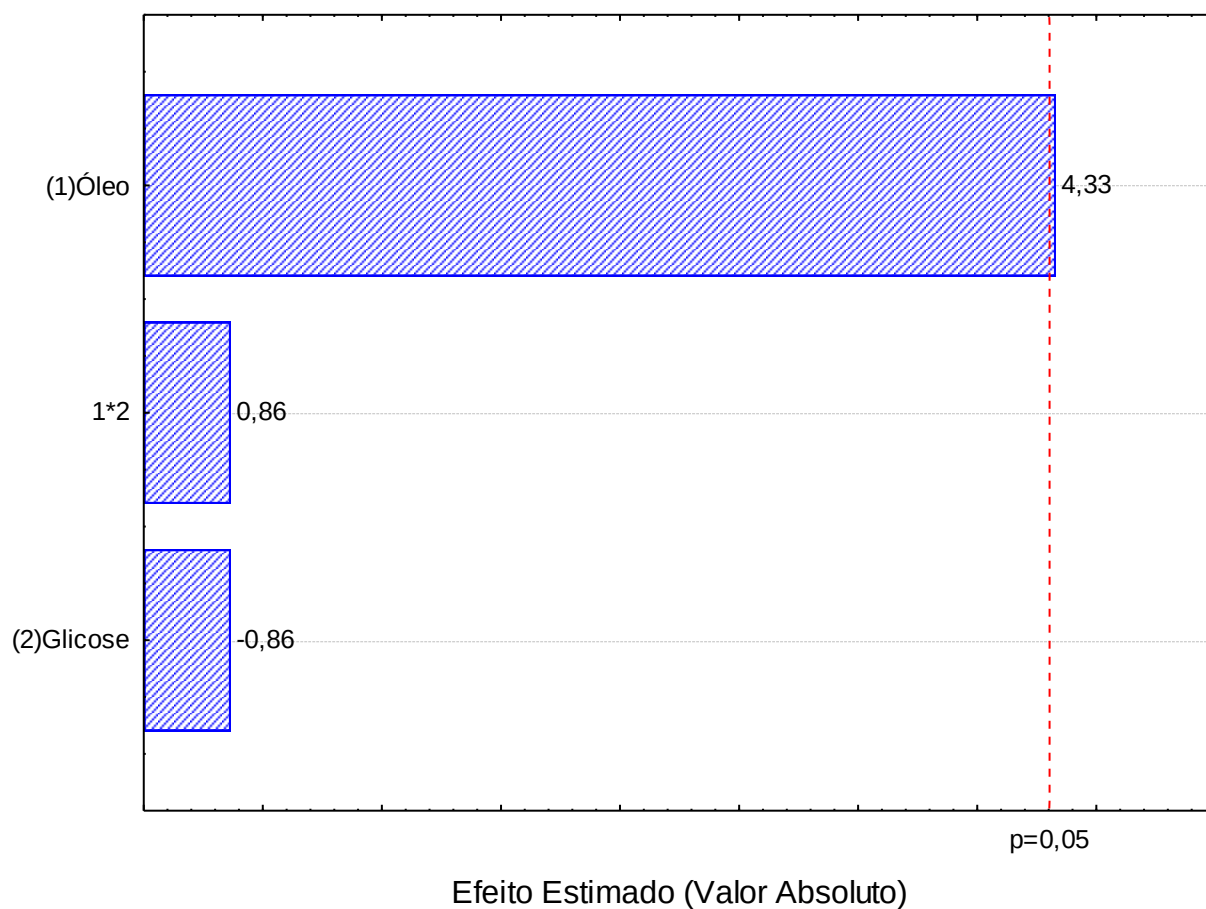


Figura - 1 Gráfico de Pareto dos efeitos principais para a produção com óleo de endocarpo do pequi, tendo como variável-resposta a Atividade Esterásica do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*.

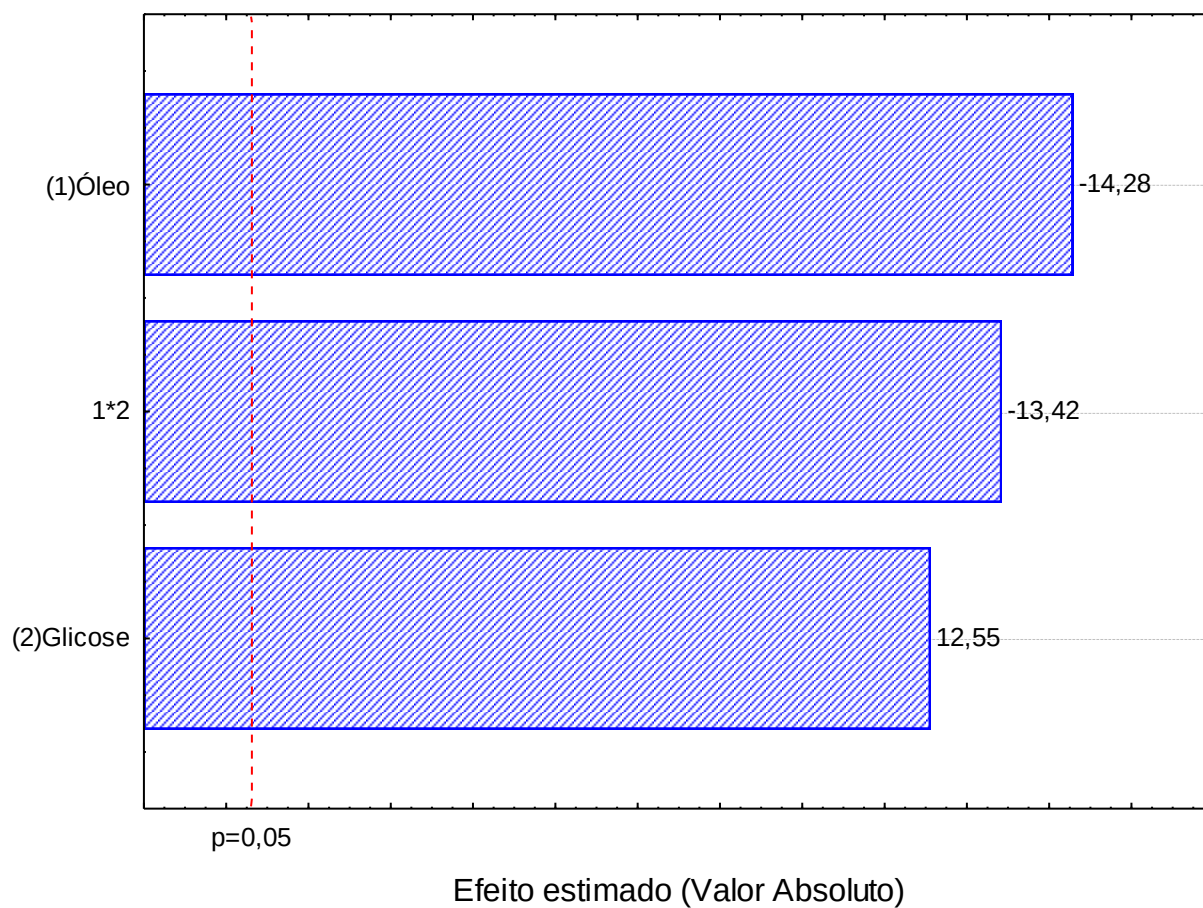


Figura - 2 Gráfico de Pareto dos efeitos principais para a produção de biossurfactante com óleo de endocarpo do pequi, tendo como variável-resposta o índice de emulsificação do biossurfactante, utilizando o óleo do milho.

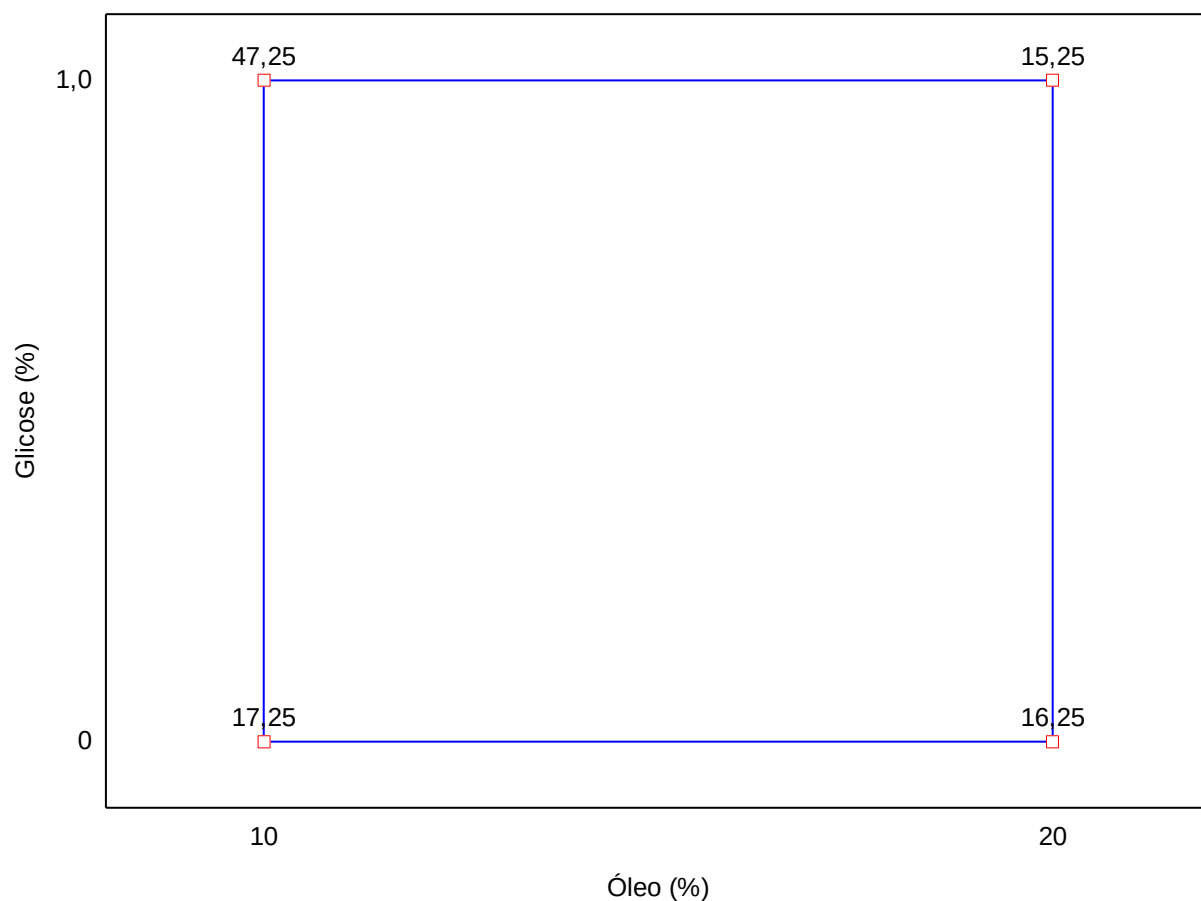


Figura 3: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos concentração de glicose e concentração de óleo do endocarpo do pequi para a produção de biossurfactante, tendo como variável-resposta o índice de emulsificação, utilizando o óleo do milho.

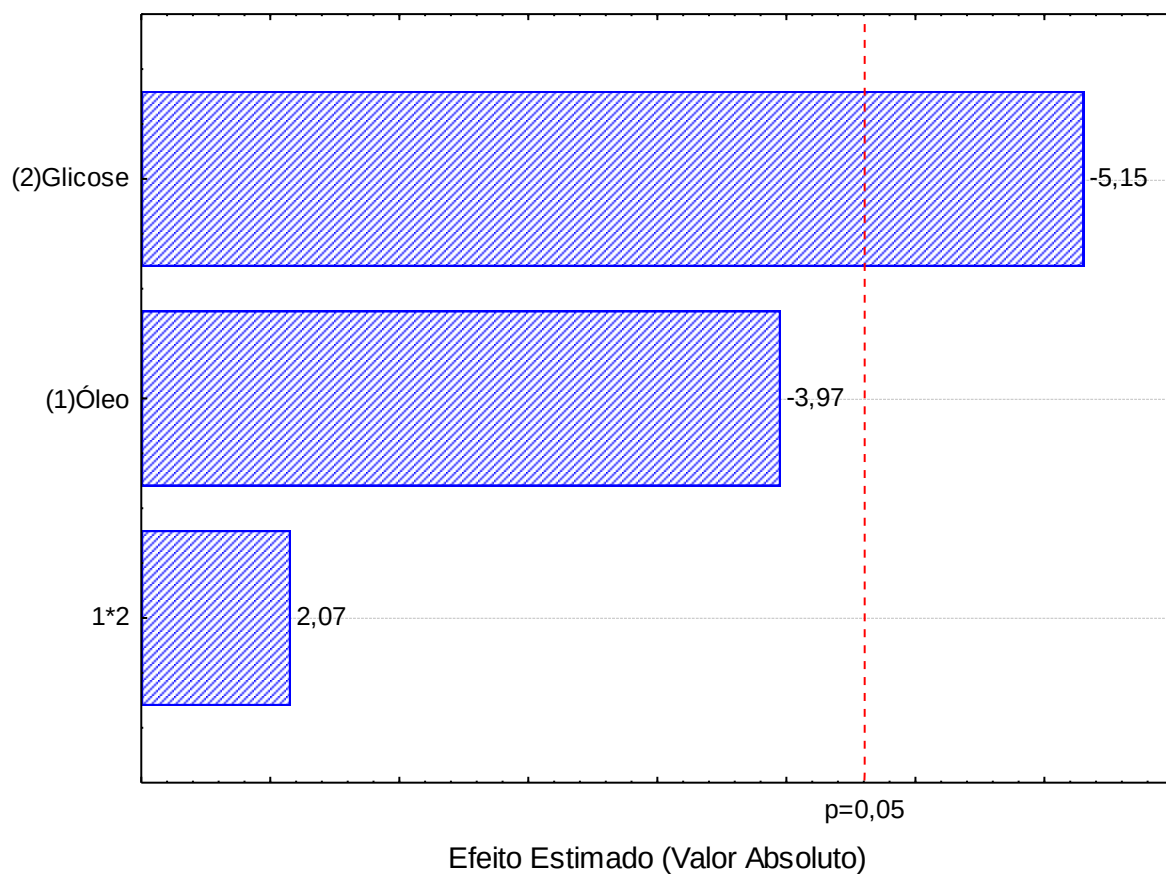


Figura - 4 Gráfico de Pareto dos efeitos principais para a produção com óleo de amêndoa do pequi, tendo como variável-resposta o pH do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*.

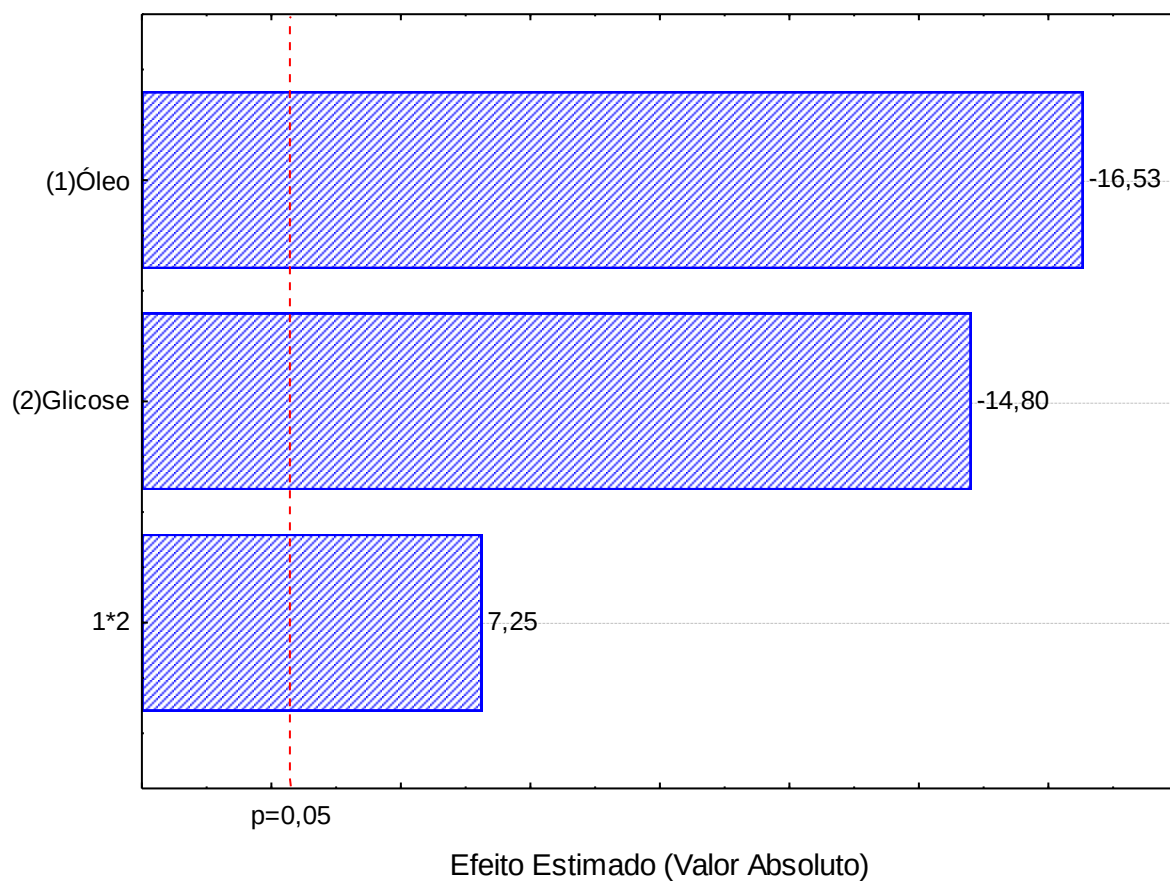


Figura - 5 Gráfico de Pareto dos efeitos principais para a produção com óleo de amêndoa do pequi, tendo como variável-resposta a tensão superficial do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*.

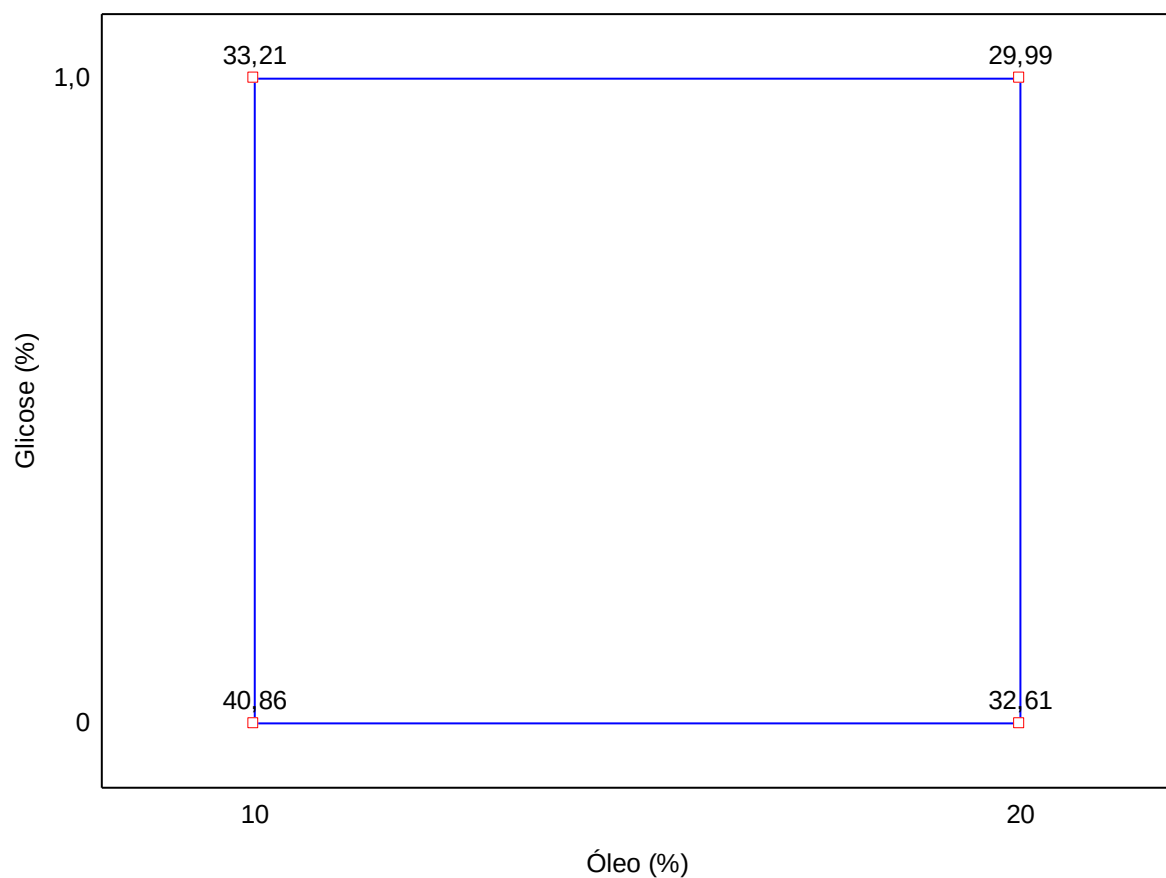


Figura - 6: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos concentração de glicose e concentração de óleo da amêndoa do pequi, tendo como variável-resposta a tensão superficial do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*.

2ª Artigo: Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* (UCP 0988) utilizando o óleo da amêndoa de pequi (*Caryocar coriaceum*) como susbtrato

Manuscrito a ser submetido ao periódico Internacional:
World Journal of Microbiology and Biotechnology

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Candida lipolytica* (UCP 0988)
UTILIZANDO ÓLEO DA AMÊNDOA DE PEQUI (*Caryocar coriaceum*) COMO
SUBSTRATO**

W.J. Santana^{1,2,3}; R.D. Rufino⁸, Porto, T.S.⁷ B.B. Neto⁵, G.M. Campos - Takaki^{4,6*},
A.L.F, Porto⁷

¹ Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-Pernambuco, Brasil

² Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN), Ceará, Brasil;

³ Faculdade de Tecnologia do Cariri (FATEC), Ceará, Brasil

⁴ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil

⁵ Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil

⁶ Departamento de Química, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Rua Nunes Machado, n. 42, Bl j Térreo, Boa Vista Cep: 50050-590, Recife – Pernambuco, Brasil

⁷ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Morfologia, Recife-Pernambuco, Brasil

⁸ Doutorado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-Pernambuco, Brasil.

* Corresponding author: E-mail; takaki@unicap.br

Fax Number: + 55- 81- 21194043

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a influência do óleo da amêndoa de pequi no crescimento e na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* (UCP 0988), utilizando um planejamento fatorial fração meia 2^{5-1} com 16 ensaios, tendo como variáveis: concentração de glicose, concentração do óleo da amêndoa de pequi, pH e diferentes concentrações de água do mar, sobre as variáveis resposta tensão superficial e índice de emulsificação. Os resultados demonstraram que o ensaio 11 (5% de óleo de amêndoa, 1% de glicose) apresentou a menor tensão superficial 27,66 mN/m e o maior índice de emulsificação 27% utilizando óleo de milho como substrato. A partir desses resultados um novo planejamento fatorial 2^2 foi realizado com quatro repetições no ponto central, com a finalidade de melhorar os valores das variáveis resposta utilizando os efeitos e interações obtidos no planejamento anterior para a produção do biossurfactante. Os resultados demonstraram que o ensaio 6 (2% de glicose e 4% de óleo da amêndoa do pequi) apresentou melhor valor de tensão superficial 30,32 mN/m e do índice de emulsificação 31%. Para avaliação da estabilidade do biossurfactante produzido foi avaliado o efeito das variáveis pH, concentração de NaCl e temperatura, utilizado como variável resposta o índice de emulsificação. O índice de emulsificação do biossurfactante apresentou-se estável em todas as concentrações de NaCl testadas, em relação a faixa de pH analisada os valores deste índice foi menor em pH 2,0 (34%) e maior valor foi obtido com o pH 12 (89%); entretanto quando se avalia o efeito da temperatura o biossurfactante apresentou-se termosensível para valores de acima de 70 ° C. Os melhores índices de emulsificação foram obtidos na temperatura de 5 ° C (86%), pH 12,0 (89%), 8% de NaCl (34%). A cinética de crescimento de *C. lipolytica* nas condições selecionadas resultou em uma produção 2,9292 g/L de biomassa em 72 horas de cultivo, apresentando uma fase exponencial de crescimento com 8 horas de cultivo, prolongando-se até 24 horas. O valor da velocidade específica de crescimento (μ_{esp}) foi 0,16 h⁻¹ com tempo de geração T_G de 4,3 h. O biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* utilizando como substrato o óleo da amêndoa de pequi, como fonte de carbono acrescido com meio mineral representa uma alternativa promissora para aplicações futuras nos mais diversos setores industriais.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*, biossurfactante, óleo de pequi, otimização.

Abstract

In this work the influence of the pequi oil was evaluated (almond) in the growth and in the biosurfactant production for *Candida lipolytica* (CPU 0988), using a planning factorial fraction stocking 2^{5-1} with 16 rehearsals, tends as variables: glucose, oil of the almond of the pequi, pH and different concentrations of water of the sea. Under the variable answer of the superficial tension and emulsification index the results demonstrated that the rehearsal 11 (5% of oil, 1% of glucose), it presented to smallest superficial tension 27.66 mN/m and emulsification index 27%. Those results a new factorial planning 2^2 were accomplished, with central point with four repetitions, with the purpose of optimizing the middle of production of the biosurfactant. The results demonstrated that the rehearsal 6 (2% of glucose and 4% of oil of the almond of the pequi), it presented the best superficial tension 30.32 mN/m and emulsification index 31%. Para verification of the stability of the produced biosurfactant, the emulsification index was used with the variables: pH, NaCl and temperature, the best emulsification forum indexes obtained in the treatments: 00 C (70%), pH 12.0 (89%); 8g of NaCl (34%). The kinetics of growth of *C. lipolytica* in optimized conditions resulted in a biomass production 2.9292 g/L in 72 hours of cultivation. The exponential phase of growth of *C. lipolytica* was observed with 8 hours of cultivation, being prolonged up to 24 hours. The specific speed of growth was (μ_{esp}) .0.16 h⁻¹, with time of generation TG of 4.3 h. With 30horas of growth it happened a dioxin and after 32 hours the stationary phase was observed. The biosurfactant produced by *Candida lipolytica* with the influence of the pequi oil (almond) as source of carbon added with mineral middle represents an alternative of production of a biopolymer with respective future applications in the most several industrial sections. The search for new alternatives of biosurfactants production has been growing all over the world, seeking to reduce production costs in relation to the synthetic surfactant.

Word-key: *Candida lipolytica*, biosurfactant, pequi oil, optimization.

INTRODUÇÃO

A busca por surfactantes naturais em substituição aos sintéticos tem incentivado um grande número de pesquisas para produção de biossurfactantes, utilizando microrganismos cultivados em resíduo industrial, substratos vegetais e meios de cultura de baixo custo, visando a aplicação dessas biomoléculas no controle da poluição ambiental, nas indústrias de cosméticos, têxtil, farmacêutica, alimentícia, cerâmica, papel, metal e produtos de limpeza.

Biossurfactantes são compostos anfipáticos capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos, considerados macromoléculas, total ou parcialmente extracelulares (BICCA *et al.*, 1999). Em geral são produzidos por microrganismos que crescem em hidrocarbonetos imiscíveis em água (INOH *et al.*, 2003), embora alguns tenham sido produzidos em substratos solúveis como glicose, glicerol e etanol.

Os biossurfactantes possuem características importantes frente aos surfactantes sintéticos, tais como a alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, resistência a altas concentrações salinas e estabilidade quanto a variações de pH (KIM *et al.*, 2000). Estas características permitem a sua utilização em diversos setores industriais (BANAT *et al.*, 2000). O potencial de aplicação é baseado nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Dessa forma, a produção de agentes tensoativos pode ser direcionada para uma determinada aplicação, considerando a formação de emulsões estáveis ou a redução da tensão superficial.

A problemática da produção de biossurfactantes, no entanto pode ser significativamente reduzida através do uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis e de baixo custo, como o efluente da indústria de óleo de oliva, resíduos de óleo lubrificantes e óleos vegetais domésticos (MERCADÉ *et al.*, 1993; MERCADÉ *et al.*, 1996; VOLLBRECHT *et al.*, 1999; DELEU & PAQUOT, 2004).

Segundo Gruber e colaboradores. (1993), o pré – requisito para a produção de biossurfactante é a obtenção de produtos com grande atividade, obtidos a partir de substratos de baixo custo por processos economicamente viáveis e com

alto rendimento. A literatura enfatiza várias fontes de carbono, incluindo rejeitos agrícolas, como açúcares e óleos, como substratos com potencial para produção de biossurfactantes com aplicabilidade na indústria e no meio ambiente (GALLERT, 2002). Um bom rendimento em produtos tem sido obtido através da combinação entre o óleo vegetal e um carboidrato como substratos (ZHOU & KOSARIC, 1993).

O óleo de pequi é originário de fonte oleaginosa regional, podendo ser utilizado como fonte alternativa de carbono, como também substrato para fermentações microbianas de baixo custo; apresenta em sua composição química: 0,9 g de lipídeos, 1,2 g a 21,6 g de glicídeos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e a estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* utilizando óleo da amêndoa do pequi e meio mineral 2:1 v/v água do mar e água destilada com a base constituída de sulfato de amônia 11% e fosfato de potássio 2,04% como uma nova alternativa de baixo custo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo: Os estudos foram realizados utilizando a *C. lipolytica* UCP 0988, como microrganismo produtor de biossurfactante, pertencente à coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco, a qual foi mantida em meio Yeast Mold Agar (YMA) constituído por extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, triptona 0,5%, glicose 1% e ágar 2%, água destilada q.s.p. 100mL e o pH 5,5.

Substrato: Os substratos utilizados para produção do biossurfactante foram os óleos da amêndoa do pequi, obtidos comercialmente dos produtores da Região da Chapada do Araripe do Sul do Ceará. A composição em ácidos graxos do óleo da amêndoa do pequi é a seguinte: Ácido cáprico 4,7%; ácido láurico 1,1%; ácido mirístico 47,8%; ácido palmítico 0,8%; ácido palmitoléico 0,7% e ácido oléico 25,1%.

Meio de produção e condições de cultivo: A *C. lipolytica* UCP 0988 foi crescida em meio Yeast Mold Broth (YMB): contendo: extrato de malte – 0,3%, extrato de levedura – 0,3% , triptona- 0,5% , d-glicose 1%, 100mL de H₂O, pH do meio

ajustado para 5,5. Os cultivos para a produção do biossurfactante foram realizados em frascos Erlenmeyer com 1000 mL de capacidade contendo 300 mL de meio de produção descrito por Vance – Harrop e colaboradores (2003), suplementado com diferentes concentrações de óleo da amêndoa do pequi de acordo com o planejamento experimental, utilizando um inóculo de 10^7 células/mL, foram incubados em agitador orbital a 150 rpm por 72 horas a 28 °C. Após o tempo máximo de cultivo as células foram separadas do líquido metabólico por centrifugação a 3000 x g, e o sobrenadante foi filtrado em filtro com porosidade de 0,22 µm. A biomassa foi utilizada para avaliar o crescimento e o líquido metabólico livre de células para determinação do pH, índice de emulsificação, atividade de emulsificação, tensão superficial, estabilidade e cinética de crescimento

Biomassa

A biomassa foi determinada, por gravimetria (Garcia-Ochoa & Casas, 1999).

Índice de emulsificação (IE) e atividade de emulsificação (AE)

A determinação da atividade de emulsificação, das amostras do líquido metabólico livre de células foi analisada conforme descrito por Cooper e Goldenberg (1987); onde 1,0 mL dos compostos (n-hexadecano, óleo de canola, milho), foram adicionados a 2 ml do líquido metabólico livre de células em tubos graduados e agitados em vórtex durante 2 min. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24h e logo após foi calculado o índice de emulsificação (IE) o qual foi definido pela razão entre a altura da emulsão e a altura total, sendo o valor multiplicado por 100 expresso em porcentagem. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A atividade de emulsificação foi realizada conforme Cirigliano e Carman (1984), 1mL do líquido metabólico livre de células foi colocado em tubos de ensaio (15 x 125 mm), adicionado 1mL de solução tampão acetato de sódio 0,1M (pH 3,0), e 0,5 ml dos diferentes substratos: (óleo de milho, óleo de canola e n-hexadecano). Em seguida, o tubo foi agitado por 2 min a 25 °C em vórtex. A emulsão obtida foi deixada em repouso por 10 minutos e em seguida determinada à absorbância a 540 nm. O líquido metabólico foi utilizado como branco. A

unidade de Atividade de Emulsificação (U.A.E) foi definida com a quantidade de emulsão produzida.

Determinação do pH

A determinação do pH do líquido metabólico livre de células foi realizada utilizando um potenciômetro Orion (modelo 310).

Tensão superficial

A tensão superficial foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kuyukina e outros pesquisadores (2001), em tensiômetro automático (Sigma 70-KSV Instruments LTD, Finlândia), utilizando o anel de DuNuoy em temperatura ambiente (28 °C), sendo o resultado expresso em mN/m.

Planejamento fatorial 2^{5-1}

Um planejamento fatorial fração meia 2^{5-1} foi realizado com objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes: glicose e óleo da amêndoa do pequi, pH inicial, meio mineral e inoculo, sobre as variáveis resposta tensão superficial, índice de emulsificação, atividade de emulsificação, cinética de crescimento, determinação do consumo de glicose (Tabela 01)

Planejamento fatorial 2^2 com ponto central em quadruplicata

Um planejamento fatorial 2^2 com ponto central repetido em quadruplicata foi realizado a partir da condição 5% de óleo, 1% de glicose, pH 4,5, inóculo 10^7 e meio mineral (2:1 v/v) água do mar e água destilada de acordo com planejamento fatorial fração meia 2^{5-1} com o objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes: glicose e óleo: amêndoa do pequi sobre as variáveis resposta pH inicial, meio mineral, inoculo 10^7 células /mL que foram mantidas para todas as condições do planejamento 2^2 , para verificação da tensão superficial, índice de emulsificação (Tabela 1).

Cinética de crescimento

O cultivo para produção do biossurfactante foi realizado com a melhor condição do planejamento fatorial 2^{5-1} . Erlenmeyers com 250 mL de capacidade foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 72 horas, a temperatura 28°C.

O líquido metabólico foi coletado nos seguintes tempos: 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 18 h, 24 h, 30 h, 32 h, 48 h, 56 h e 72 nh, sendo utilizado para verificação da tensão superficial, pH e consumo de glicose.

Determinação da velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{esp.}}$) e o tempo de geração (T_G).

Determinação da velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{esp.}}$) e o tempo de geração (T_G) foram determinados segundo a fórmula descrita por Pirt (1975). Para velocidade específica de crescimento foi utilizada a equação:

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

Onde: X = biomassa final

X_0 = biomassa inicial

T = tempo final

T_0 = tempo inicial

O tempo de geração (T_G) foi determinado pela fórmula: $T_G \ln 2 / \mu_{\text{esp}}$

Determinação do consumo de Glicose

O consumo da glicose foi determinado pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (1956), as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital (Spectronic md Genesys 2) num comprimento de onda de 500 nm, utilizando glicose como padrão.

Estabilidade do agente surfactante frente a variações de pH, adição de NaCl e temperatura)

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada através da determinação do índice de emulsificação, em diferentes temperaturas (0, 5, 70, 100 e 120 °C), diferentes concentrações de NaCl (2, 4, 6, 8 e 10 %), e diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10 e 12) (ABU-RUWAIDA *et al.*, 1991; CAMEOTRA & MAKKAR, 1998; KIM *et al.*, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção do biossurfactante do planejamento fatorial meia fração 2^{5-1}

A produção do biossurfactante foi avaliada no líquido metabólico livre de células após 72 horas de cultivo. A menor tensão superficial (27,66 mN/m), foi obtida no ensaio 11 (5% de óleo 1% de glicose) com o pH 4,5 e um índice de emulsificação de (27%). O presente estudo demonstrou que estas variáveis influenciaram positivamente a produção do biossurfactante (Figura 1 e Tabela 1). Os testes realizados no líquido metabólico com diferentes valores de pH (4,5 5,0 e 5,5) demonstraram influenciar as tensões superficiais obtidas neste planejamento. Resultados contrários foram obtidos por KIM *et al.*, (2000) que obtiveram tensões superficiais do biossurfactante produzido por *Nocardia* sp L-417 estáveis em todas as faixa de pH testados (4,5 e 5,5), indicando que a variação do pH não teve efeito significativo sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido. BEDNARSKI, *et al.*, (2004) estudaram a produção de biossurfactante por *Candida antártica* ATCC20509 e *Candida apicola* ATCC96134 utilizando um resíduo da refinaria de óleo, observaram que a acidez do meio é um importante parâmetro, estando correlacionado com a síntese de biossurfactante do tipo glicolipídeos.

O nível mais baixo de pH depende da concentração de ácidos orgânicos presentes no meio, como produtos da fermentação realizada pelos microrganismos, principalmente carboidratos, como glicose (HISTATSUK, 1971).

A presença da glicose nos cultivos de *C. glabrata* foi um fator determinante da acidez do meio, já que em sua presença, houve uma redução do pH, o qual atingiu valores estáveis igual a 3,0 no início da fase estacionária de crescimento, pela presença de ácido pirúvico (LUNA, 2006).

As variáveis do planejamento fatorial meia fração 2^{5-1} foram avaliadas na produção do biossurfactante. Os resultados demonstraram que o pH e o óleo aumentaram a tensão superficial do biossurfactante, enquanto que a glicose e o meio mineral baixam a tensão superficial (Figura 02)

Em relação ao índice de emulsificação, os resultados revelaram que aumentando o meio de produção, teremos um melhor índice de emulsificação. O óleo e o pH e a glicose não influenciaram o índice de emulsificação (Figura 03).

Os valores de tensão superficial foram semelhantes aos relatados para outros biossurfactantes produzidos por leveduras cultivadas em óleos vegetais e

carboidratos como substratos (DAVILA, *et al.*, 1992; MARIN, 1996). Fox & Bala (2000), destacaram o potencial e a viabilidade econômica dos resíduos ricos em amido provenientes do processo industrial da batata na produção de biossurfactante, onde a tensão superficial foi reduzida de 71,3 mN/m para 28,3 mN/m. O biossurfactante produzido por *C. lipolytica*, utilizando o óleo de pequi como fonte alternativa de carbono, apresentou uma tensão superficial (27,66 mN/m) bastante promissora (Tabela 1), demonstrando que o óleo de pequi é uma nova fonte alternativa para produção de biossurfactante, a qual poderá ser utilizado em várias indústrias, diminuindo muitos custos de produção. Há uma interação entre a tensão superficial e as variáveis: meio de produção, glicose, óleo de pequi e inóculo, baixando a tensão superficial.

Produção de biossurfactante do planejamento fatorial 2²

A maximização da produção de metabólitos de interesse industrial a partir de processos fermentativos, como os biossurfactantes, entretanto, requer a padronização do meio e das condições de cultivo (DUFF *et al.*, 1973; ZHOU & KOSARIC, 1993; SARUBBO *et al.*, 2006)

Os resultados do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*, demonstraram que as variáveis: glicose e óleo não foram estatisticamente significativos em relação a variável resposta tensão superficial (Figura 4). O ensaio 6 (4% de óleo e 2% de glicose) apresentou a menor tensão superficial (30,32 mN/m), e o índice de emulsificação de (31%) demonstrados na (Tabela 2). As variáveis: óleo de pequi e glicose apresentaram interações positivas e significantes em relação a tensão superficial, demonstrando que a diminuição dos níveis de ambas variáveis apresentam efeito significativo para produção do biossurfactante (Figura 4 e 5).

Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes valores de pH

Na tentativa de avaliar a estabilidade um novo biossurfactante para ser utilizado nas indústrias, foram realizados ensaios utilizando o óleo da amêndoa do pequi analisando a influência das pH, NaCl e temperatura sobre o índice de emulsificação (Tabela 3).

A Tabela 3 ilustra a influência de diferentes concentrações do pH na estabilidade do biossurfactante, avaliada através do índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células. O índice de emulsificação apresentou

alterações significativas quando submetidos a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12). Contudo, observou-se um aumento da emulsão quando submetido ao pH 12 (89%). Estudos realizados com *Candida glabrata* UCP 1002, demonstraram que a variação do pH não exerceu grande influência sobre a capacidade de emulsificação do líquido metabólico, embora um aumento tenha sido observado no pH 12 para emulsificação com óleo de algodão (SARUBBO *et al.*, 2006).

Para Rufino e outros pesquisadores (2007), a estabilidade do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*, quando submetido a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8, 10), observou-se que não houve alterações significativas no valor da tensão superficial, contudo houve um discreto aumento da tensão superficial quando submetida ao pH 12. Segundo Ghurye & colaboradores (1991), a desnaturação de componentes protéicos ou o aumento da ionização do meio pode ocasionar a variação da tensão superficial e do índice de emulsificação. Estudos realizados com *Candida glabrata* UCP 1002 no líquido metabólico livre de células, produzido em condições otimizadas demonstraram que a variação de pH não exerceu grande influência no índice de emulsificação do líquido metabólico, porém no pH 12 observou-se um aumento (LUNA, 2007). Makkar e Cameotra (1998), também obtiveram valores estáveis de índice de emulsificação ao longo da ampla faixa de pH para o líquido metabólico de *B. licheniformis*.

Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes concentrações de NaCl

A influência de diferentes concentrações de NaCl na estabilidade do biossurfactante avaliada através do índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células, apresentou variações no índice de emulsificação quando submetidos a várias concentrações, sendo a concentração (8%) a que apresentou o melhor índice de emulsificação 34% (Tabela 3). Estes resultados são bastante promissores, considerando que concentrações acima de 25 de NaCl são suficientes para inibir a atuação de surfactantes sintéticos (DESAI & BANAT, 1997). A adição de 10% de NaCl ao líquido metabólico livre de células do biossurfactante produzido por *Candida glabrata* UCP 1002 provocou uma redução de aproximadamente 20% na atividade de n-hexadecano e óleo de milho, mostrando tolerância da emulsão a elevadas concentrações de sal (SARUBBO *et al.*, 2006). O biossurfactante produzido por *Candida glabrata*, manteve-se estável quando submetido a várias concentrações de NaCl (LUNA, 2007).

Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes temperaturas

A Tabela 3 ilustra a influência da temperatura no índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células, quando submetido a altas e baixas temperaturas. Na temperatura mais baixa de 0°C, foi observado o melhor índice de emulsificação (70%), favorecendo o aumento da emulsão. A variação da temperatura não exerceu grande influência na capacidade de emulsificação do líquido metabólico livre de células do biossurfactante de *Candida glabrata* UCP 1002 (SARUBBO *et al.*, 2006). A capacidade de emulsificação de liposan de *Candida lipolytica* demonstrou relativa estabilidade entre 30° e 90°C, embora 60% de sua atividade tenha sido perdida após 1 hora a 100°C (SOON *et al.*, 2004). A estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* foi avaliada através da tensão superficial, sendo um fator importante para sugerir a utilização do biossurfactante em condições ambientais extremas (MULLIGAN, 2005). Os resultados obtidos por Brown e colaboradores (1985), para o biossurfactante produzido por bactéria, isolado (1165), demonstraram uma redução na tensão superficial do líquido metabólico livre de células quando submetidos a temperaturas entre 0°C e 4°C, embora quando exposto a temperaturas elevadas (100°C e 120°C) tenham apresentado valores de tensões estáveis, entre 30,5 mN/m e 31,8mN/m.

Perfil de crescimento de *Candida lipolytica*

A cinética de crescimento de *C. lipolytica* foi realizada em condições otimizadas com um pH inicial de 4,5, 5% de óleo e 1 % de glicose (Figura 6). Os resultados demonstraram que o pH permaneceu ácido variando entre 2,8 (4h) a 4,6 durante 7 h (Figura 6). Estudos realizados por Cunha *et al.* (2004), sobre a produção de biossurfactante utilizando gasolina como substrato, com o pH inicial de 7,5 atingindo valores próximos de 6,0 ao final da fermentação. O crescimento do microrganismo em meio ácido ou básico, é importante para manter o pH intracelular próximo da neutralidade, não importando o pH externo, através da expulsão ou absorção de íons hidrogênio pelas bombas de íons presentes na membrana celular. A glicose nos cultivos de *C. lipolytica* foi um parâmetro importante na acidez do meio (Figura 6). Bednarski *et al.* (2004), estudaram a produção de biossurfactante por *C. antarctica* ATCC20509 e *C. apícola*

ATCC96134 utilizando um resíduo de refinaria de óleo, observaram que a acidez do meio é um importante parâmetro, estando correlacionada com a síntese de biossurfactante do tipo glicolípídeos. A atividade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* também foi estável a vários pHs (MAKKAR & CAMEOTRA, 1998), embora a efetividade do liposan de *C. lipolytica* como emulsificante tenha sido limitada à faixa de pH ácido (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984). A maior produção de biossurfactante neste trabalho ocorreu com 24 horas de fermentação, sendo evidenciada através da redução da tensão superficial 28,85mN/m (Figura 6).

A Figura 6 demonstra a cinética de crescimento de *C. lipolytica* avaliando à produção de biomassa obtida em condições selecionadas. Observou-se que a maior produção (2,9292 g/L) ocorreu em 72 horas de cultivo. Rufino (2006) obteve uma concentração de biomassa de 11g/L em 50 horas de cultivo com *C. lipolytica*. Para Brown *et al.* (1985), a máxima concentração de biomassa obtida foi de 4g/L após 36 horas de cultivo. O início da fase exponencial de crescimento de *C. lipolytica* foi observado com 8 horas de cultivo, prolongando-se até 24 horas de cultivo. A velocidade específica de crescimento foi (μ_{esp}) $0,16\ h^{-1}$, com tempo de geração T_G de 4,3 h, com 30 horas de crescimento ocorreu uma diauxia. Após 32 foi observada a fase estacionária de crescimento, a fase de declínio não foi observada, devido à curva ser construída em 72 horas (Figura 6). A maior produção de biossurfactante ocorreu na fase exponencial de crescimento, tendo sido evidenciada através da redução da tensão superficial do meio de cultivo (35,06) com 16 horas de cultivo (Figura 6). A produção de biossurfactante na idiofase (fase estacionária de crescimento) ocorreu tendo em vista o microrganismo já ter produzido metabólitos primários (trofofase), necessários ao seu desenvolvimento, a partir das fontes de carbonos. Os resultados obtidos foram apoiados pelos estudos por Sarubbo, *et al.* (1997) onde foi avaliada a produção de bioemulsificantes por duas linhagens de *Candida lipolytica* 1055 e 1102, utilizando meio suplementado com babaçu e 1% de glicose como fonte de carbono. A produção de bioemulsificantes foi observada na fase exponencial de crescimento e no início da fase estacionária.

A figura 6 apresenta os valores da glicose residual durante 72 horas na cinética de crescimento, onde o menor valor de glicose não consumida ocorreu em 56 horas (0,6666 g/L). Para Histatsuk (1971), as concentrações de ácidos orgânicos contidos no meio, como os produtos da fermentação realizada por

microrganismo, principalmente de carboidratos, como glicose são importantes na produção de biossurfactante. Estudos com *C. glabrata* com a influência do óleo de algodão, glicose e malte, foi observado que a presença da glicose foi um fator determinante na produção de biossurfactante (Luna, 2007).

CONCLUSÕES

A utilização de planejamento fatorial como ferramenta estatística é de grande importância na formulação de experimentos biotecnológicos. A produção de biossurfactante utilizando o meio mineral e óleo de amêndoa do pequi representa uma alternativa para produção de biossurfactante com potencial de utilização como agente surfactante e emulsificante com respectivas aplicações futuras em diversas indústrias. Diante da grande importância dos biossurfactantes na indústria, são necessárias pesquisas utilizando óleos vegetais como fonte de carbono como óleo de pequi (amêndoa), bastante rico em ácidos graxos, nativo de várias regiões do nosso país, o que torna o pequi uma nova fonte alternativa de carbono para produção de biossurfactante participando do setor produtivo e gerando dividendos para a região Nordeste e para o país;

AGRADECIMENTOS: Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Alexopoulos, C.J. Mims, C.W., Blackwell, M. (1996) Introductory Mycology. John Wiley and Sons, New York – 4th ed
- Brow, M.J, Foster, M, Moses, V, Robinson, J.P, Shales, S.W, Springham, D.G. (1985) In: proceedings of the 3rd european meeting on improved oil recovery, Rome
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S. (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 50:520-529
- Cirigliano, M. C. & Carman (1985) Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology 50: 846-850
- Cooper, D. G., Zajic, J.E. (1980) Surface-active compounds from microorganisms. Advances in Applied Microbiology 26: 229-253

- Cunha, C.D, Rosário, M., Rosado, A.S, Leite, S.G.F (2004) *Serratia* sp. svvg16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *process biochemistry* 39:2277 – 2282
- Daniel, H. J, Ress, M., Sylatk, C. (1998) Production of sorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola*. *Biotechnology Letters* 20:1153-1156
- Desai, J.D, Banat, I.M (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbial Mol Rev.* 61: 47-64.
- Ghurye, G.L, Vipulanandan, C, Wilson, R.C (1994) A practical approach to biosurfactante production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng* 44:661-666
- Haba, E et.al (2000) Screening and production of rhamnolipids *pseudomona aeruginosa* 47t2 ncib 40044 from waste flying oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:379-387
- Holmberg, K (2002) *H andbook of applied surface and colloid chemistry*. John Wiley, New York, 1
- Kim, S.H, Lim, E. J, Lee, J.D, Lee, T. H. (2000) Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. I-417. *Biotecchnology and Applied Biochemistry*, 31: 249-253
- Lang, S. & Wullbrandt, D (1999) Rhamnose lipds-biosynthesis, microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology* 51:21-32
- Lin, S.C. (1996) Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 66: 109 – 120
- Makkar, R.S, Cameotra, S.S (1998) Shyntesis of biosurfactante in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 747-750.
- Makkar, R.S, Cameotra, S.S. 1999(b) Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *bacillus subtilis* at thermophilic conditions. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2: 371-376
- Makkar, R.S, Cameotra, S.S (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* . 58: 428 – 434

- Mulligan, C.N (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*. 133:183-198
- Nitschke, M, Pastore, G.M. (2002) Biosurfactants: propriedades e aplicações. *Química Nova*. 25: 772-776
- Paz, M.C.F (2005) Identificação e caracterização de *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus* na produção de biossurfactante e degradação de dibenzotiofeno (dbt) – por uma nova amostra de *geobacillus stearothermophilus* ucp 986. (Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco), Recife-Pe
- Ron, E.Z., Rosenberg, E (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 3: 229 – 236
- Sarubbo, L (1997) A. otimização da produção de biopolímeros por *candida lipolytica* utilizando óleo de babaçu como fonte de carbono. Tese de Mestrado Universidade Federal de Pernambuco 108
- Sarubbo, L. A., Porto, A.L.F, Campos-Takaki, G.M. (1999) The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *candida lipolytica*. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 423-426
- Sarubbo, L. A, Marçal, M.C.R, Neves, M.L.C, Silva, M.P.C, Porto, A.L.F, Campos-Takaki, G.M (2001) Bioemulsifiers by *candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 95:59-67
- Soon, E.L, Salleh, A.B, Basri, M, Rahman, R.N.Z.A, Kamaruddin, K (2004) Response surface methodological study on lipase – catalyze synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochemistry*. 39: 1511 – 1518
- Vance-Harrop, M.H.V, Rocha, J.A.M.R, Sarubbo, L.A, Carntilizeiro da Cunha, M. G, Campos-Takaki, G. M. (1997) Utilization of babassu oil to produce biosurfactant with *Candida lipolytica* xxvi Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ Caxamba
- Vance-Harrop, M.H.V (2000) Influência das fontes de carbono d-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biossurfactantes. Recife, p.72. Dissertação de Mestrado em Biologia de Fungos. Universidade Federal de Pernambuco
- Vance-Harrop, M.H, Gusmão, N.B, Campos-Takaki, G.M (2003) New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using d-glucose and babassu oil as carbon sources. *Brazilian Journal of Microbiology*.34: 120-123

SANTANA, W.J. Produção de Biossurfactante por *Candida lipolytica* (UCP 0988) utilizando

Vollbrecht, E, Rau, U, Lang, S (1999) Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di – tri -, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *tsukamurella spec.* *fett/lipid.* 15: 477 – 482

ANEXOS

TABELAS

Tabela 1. Valores das variáveis independentes: óleo da amêndoa do pequi, glicose, pH, meio mineral e inóculo em todas as condições do planejamento fatorial fração meia 2^{5-1} . Variáveis resposta da tensão superficial, índice de emulsificação e atividade de emulsificação

ENSAIO	CONC ÓLEO (mL)	GLIC (g)	pH INICIAL	MEIO v/v (água d mar: água destilada)	INÓCULO (cel/mL)	Tensão Superficial mN/m	Índice de emulsificação (%)	Atividade de Emulsificação (U.A.E)
1	5	0,5	4,5	1:2	10^7	31,73	22	1,895
2	10	0,5	4,5	1:2	10^5	36,22	17	1,895
3	5	1	4,5	1:2	10^5	31,80	18	1,896
4	10	1	4,5	1:2	10^7	31,13	22	1,895
5	5	0,5	5,5	1:2	10^5	34,81	18	1,896
6	10	0,5	5,5	1:2	10^7	33,42	25	1,896
7	5	1	5,5	1:2	10^7	31,25	22	1,896
8	10	1	5,5	1:2	10^5	33,69	25	1,895
9	5	0,5	4,5	2:1	10^5	30,74	24	1,896
10	10	0,5	4,5	2:1	10^7	31,81	22	1,896
11	5	1	4,5	2:1	10^7	27,66	27	1,895
12	10	1	4,5	2:1	10^5	31,12	25	1,896
13	10	0,5	5,5	2:1	10^7	32,60	23	1,895
14	10	0,5	5,5	2:1	10^5	32,03	23	1,896
15	5	1	5,5	2:1	10^5	30,89	24	1,895
16	10	1	5,5	2:1	10^7	34,05	24	1,896

As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores:

Glicose 1 (1%), e 0,5 (0,5%)

Óleo da amêndoa do pequi 5 (5%) e 10 (10%).

Tabela 2. Valores das variáveis independentes: óleo da amêndoa do pequi e glicose do planejamento fatorial 2^2 nos níveis +1 +3 e +5 e no ponto central. Variável resposta da tensão superficial e índice de emulsificação

ENSAIOS	GLICOSE (%)	ÓLEO (%)	TENSÃO SUPERFICIAL mN/m	ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (%)
1	1	3	31.51	26
2	3	3	30.37	31
3	1	5	30.42	23
4	3	5	30.61	21
5	2	4	30.53	22
6	2	4	30.32	31
7	2	4	30.61	26
8	2	4	30.68	31

As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores:

1 (1%), 2 (2%) e 3 (3%) para glicose e para o óleo da amêndoa do pequi 3 (3%), 4 (4%) e 5 (5%).

Tabela 3. Influência do NaCl, pH e Temperatura na estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* contendo 2% de glicose e 4% de óleo da amêndoa do pequi, avaliada através do índice de emulsificação.

NaCl (%)	Índice (%)	pH	Índice (%)	Temperatura (°C)	Índice (%)
2.0	30.0	2.0	34.0	0	70.0
4.0	24.0	4.0	50.0	5	86.0
6.0	31.0	6.0	45.0	70	24.0
8.0	34.0	8.0	44.0	100	47.0
10.0	27.0	10.0	50.0	120	68.0
		12.0	89.0		

FIGURAS

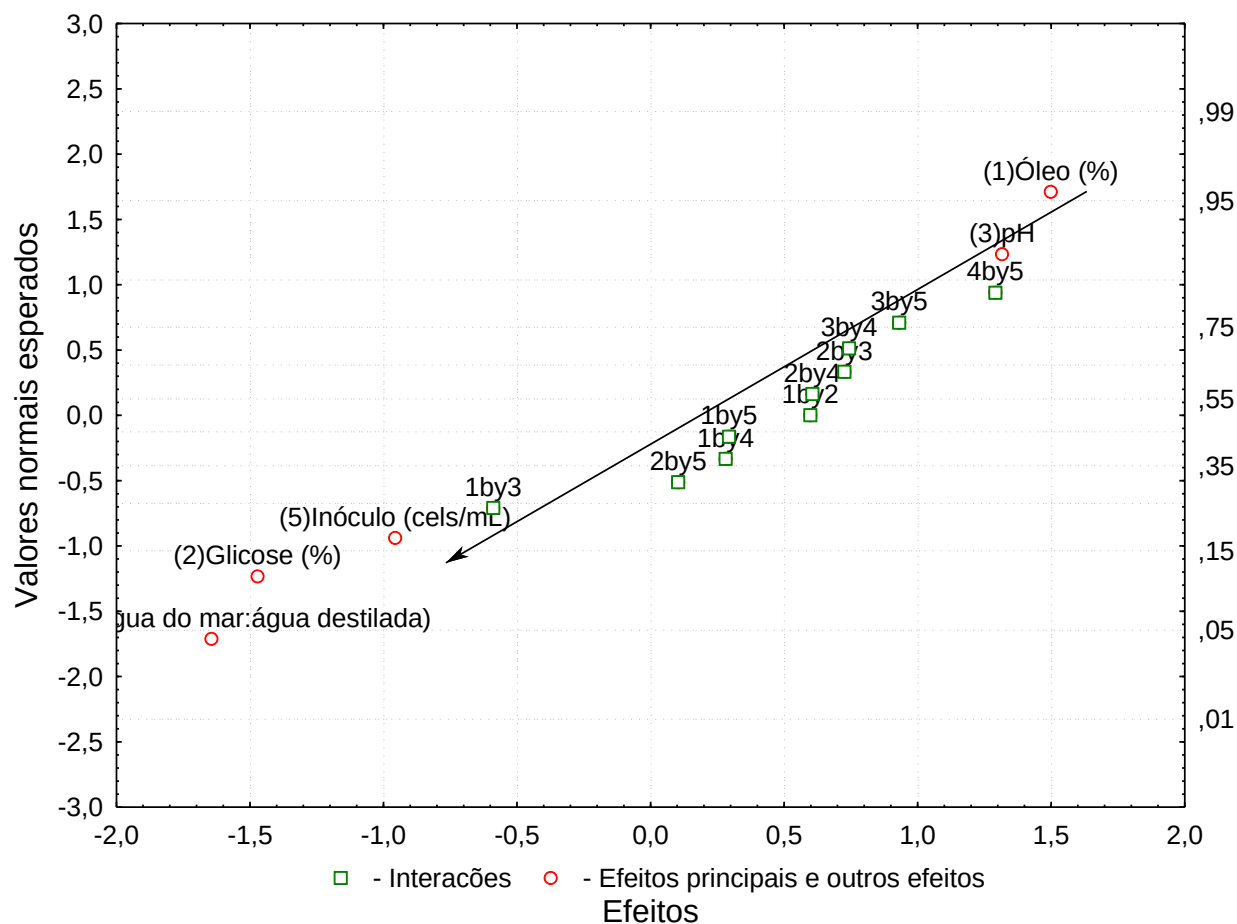


Figura 1. Gráfico normal dos efeitos das variáveis (óleo, meio, glicose, pH e inoculo) e Interações sobre a tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica* do planejamento fatorial fração meia 2^{5-1} .

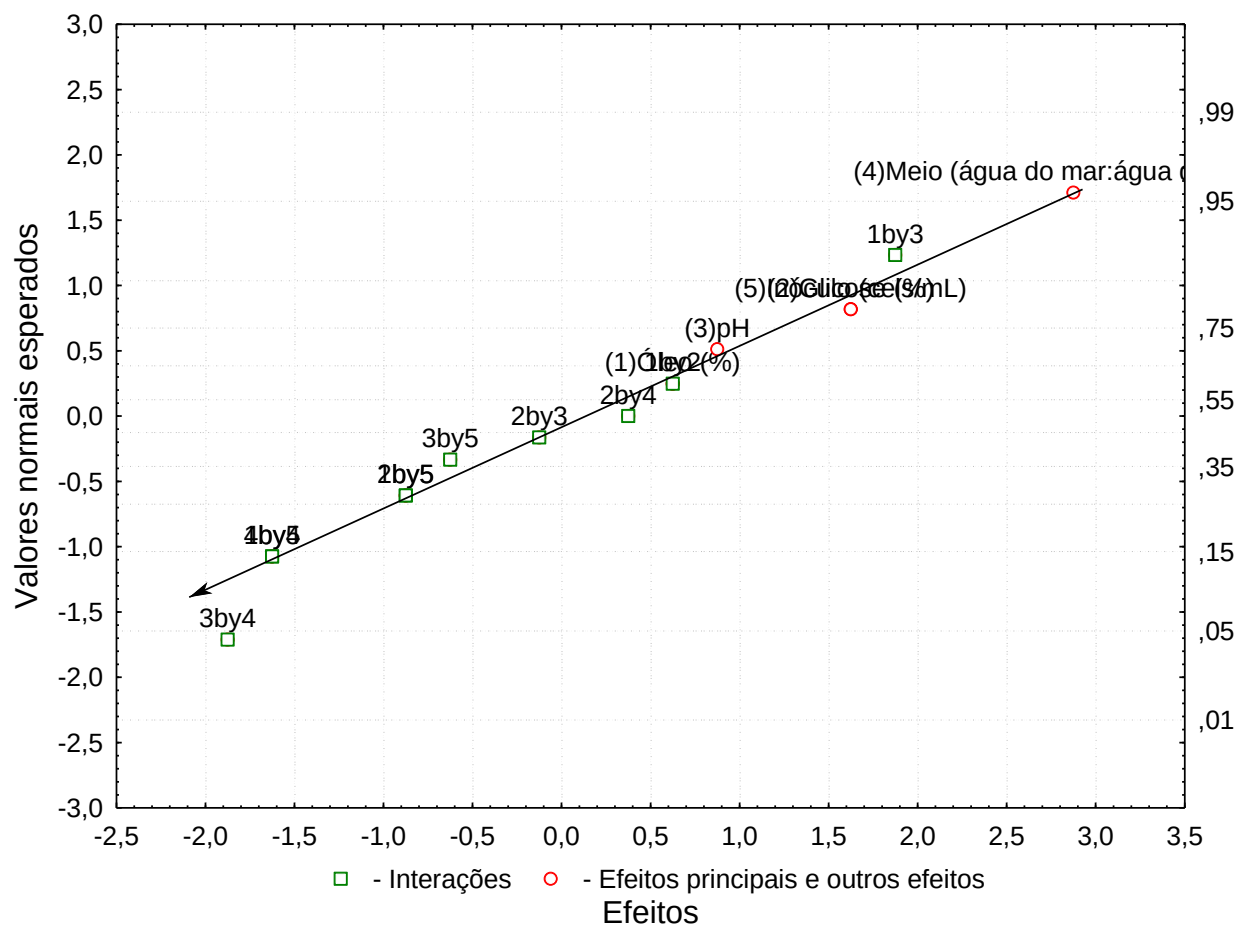


Figura 2. Gráfico normal dos efeitos das variáveis (óleo, meio, glicose, pH e inoculo) e Interações sobre o índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica* do planejamento fatorial fração meia 2^{5-1} .

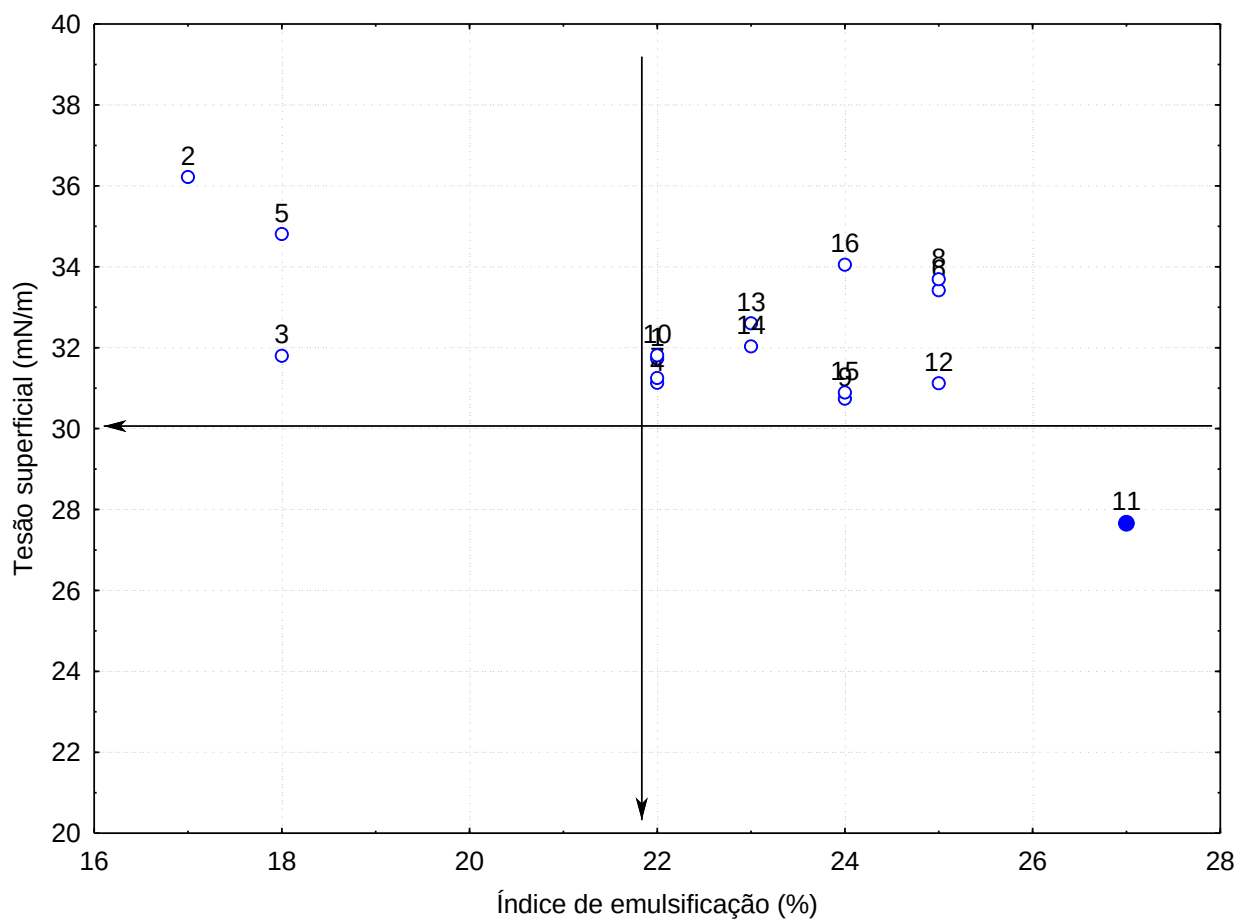


Figura 3. Diagrama de dispersão da tensão superficial e o índice de emulsificação para todos os ensaios do líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica* do planejamento fatorial fração meia 2^{5-1} .

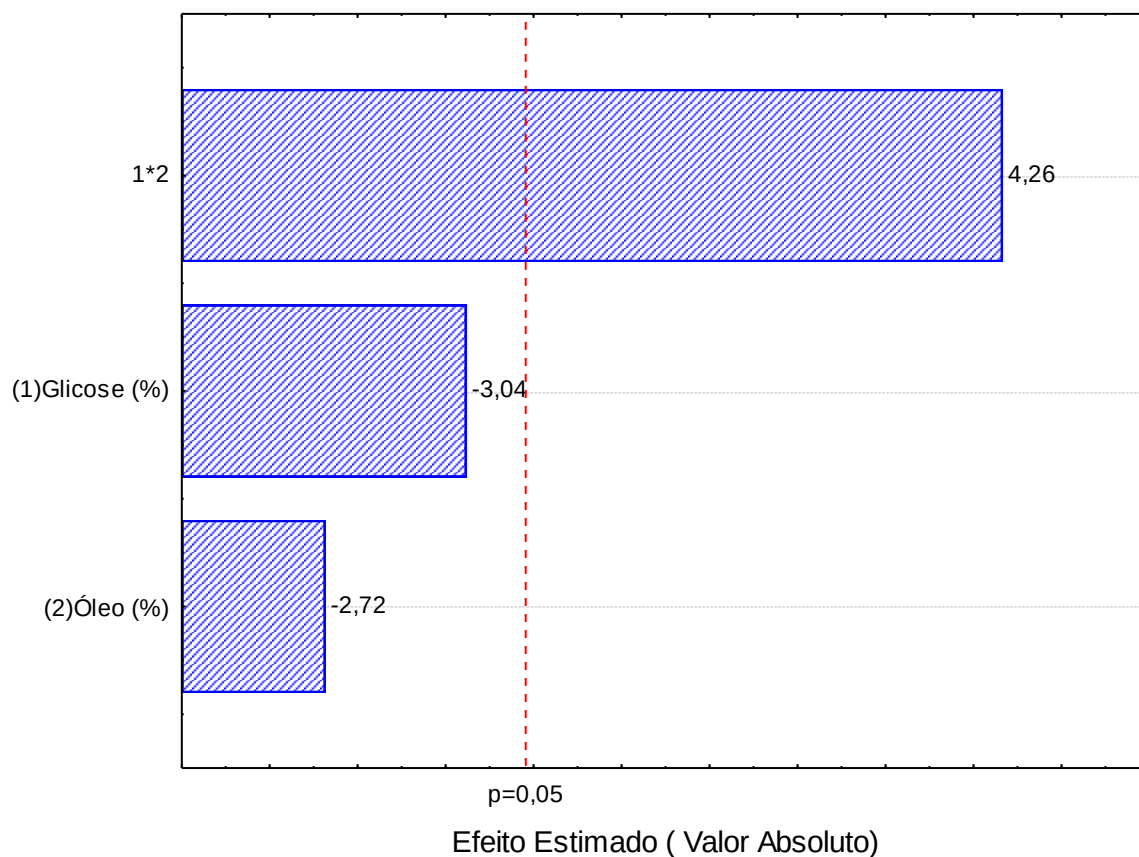


Figura 4. Gráfico de Pareto dos efeitos principais para a produção do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* com óleo de amêndoa, tendo como variável-resposta a tensão superficial do planejamento fatorial 2^2 com o ponto central em quadruplicata.

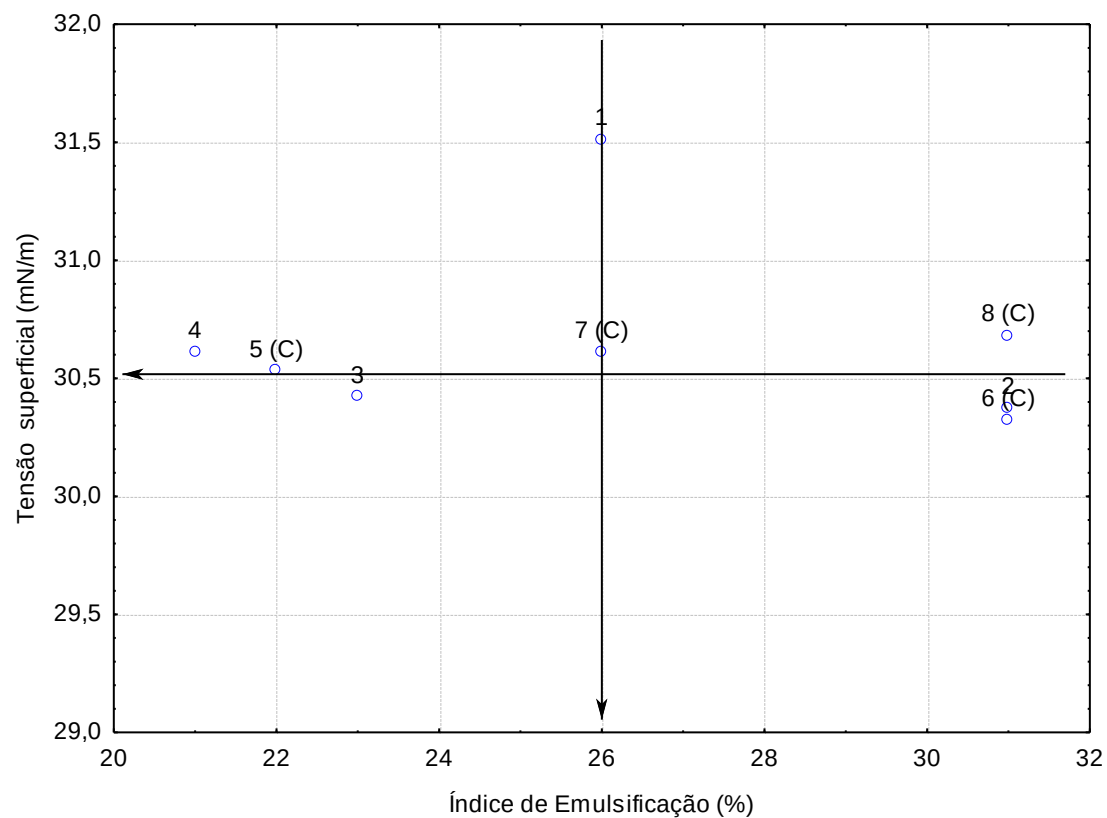


Figura 5. Diagrama de dispersão da tensão superficial e o índice de emulsificação em todas as condições do líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica* utilizando planejamento fatorial 2^2 com o ponto central em quadruplicata

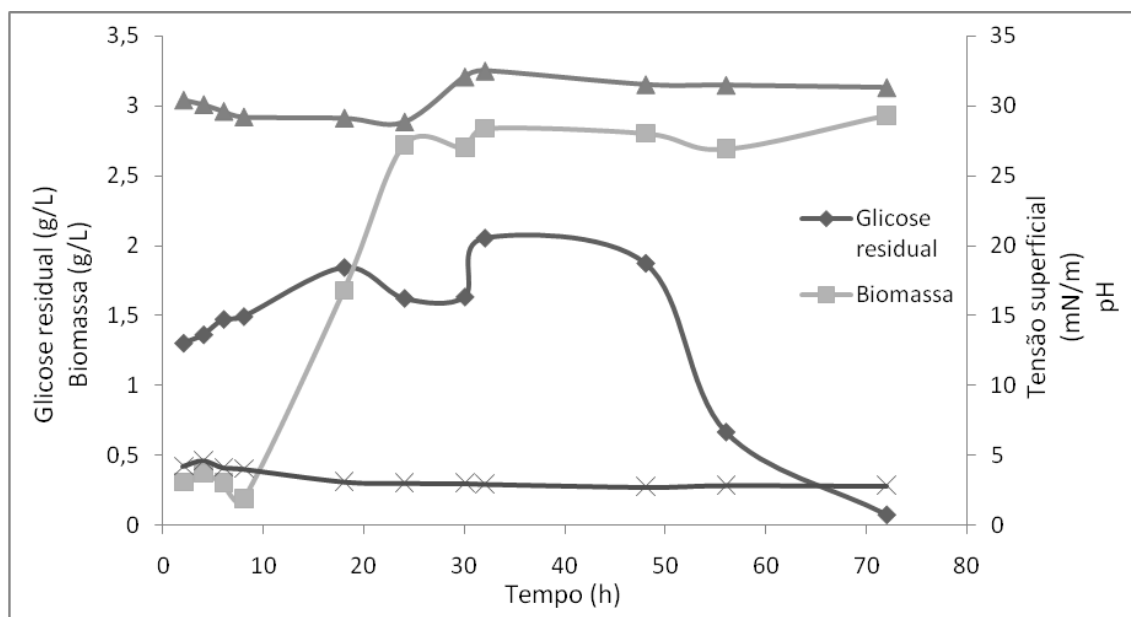


Figura 6. Curva de crescimento de *Candida lipolytica*, pH , consumo de glicose e tensão superficial do biossurfactante obtido na condição selecionada do planejamento 2^2 (5% de óleo de pequi da amêndoa e 1% de glicose) durante 72 h de cultivo.

3ª Artigo: Aplicação de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando óleo da amêndoa do pequi (*Caryocar coriaceum*) na remoção de contaminantes hidrofóbicos adsorvidos

Santana, W.J. ^{1,2,3,5}; Rufino, R.D. ^{4,5}; Porto, A.L.F. ⁶ Campos-Takaki, G.M ^{4*}

¹ Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-Pernambuco, Brasil;

² Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN), Ceará, Brasil;

³ Faculdade de Tecnologia do Cariri (FATEC), Brasil, Ceará;

⁴ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil;

⁵ Doutorado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-Pernambuco, Brasil;

⁶ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Morfologia, Recife-Pernambuco, Brasil.

Manuscrito a ser submetido ao periódico Internacional:

Bioresource Technology

* Corresponding author: E-mail; takaki@unicap.br

Fax Number: + 55- 81- 21194043

RESUMO

A preservação e conservação do meio ambiente têm sido alvos de pesquisas em função do excesso de resíduos poluentes que são lançados nos rios, lagos e mares. A necessidade de remediar estas áreas proporcionou o desenvolvimento de novas tecnologias visando a biorremediação. Este trabalho teve como objetivo a aplicação do biossurfactante na remoção de areia de praia contaminada com óleos de girassol pós-fritura, petróleo, diesel, óleo queimado de motor, e a avaliação da estabilidade deste bioproduto aos tratamentos com diferentes valores de pH, temperatura e adição de diferentes concentrações de NaCl. A *Candida lipolytica* foi cultivada em meio mineral contendo 5% de óleo da amêndoa do pequi e 1% de glicose por 72 h a 150 rpm. Após esse período o líquido metabólico livre de células foi submetido a estudos para determinação da tensão superficial, índice de emulsificação utilizando óleo de milho, canola e n-hexadecano, e avaliada a sua eficiência na remoção de óleos na areia contaminada. Os resultados demonstraram que biossurfactante ainda apresentava-se estável após a remoção dos diferentes óleos, quando submetido a diferentes valores de pH. Com o pH 12 foi obtida a menor tensão superficial 25,61 mN/m. Os ensaios avaliando o efeito da temperatura demonstraram que a 5 °C ocorreu um aumento da tensão superficial de 27,66 mN/m para 33,76 mN/m, resultados semelhantes foram obtidos quando a concentração de NaCl foi aumentada, resultando no aumento da tensão superficial de 27,66 mN/m para 34,45 mN/m. Para aplicação do biossurfactante na remoção de óleo diesel, motor, girassol pós-fritura e petróleo adsorvidos em areia foram utilizados tratamento com líquido metabólico livre de células sob agitação orbital a 150 rpm por 24 h, o outro tratamento foi contínuo utilizando 5% de óleo da amêndoa do pequi e 1% de glicose e água do mar sob agitação orbital a 150 rpm por 72h. Os resultados demonstraram que a melhor remoção (58,17%) ocorreu com o petróleo após 32 h. Os melhores índices de emulsificação durante o tratamento contínuo foram observados com 8 h utilizando o óleo de milho 29,41% e com 24 h o óleo de canola com 25,80%, não houve emulsão quando o n-hexadecano foi adicionado. Os resultados obtidos com o biossurfactante produzido por *C. lipolytica* revelaram um potencial de aplicação em processos industriais e ambientais que necessitem de um alto poder de redução da tensão superficial.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*, biossurfactante, óleo de pequi, biorremediação.

ABSTRACT

The preservation and conservation of the environment have been objective of researches in function of the excess of pollutant residues that you/they are thrown in the rivers, lakes and seas. The need to remedy these areas provided the development of new technologies seeking the

bioremediation. This work had as objective the application of the biosurfactant in the removal of polluted soils with sunflower oils powder-fry, petroleum, diesel, burned oil of motor and the verification of the stability with different pH treatments, temperature and addition of different concentrations of NaCl. The yeast was cultivated in mineral middle containing (5% of oil of the almond of the pequi and 1% of glucose, pH 4.5 and inoculum of 10^7 for 72 h to 150 rpm. After that period the metabolic liquid free from cells was submitted to studies for verification of the superficial tension, emulsification index using (wheat germ oil, canola and n-hexadecane) and the efficiency in the removal of oils in polluted sand with treatment continues and of the metabolic liquid. The results demonstrated the stability of the biosurfactant when submitted to different pHs, in the pH (12) it was obtained to smallest superficial tension (25.61 mN/m), the temperature to 50 C contributed to the increase of the superficial tension of (27.66 mN/m) for (33.76 mN/m), as well as the several concentrations of NaCl they also influenced in an increase of (27.66 (mN/m) for 34.45 (mN/m). the application of the biosurfactant in the removal of polluted sand, was better with petroleum 2 for continuous treatment after 32 hours with a removal of (58.17%). The best emulsification indexes during the continuous treatment were observed with (8:00) using the wheat germ oil (29.41%), with 24 h with canola oil (25.80%), there was not emulsion when the n-hexadecane was added. The results obtained with the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* revealed an application potential in industrial and environmental processes that need a high power of reduction of the superficial tension.

keyword: *Candida lipolytica*, biosurfactant, pequi oil, removal

INTRODUÇÃO

Os surfactantes possuem estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro ou micro emulsões, ação espumante, solubilidade e detergência (LANG & WULLBRANDT, 1999). Constituem uma classe de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais, uma vez que estes polímeros possuem

propriedades para aplicação no controle de resíduos oleosos dispersos (LIN, 1996).

Os biossurfactantes incluem uma grande variedade de estruturas químicas como: glicolipídios, lipopeptídeos, complexos preteínas-polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros produzidos por microrganismos quando cultivados em substratos insolúveis (óleos, resíduos e hidrocarbonetos) e solúveis (carboidratos). Os compostos de origem microbiana denominados são produtos metabólicos de microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras e exibem propriedades surfactantes com alta capacidade emulsificante e redução da tensão superficial (HOLMBERG, 2002).

Diante da grande variedade de sua composição estes biopolímeros apresentam diversas propriedades e funções fisiológicas entre as suas várias famílias (KIM *et al.*, 2000). A formação de um filme molecular reduz a tensão superficial e interfacial sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (RON & ROSENBERG, 2001). A grande maioria dos surfactantes hoje disponível é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Portanto, as novas legislações ambientais, bem como a preocupação ambiental entre os consumidores, têm levado a procura por surfactante natural como alternativa aos produtos existentes (HABA *et al.*, 2000; NITSCHKE *et al.*, 2002).

A produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando fontes de carbono de baixo custo, como óleos vegetais e resíduos industriais, vêm sendo amplamente estudados por vários autores (SARUBBO *et al.*, 1997; SARUBBO *et al.*, 1999; VANCE – HARROP *et al.*, 2000; VANCE – HARROP, 2000; SARUBBO *et al.*, 2001, 2006; RUFINO *et al.*, 2007).

Algumas estratégias econômicas estão sendo desenvolvidas para a produção dos biossurfactantes para que eles possam competir com os surfactantes químicos (NITSCHKE *et al.*, 2002). Com a globalização da indústria e a necessidade de sustentabilidade ambiental, que busca tratar de todos os resíduos gerados, a biotecnologia oferece soluções para diminuir os problemas ambientais gerados pelos grandes complexos industriais, destacando-se a indústria petroquímica.

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na biorremediação e dispersão de derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleos em tanques de estocagem, na recuperação de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (MULLIGAN, 2005). Outras aplicações incluem os mais diversos setores industriais, como as indústrias de alimentos, detergentes, cosméticas e farmacêuticas (PAZ, 2005).

A biorremediação e biorremoção surgem como tecnologias inovadoras e apresentam excelentes resultados na remoção de compostos derivados de petróleo e metais pesados, entre outros poluentes (COOPER & ZAJIC, 1980; SAINT – BLANQUAT, 1984; ABU-RUWAIDA *et al*, 1991; FIECHTER, 1992; CARRILO *et al.*, 1996; DUBEY & JUWARKAR, 2001; HUA *et al.*, 2003; QUEIROGA *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação na remoção de óleos de solo contaminado e a estabilidade do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*, utilizando o óleo da amêndoa do pequi como fonte de carbono, para posteriormente ser empregado nas indústrias e em processos de biorremediação de solos contaminados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo: Os estudos foram realizados utilizando a *Candida lipolytica* UCP 0988, como microrganismo produtor de biossurfactante, pertencente à coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco, a qual foi mantida em meio Yeast Mold Agar (YMA) constituído por extrato de levedura (0,3%), extrato de malte (0,3%), triptona (0,5%), glicose (1%) e ágar (2%), água destilada q.s.p. (100mL) e o pH 5,5.

Substrato: Os substratos utilizados para produção do biossurfactante foram os óleos da amêndoa do pequi, obtidos comercialmente dos produtores da Região da Chapada do Araripe do Sul do Ceará. A composição em ácidos graxos do óleo da amêndoa do pequi é a seguinte: Ácido cáprico (4,7%); Ácido láurico (1,1%); Ácido mirístico

(47,8%); Ácido palmítico (0,8%); Ácido palmitoléico (0,7%) e Ácido oléico (25,1%).

Meio de produção e condições de cultivo: A *Candida lipolytica* UCP 0988 foi crescida em meio Yeast Mold Broth (YMB): contendo: extrato de malte – 0,3%, extrato de levedura – 0,3% , triptona- 0,5% , d-glicose 1%, 100mL de H₂O, pH do meio foi ajustado para 5,5. Os cultivos para a produção do biossurfactante foram realizados em frascos Erlenmeyer com 1000 mL de capacidade contendo 300mL de meio de produção descrito por Vance – Harrop et al, (2003), suplementado com diferentes concentrações de óleo da amêndoa do pequi de acordo com o planejamento experimental, utilizando um inóculo de 10⁷ células/ mL, foram incubados em agitador orbital a 150 rpm por 72 horas a 28^oC. Após o tempo máximo de cultivo as células foram separadas do líquido metabólico por centrifugação a 3000 x g, e o sobrenadante foi filtrado em filtro com porosidade de 0,22 mm. A biomassa foi utilizada para avaliar o crescimento e o líquido metabólico livre de células para determinação do pH, índice de emulsificação e tensão superficial.

Planejamento fatorial 2⁵⁻¹

Um planejamento fatorial fração meia 2⁵⁻¹ foi realizado com objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes: glicose e óleo: pequi (amêndoa), pH inicial, meio mineral e inóculo. Sobre a variável resposta da tensão superficial e índice de emulsificação (Tabela 01). Foram realizadas análises estatísticas dos resultados do planejamento com o auxílio do software Statistica 8.0. (Statsoft, 2007).

Índice de emulsificação

A determinação do índice de emulsificação das amostras do líquido metabólico livre de células foi verificada conforme descrito por Cooper e Goldenberg (1987), onde 1,0 mL de n-hexadecano, óleo de canola e óleo de milho, foram adicionados a 2 mL do líquido metabólico livre de células em tubos graduados e agitados em vórtex durante 2 min. A estabilidade da emulsão foi determinada em (24h), logo após foi

calculado o índice de emulsificação, onde a medição da altura total foi multiplicado por 100 e dividido pela altura da emulsão, sendo o resultado expresso em porcentagem.

Determinação do pH

A determinação do pH do líquido metabólico livre de células foi realizada utilizando um potenciômetro Orion (modelo 310).

Tensão superficial

A tensão superficial foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kuyukina e colaboradores (2001), em tensiômetro automático (Sigma 70-KSV Instruments LTD, Finlândia), utilizando o anel de DuNuoy, a temperatura ambiente (28⁰ C), sendo o resultado expresso em mN/m.

Estabilidade do agente surfactante frente a variações de pH, adição de NaCl e temperatura

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada através da determinação do índice de emulsificação, em diferentes temperaturas (0, 5, 70, 100 e 120⁰C) diferentes concentrações de NaCl (2, 4, 6, 8 e 10%) e diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10 e 12) (ABU-RUWAIDA et al., 1991; CAMEOTRA & MAKKAR, 1998; KIM et al., 2000).

Aplicação do biossurfactante na remoção de óleos adsorvidos na areia contaminada

Para eficiência da remoção foi utilizado óleo de girassol pós - fritura, óleo de motor, diesel, petróleo (provenientes de do Porto de Suape no Estado de Pernambuco), adsorvidos na areia de praia utilizando dois tratamentos: com líquido metabólico livre de células e de *Candida lipolytica* e um tratamento utilizando condições otimizadas (5% de óleo de pequi, 1% de glicose, pH 4,5, meio mineral 2:1 (v/v) água do mar e destilada e inóculo 10⁷).

Tratamento com líquido metabólico na remoção de óleos e petróleo adsorvidos em areia

Para remoção do óleo diesel, girassol pós – fritura, motor e petróleo adsorvidos na areia do mar, utilizou-se 20 g de areia do mar impregnada com 5 mL de óleo de girassol – pós fritura, óleo motor, diesel e petróleo. Frações da areia contaminada foram transferidas para 4 Erlenmeyers de 150 mL de capacidade como líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica*, os frascos foram submetidos à agitação de 150 rpm por 24 h a 28°C, ao controle foi adicionado água destilada. Após 24 h o líquido metabólico livre de células foi separado e foi adicionado a areia 20 mL de hexano e centrifugados 10000 x g por 15 min para separação da solução de lavagem e da areia. A quantidade de óleo removido foi determinada na areia lavada por gravimetria após extração dos óleos com 20 mL de hexano, sendo expressa em percentagem (NISTSCHKE & PASTORE, 2002).

Tratamento utilizando condições pré-estabelecidas na remoção de petróleo adsorvido em areia

Para remoção do petróleo adsorvido na areia do mar, utilizou-se 20g de areia impregnada com 5 mL de petróleo. Frações da areia contaminada foram transferidas para 06 Erlenmeyers de 150 mL de capacidade contendo 5% de óleo de pequi, 1% de glicose, pH 4,5, meio mineral 2:1 (v/v) água do mar e destilada e inóculo 10^7 com os seguintes intervalos de tempo (8 h, 24 h, 32 h, 48 h, 56 h e 72 h). Ao controle foi adicionado 20 mL de água destilada. Os frascos foram submetidos à agitação de 150 rpm por 72 h a 28°C, o líquido metabólico livre de células foi separado para determinação das variáveis resposta da tensão superficial e índice de emulsificação, em seguida foi adicionado a areia 20 mL de hexano e centrifugados 10000 x g por 15 min para separação da solução de lavagem e da areia. A quantidade de óleo removido foi determinada por gravimetria, sendo expressa em percentagem (NISTSCHKE & PASTORE, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção do biossurfactante

Muitas pesquisas buscam alternativas e descrevem a importância da produção de biossurfactantes, visando novas fontes de carbono de baixo custo e novas tecnologias. Neste sentido um planejamento fatorial foi utilizado como ferramenta estatística para realizar a produção de biossurfactante, utilizando o óleo de pequi como fonte de carbono em condições otimizadas. Portanto, o emprego de planejamentos estatísticos é uma importante ferramenta que pode ser utilizada para explicação não só da influência exercida nos processos fermentativos, como também, a interação entre outras variáveis (MYERS & MONTGOMERY, 2002).

A produção do biossurfactante ocorreu através da utilização dos ácidos graxos obtidos dos triglicerídeos do óleo de pequi, enquanto que o glicerol liberado deve ser utilizado para manutenção da energia. O extrato de levedura contém nitrogênio, fosfato e oligoelementos requeridos para o crescimento da levedura e produção do biossurfactante, sendo, conseqüentemente, importante para aumentar as concentrações de biomassa e surfactante (CASAS, 1996).

Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes pHs, NaCl e temperatura

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada no líquido metabólico livre de células após 72 h de cultivo. O NaCl adicionado ao líquido metabólico livre de células na concentração de 2% favoreceu o aumento da tensão superficial de 27,66 mN/m para 34,45 mN/m. A influência da concentração de sal sobre a tensão superficial está demonstrada na Figura 1. Estudos realizados por Desai & Banat (1997), demonstraram que concentrações acima de 2% de NaCl são suficientes para inativar o surfactante sintético. Estudos realizados por RUFINO, et al., 2007 sobre avaliação da estabilidade do biossurfactante no líquido metabólico livre de células de *C. lipolytica* frente a diferentes concentrações de NaCl (2%, 5% e 10%), demonstraram que independente dos substratos

testados, houve emulsificação nas diferentes concentrações de NaCl utilizando o n-hexadecano como substrato.

Os resultados demonstraram estabilidade do biossurfactante quando submetido a diferentes valores de pH, pode-se verificar que no pH 12 uma tensão superficial de 25,61 mN/m, enquanto que pH 6,0 a tensão superficial aumentou para 28,48 mN/m (Figura 2). Os estudos realizados com *Candida glabrata* com líquido metabólico livre de células demonstraram a estabilidade de um biossurfactante numa ampla faixa de pH quando o parâmetro analisado foi a tensão superficial (LUNA, 2007). De acordo com Kim e colaboradores (2000), as tensões superficiais do biossurfactante de *Nocardia* SP L - 417 foram mantidas em todos os valores de pH testados (2 a 12), indicando que a variação do pH não teve efeito significativo sobre a tensão superficial.

Em relação ao efeito da temperatura sobre o biossurfactante do líquido metabólico livre de célula houve um aumento na tensão superficial de 27,66 mN/m para 33,76 mN/m a 5^o C, demonstrando a estabilidade do biossurfactante frente a variações de temperaturas (Figura 3). Estudos realizados com o biossurfactante do líquido metabólico de *Candida glabrata*, demonstraram que o mesmo permaneceu estável frente a variações de temperaturas (LUNA, 2007). Rufino et al., (2007) verificaram a estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* no líquido metabólico livre de células quando submetido a diferentes temperaturas (5, 28 e 100 °C), observaram que não ocorreu alteração na estabilidade, embora na temperatura de 100°C não houve atividade de emulsificação. Os resultados obtidos por Brown e outros pesquisadores (1991), para o biossurfactante produzido pela bactéria designada como isolado 1165 demonstraram uma redução da tensão superficial no líquido metabólico livre de células quando submetido a temperatura de 4 °C, embora quando exposto a temperaturas elevadas 100 e 120 °C tenham apresentado valores de tensões entre 30 mN/m e 31,8. Makkar & Cameotra (2002, observaram a estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* após a exposição à temperatura de 100 °C em relação a tensão superficial.

Aplicação do biossurfactante na remoção de óleos e petróleo adsorvidos em areia por tratamento com o líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica*

A Tabela 1 demonstra os valores de percentuais de remoção dos óleos diesel, motor, girassol pós-fritura e petróleo, adsorvidos em areia contaminada utilizando o líquido metabólico livre de células de *C. lipolytica*, verificou-se que a melhor remoção (91,2%) ocorreu no tratamento com petróleo após 24 horas.

O biossurfactante produzido por *Candida glabrata* foi capaz de remover 84% do óleo motor adsorvido na areia contaminada segundo LUNA, 2007. O presente estudo na produção de biossurfactante por *C. lipolytica* utilizando óleo da amêndoa de pequi demonstrou uma potencial aplicação na remoção de óleos.

Cameotra & Makkar (1998) demonstraram que o biossurfactante isolado de *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de recuperar 56% do óleo adsorvido em areia contida em coluna. Abu-Ruwaida *et al.*, (1991), demonstraram que o líquido metabólico contendo o biossurfactante produzido por um isolado bacteriano foi capaz de recuperar 86% de óleo residual bruto, enquanto que a água destilada removeu cerca de 65% do óleo.

Tratamento utilizando condições pré-estabelecidas na remoção de petróleo adsorvido em areia

A figura 4 demonstra a tensão superficial do líquido metabólico livre de células durante o tratamento contínuo com 72 h, a menor tensão superficial foi de (37,70 mN/m) obtida com 32 h. Os resultados demonstram um aumento da tensão superficial durante o a remoção do petróleo de 27,66 mN/m para 37,70 mN/m.

A figura 5 e a tabela 2 ilustram a habilidade da remoção do petróleo adsorvido na areia contaminada. Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante produzido foi capaz de remover 58,17% em 32 horas do petróleo adsorvido na areia contaminada utilizando tratamento com condições pré-estabelecidas. Bento (2005), verificou a degradação do óleo diesel utilizando condições pré-

estabelecidas por fermentação em Erlenmeyers de 1000 mL, utilizando o *Aspergillus fumigatus* cultivado em meio contendo casca e farelo de arroz com extrato de levedura e peptona, o óleo diesel foi utilizado como fonte de carbono durante 144 h com uma umidade de 50%, temperatura a 30°C, pH 4,5 e inóculo de 10^6 células/mL. A concentração inicial de óleo diesel era de 233,81 ug/g, sendo que no final da fermentação o valor encontrado foi de 6,25ug/g aproximadamente 98% de remoção do óleo diesel. A biodegradação do petróleo por microrganismo representa um mecanismo primário pelo qual os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente. Alguns compostos do petróleo são facilmente eliminados no meio ambiente, várias substâncias são facilmente evaporadas ou biodegradadas, enquanto outras persistem recalcitrantes na natureza. Os microrganismos necessitam de condições ambientais de crescimento. Por sua vez a velocidade e a extensão com que os componentes do petróleo são degradados dependem da existência de pelo menos, quatro fatores principais, umidade para facilitar as reações; oxigênio, para a rápida oxidação dos hidrocarbonetos e outros compostos de petróleo, sob condições anaeróbicas; contato óleo e água, devido a relativa insolubilidade do óleo na água, o contato controla a velocidade de oxidação e a degradação; presença de nutrientes para o desenvolvimento microbiano (Rodrigues, 1984; Baird, 2002).

São conhecidos 25 gêneros de bactérias e 27 de fungos, que fazem a degradação dos hidrocarbonetos em ambiente marinho (FLOODGATE, 1984), enquanto que nos solos são registrados 22 gêneros de bactérias e 31 de fungos. Sendo os fungos mais importantes na degradação de hidrocarbonetos presentes em solos (BOSSERT & BORTHA, 1984).

Santos & Millioli (2003), avaliaram a potencialidade do uso de um surfactante biológico do tipo ramnolipídio no processo de tratamento de solo contaminado com óleo cru, com cinco ensaios em diferentes concentrações de biossurfactante 1, 2, 4, 6 e 10% (p/p), sendo o controle bioestimulado. Para cada ensaio utilizou-se 300g de solo com umidade ajustada para 50% de c/c (capacidade de campo), suplementado com nutrientes (C:P – 100:1) e pH ajustado para 7,0. Os ensaios foram

incubados em estufa a 30°C durante 120 dias, sendo as amostras retiradas periodicamente para análise de pH e medição da tensão superficial. Os resultados demonstraram que o ensaio 3 com uma concentração de 4% (p/p), apresentou a melhor remoção de 41,6% e uma tensão de 66,4 mN/m. Estes resultados confirmam a eficiência da remoção de substratos oleaginosos em solo utilizando biossurfactante em condições pré-estabelecidas.

Índice de emulsificação com óleos de milho e canola durante (72 horas) no tratamento contínuo

Os resultados obtidos com o índice de emulsificação utilizando óleo de milho, óleo de canola e n-hexadecano demonstraram que o melhor índice de emulsificação para o óleo de milho 29,41% foi determinado em 8 horas, enquanto com óleo de canola 25,80% ocorreu em 24 horas, e não houve formação de emulsão quando utilizou-se o n-hexadecano (Figuras 6, 7 e Tabela 3). Experimentos com *C. glabrata* cultivada com 7,5% de óleo de algodão, 5% de glicose e 0,3% de extrato de levedura, demonstrou um índice de emulsificação de 66% para n-hexadecano após 96 horas de cultivo (Luna *et al.*, 2007). O índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células foi determinado para diferentes substratos, obtendo-se 79% emulsificação com óleo motor, o óleo de milho e o n-hexadecano não apresentaram emulsificação (RUFINO *et al.*, 2007). Estes resultados corroboram os resultados obtidos no presente estudo em relação ao n-hexadecano. Estudos demonstraram que a atividade de emulsificação depende da afinidade do biossurfactante com o substrato testado (URUM & PEKDEMIR, 2004). Experimentos com *Chromobacterium violaceum* cultivada a 30°C a 150 rpm, durante 60 horas utilizando o óleo de pequi como fonte de carbono, apresentou um índice de emulsificação de 40% (PAZ & BARBOSA, 2007). Este resultado demonstra a importância do substrato testado na produção do biossurfactante, tanto por levedura como por bactéria.

CONCLUSÕES

O biossurfactante produzido nas condições estabelecidas neste trabalho demonstrou aplicabilidade como agente surfactante e emulsificante. O biopolímero presente no líquido metabólico é estável quando submetido a condições extremas de pH, temperatura e diferentes concentrações de NaCl. O biossurfactante apresentou características importantes para utilização no controle da poluição ambiental por compostos oleosos. A produção de novos biossurfactantes se faz necessário, considerando seu amplo potencial biotecnológico. Algumas estratégias econômicas, como meio de produção e substratos de baixo custo na produção do biossurfactante devem ser desenvolvidas, para que eles possam competir com os surfactantes químicos na proteção ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- Abu–Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S., Salem, A., Kadri, M. 1991. Isolation of biosurfactant – producing bactéria – produt characterization, and evalution. *Acta Biotechnologica*. 4, 315 – 324.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., Cameotra, S. S. 2000. Potencial commercial application of microbial surfactants. *Aplplied Microbiology Biotechnology*. 53, 495 – 508.
- Baird, C. 2002. química ambiental. Ed. Bookman. São Paulo – SP. P.662.
- Bednarski, W., Adamczak, M., Tomasik, J., Plaszczyk, M. 2004..Application of oil refinery waster in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology*. 95, 15-18.
- Bento, M. D. 2005. Análise química da degradação de hidrocarbonetos de oleo diesel no estuário da lagoa de Patos no Rio Grande do Sul. Tese de Mestrado em Oceanografis Física, Química e Geologia da Universidade Federal do Rio Grande.p. 112.
- Bicca, F. C., Mounter, A. V., Amorim, F. R. Tótolo, M.R. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier – producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Tecchnology*. 97, 868 – 875.
- Bossert, I.; Bartha, r. 1984. the fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.m (ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Campany, New York. P. 435 – 473.
- Brown, M.J. 1991.Biosurfactants for cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science*. 13, .61-64.
- Brow, M.J., Foster, M, Moses, V, Robinson, J.P, Shales, S.W, Springham, D.G.
1985. In: proceedings of the 3rd european meeting on improved oil recovery, Rome.
- Cameotra, S.S., Makkar, R. S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied microbiology and Biotechnology*. 50, 520-529.
- Casas, J.A. 1996. Producción de soforolípidios por *Candida bombicola*. Tese phd – Universidad complutense, Madri.
- Cerniglia, C. E.; Gibson, D.T. 1979. algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1 naphtal from naphthalene by *Agmenellum* quadruplication strain PR – 6. *biochemical 7 Biophysical. Research communication* v.88, p. 50 – 58.
- Cirigliano, M. C. & Carman, G. M. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 48, 747-750.
- Gruber, T., Chmiel, H., Kappeli, O., Sticher, P., Fieetchter, 1993. A integrated process for continuos rhmnolipid biosynthesis. In kosaric, n. biosurfactants. *Surfactants Science Series*.48, 157 – 173.

- Daniel, H. J., Ress, M., Syldatk, C. 199. Production of sorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola*. Biotechnology Letters.20, 1153-1156.
- Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbial Mol Rev. 61, 47 - 64.
- Floodgate, G. 1984. the of petroleum in marine ecosystems. In atlas. R..M. ed. Petroleum Microbiology. New york, Macmillan. p. 355 – 398.
- Histatsuk, K.I. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. Agricultural and Biological Chemistry Journal..5, 686 – 692.
- Kim, S.H., Lim, E. J., Lee, J.D., Lee, T. H. 2000. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. I-417. Biotechnology and Applied Biochemistry. 31, 249-253.
- Lang, S. & Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipids-biosynthesis. Microbial Surfactants. Applied Microbiology Biotechnology. 51, 21-32.
- Lima, M.T. 1980. Caracterização química e física do fruto do piquizeiro (*Caryocar coriaceum* Wittm). Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Ceará. 61.
- Luna, J.M., Sarubbo, L. A.,Campos-Takaki, G.M. 2007. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* ucp 1002. Eletronic Journal of Biotechnology.
- Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. 2002. An update on the use of iotechnology substrates for biosurfactante production and their new applications. Applied Micobiology and Biotechnology. 58, 428-434.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C. 2002. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, 2nd edn. New York: Jojn Wiley & Sons.
- Nitschke, M., Pastore, G.M. 2002. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. química nova. 25, 101.
- Robert, M., Mercadé, E., Andrés, c., espuny, M. J., Manresa, M. A., Guinea, j. optimizaci3n de la producci3n de biotensioativos por lppseudomonas aeruginosas 44T1. Grasas y Aceites, Sevilla. 42.(1). 1 – 7.
- Rodrigues, R. 1984. indicadores geoquímicos moleculares 9Biomarcadores) aplicações à exploraç3o de petróleo. In geoquímica do petróleo CENPES – Petróbras. p. 157 -190.
- Rufino, R.D., Sarubbo, L. A., Campos Takaki, G.M. 2007. Enhancement of stability of produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. World J Microbiol. Biotechnol. 23, 729 – 734.
- Santos, L.C., Millioli, V.S. 2003. Avaliaç3o da concentraç3o ótima de biossurfactante no processo de biorremediaç3o de solo contaminado. XI Congresso de Iniciaç3o Científica Ouro Preto/ MG.

Sarubbo, L. A., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M. 2006. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* ucp 1002. *eletronic journal of biotechnology*.9, 400-405.

Shepherd, R. 1995. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology*.40, 207 -217.

Vance-Harrop, M.H.V., Rocha, J.A.M.R., Sarubbo, L.A., Carntilizeiro da Cunha, M. G.; Campos-Takaki, G. M. 1997. Utilization of babassu oil to produce biosurfactant with *Candida lipolytica*. xxvi Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ. Caxamba.

Zhou, Q. H., Kosaric, N. 1993. Effect of lactose and olive oil on intra-and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnology Letters*.15, 477-482.

Paz, M.C.F., Barbosa, M. C.C. 2007. II Congresso de Pesquisas e Inovação da rede Norte Nordeste de educação tecnológica. João Pessoa.

Pirt, S.J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications 214 – 215.

Urum, k., Pekdemir, T. 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*.57, 1139 – 1150.

ANEXOS

FIGURAS

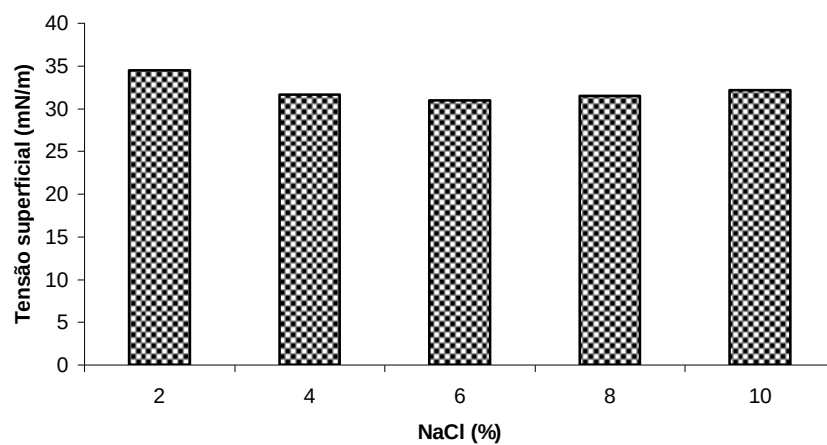


Figura 1 - Estabilidade do biossurfactante avaliada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica* em tratamento com várias concentrações de NaCl

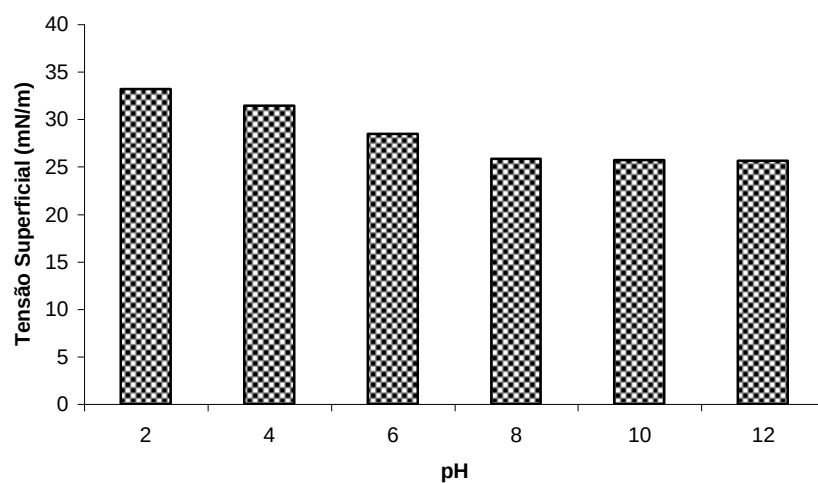


Figura 2 - Estabilidade do biossurfactante avaliada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica* em tratamento com vários pHs

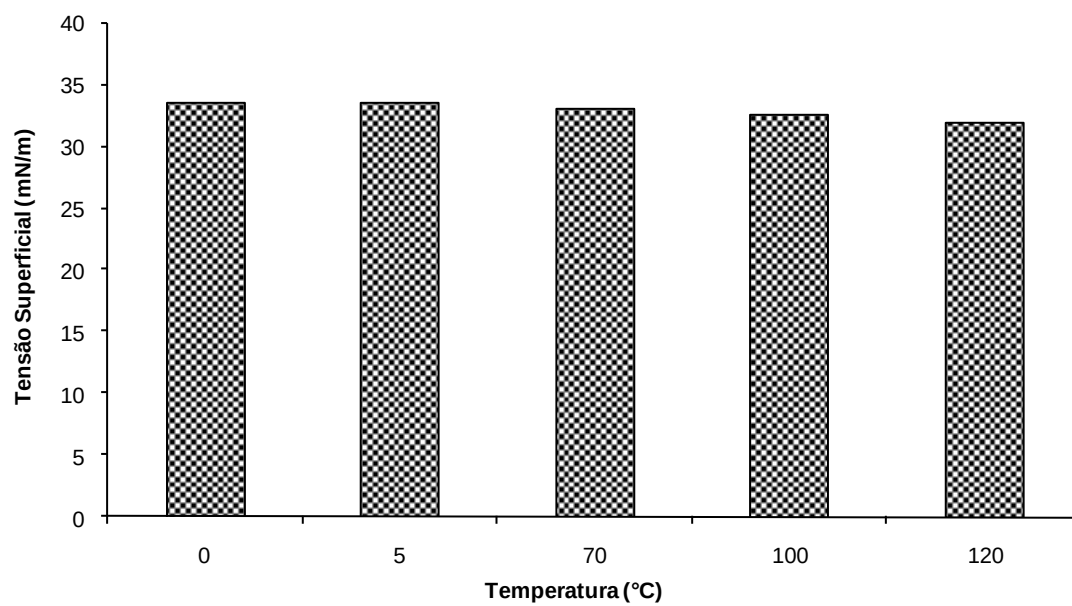


Figura 3 - Estabilidade do biossurfactante avaliada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica* após tratamento em várias temperaturas

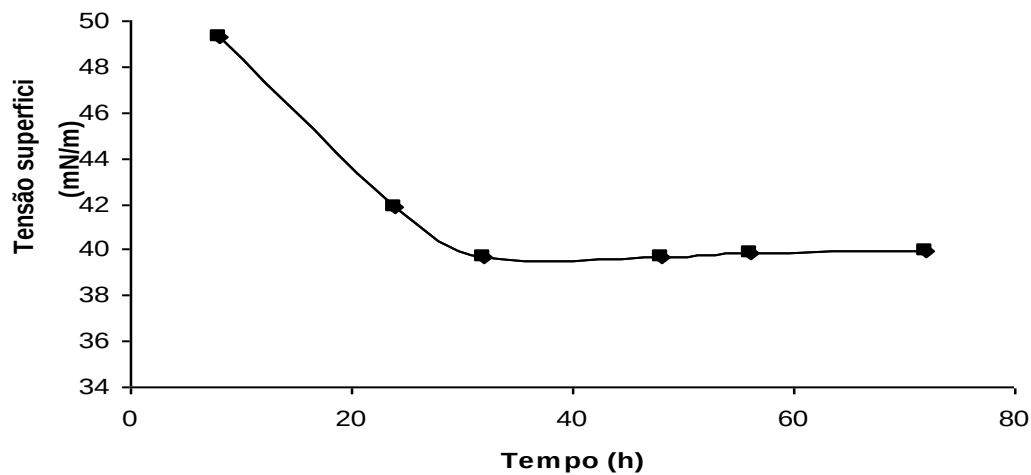


Figura 4 - Determinação da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica* durante tratamento com condições pré-estabelecidas 2 0g de areia, 2 g de petróleo, 5% de óleo da amêndoa do pequi, 1 g de glicose, pH 4,5 e inóculo 10^7 cel/mL mantido sob agitação orbital 150 rpm por 72 h a 28°C

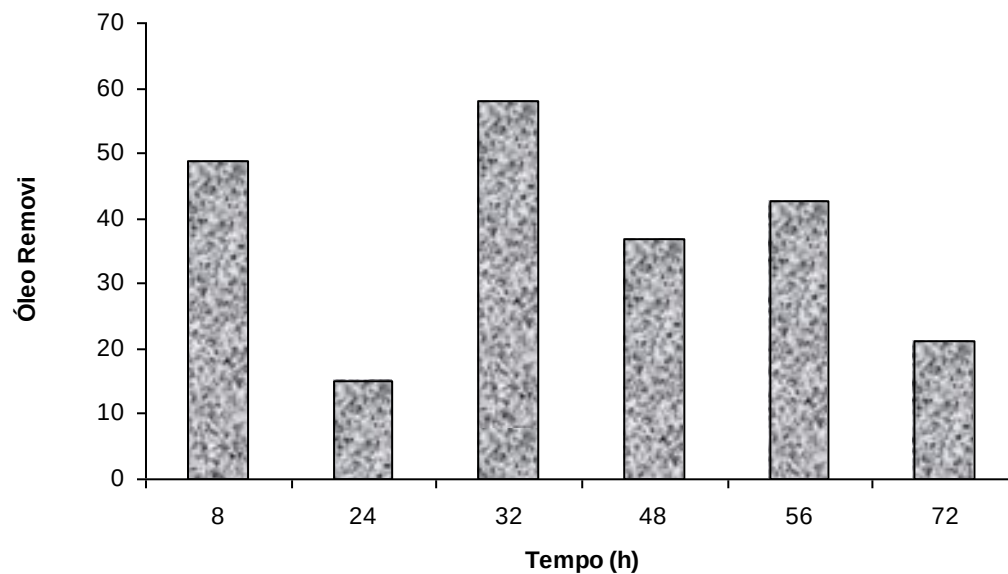


Figura 5 - Habilidade de remoção do petróleo adsorvido na areia contaminada durante tratamento com condições pré-estabelecidas 20 g de areia, 2 g de petróleo, 5 % de óleo da amêndoa do pequi, 1 g de glicose, pH 4,5 e inóculo 10^7 cel/mL mantido sob agitação orbital 150 rpm por 72 h a 28 °C

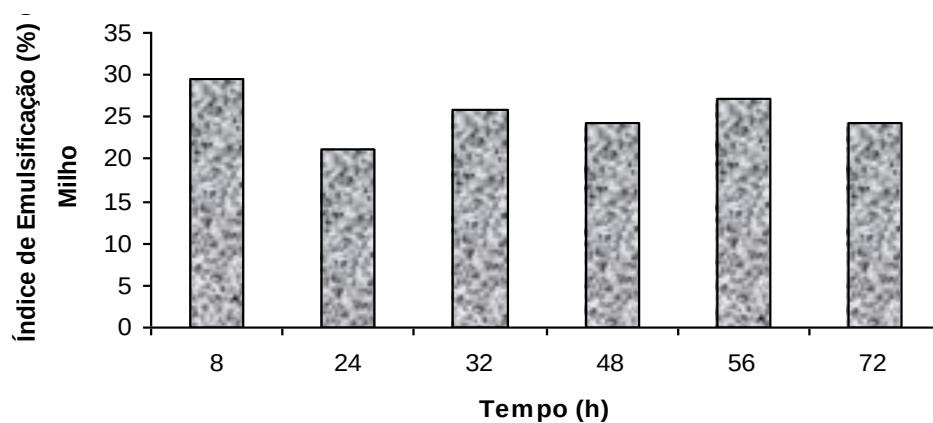


Figura 6 - Determinação do índice de emulsificação com óleo de milho durante tratamento com condições pré-estabelecidas 20 g de areia, 2 g de petróleo, mais 5% de óleo da amêndoa do pequi, 1 g de glicose, pH 4,5 e inóculo 10^7 cel/mL mantido sob agitação orbital 150 rpm por 72 h a 28°C

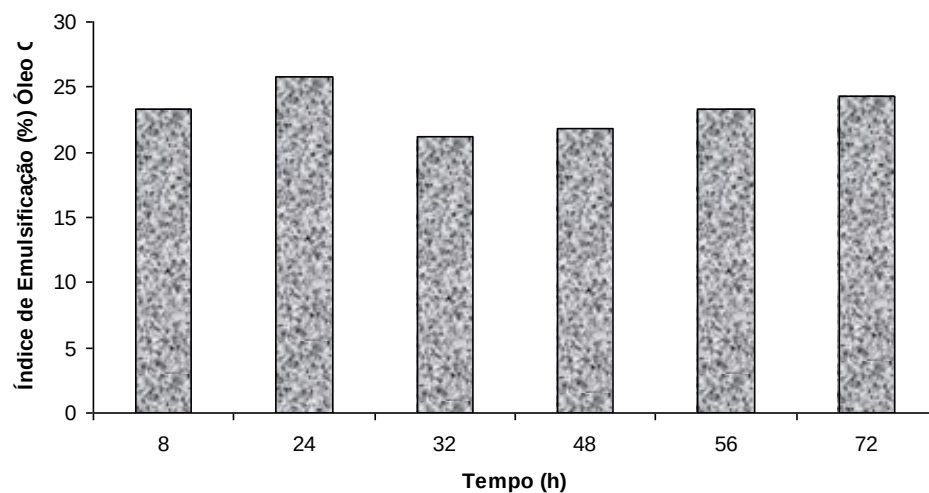


Figura 7 - Determinação do índice de emulsificação com óleo de canola durante tratamento com condições pré-estabelecidas 20g de areia, 2g de petróleo, 5% de óleo da amêndoa do pequi, 1g de glicose, pH 4,5 e inóculo 10^7 cel/mL mantido sob agitação orbital 150 rpm por 72 h a 28°C

TABELAS

Tabela 1 - Habilidade de remoção dos óleos diesel, motor, girassol pós-fritura e petróleo, adsorvidos em areia contaminada utilizando o líquido metabólico livre de células de *Candida lipolytica* cultivada com 5 % de óleo de pequi e 1 % de glicose mantido sob agitação orbital 150 rpm por 24 h a 28 °C, para o controle foi utilizado água destilada

Óleos	(%) removido	Controle H ₂ O destilada (%)
Petróleo	91,2	13,2
Diesel	86,1	31,3
Motor	75,7	78,4
Girassol pós- fritura	81,9	15,7

Tabela 2 - Habilidade de remoção do petróleo adsorvido em areia contaminada durante tratamento com condições pré-estabelecidas 20 g de areia, 2 g de petróleo, 5 % de óleo da amêndoa do pequi, 1 g de glicose, pH 4,5 e inóculo 10^7 mantido sob agitação orbital 150 rpm por 72 h a 28 °C

Óleo Petróleo (h)	(%) não removido	(%) removido
8	51,11	48,89
24	85,1	14,9
32	41,83	58,17
48	63,28	36,72
56	57,42	42,58
72	78,92	21,08

Tabela 3 - Determinação do índice de emulsificação com os óleos: milho e canola durante tratamento com condições pré - estabelecidas 20 g de areia, 2 g de petróleo, 5 % de óleo da amêndoa do pequi, 1 g de glicose, pH 4,5 e inóculo 10^7 mantido sob agitação orbital 150 rpm durante 72 h h a 28 °C

(h)	(%) Milho	(%) Canola
8	29,41	23,33
24	21,21	25,80
32	25,80	21,21
48	24,24	21,87
56	27,27	23,33
72	24,24	24,24

CONCLUSÕES GERAIS

1º Artigo

- A *Candida lipolytica* apresenta um grande um potencial de produção de biossurfactante, utilizando óleo de amêndoa e do endocarpo do pequi como fonte de alternativa de carbono;
- A *Candida lipolytica* cultivada com glicose e óleo da amêndoa e do endocarpo do pequi apresentou atividade lipásica e esterásica;
- O biossurfactante produzido reduz consideravelmente a tensão superficial da água;
- O biossurfactante produzido demonstra potencial como agente surfactante e emulsificante.

2º Artigo

- A utilização de planejamentos fatoriais como ferramenta estatística é de grande importância na formulação de experimentos biotecnológicos;
- A produção de biossurfactante em condições otimizadas com óleo de amêndoa do pequi representa uma nova alternativa de baixo custo para produção de biossurfactante com potencial de utilização como agente surfactante e emulsificante;
- O índice de emulsificação do biossurfactante produzido não apresentou alterações consideráveis, quando submetido a diferentes temperaturas, pHs e concentrações de NaCl;
- A maior produção de biossurfactante ocorreu na fase exponencial de crescimento de *C. lipolytica*;
- As variáveis pH e o óleo aumentaram a tensão superficial do biossurfactante, enquanto que a glicose e o meio mineral baixam a tensão superficial;
- O meio de produção aumenta a emulsão do biossurfactante. O óleo, o pH e a glicose não influenciaram a emulsão.

3º Artigo

- O biossurfactante produzido apresentou estabilidade quando submetido a diferentes temperaturas, pH e concentrações de NaCl;
- O biossurfactante produzido apresentou características como agente surfactante e emulsificante;
- O biossurfactante produzido apresentou características importantes para utilização em contaminação ambiental por compostos oleaginosos.
-